



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**

Institutionen för husdjurens utfodring och vård

Mjölksyrabakteriers förekomst i komjolk före och efter experimentellt inducerad mastit

Martina Roth

*Uppsala
2018*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2018:29*

Mjölksyrabakteriers förekomst i komjolk före och efter experimentellt inducerad mastit

Presence of lactic acid bacteria in cow milk before and after experimentally induced mastitis

Martina Roth

Handledare: Josef Dahlberg, institutionen för husdjurens utfodring och vård (HUV)

Biträdande handledare: Johan Dicksved, institutionen för husdjurens utfodring och vård (HUV)

Examinator: Sigrid Agenäs, institutionen för husdjurens utfodring och vård (HUV)

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0830

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2018

Delnummer i serie: Examensarbete 2018:29

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: mjölksyrabakterier, mikrobiota, mjölkko, mastit, LPS, MALDI-TOF MS, ddPCR

Key words: lactic acid bacteria, microbiota, dairy cow, mastitis, LPS, MALDI-TOF MS, ddPCR

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för husdjurens utfodring och vård

SAMMANFATTNING

Kojuvret har under lång tid betraktats som ett sterilt organ. Resultat från analyser med moderna metoder som polymerase chain reaction (PCR) och DNA-sekvensering har lett till teorin om att det finns en normal mikrobiota i mjölk och att den har ett endogent ursprung. Studier har visat att mikrobiotan består av låga koncentrationer både grampositiva och gramnegativa bakterier, däribland mjölksyrabakterier (LAB). Dessa är en heterogen grupp bakterier med antibakteriella och probiotiska egenskaper vilka kan ha positiv betydelse för juverhälsan och kons immunförsvar i samband med mastit. Mikrobiotans diversitet har visats vara större i friska juverdelar jämfört med mastitdrabbade och vissa studier visar på permanenta förändringar medan andra pekar på att mikrobiotan har förmåga att återhämta sig oberoende av antibiotikabehandling. Preliminära data från en ännu ej publicerad studie vid institutionen för husdjurens utfodring och vård (HUV) på Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) tyder på en minskad förekomst av LAB i mjölk i samband med en experimentellt inducerad mastit. Data indikerar också att sammansättningen av LAB 14 dagar efter mastitinduktion inte är densamma som innan men mer forskning på området behövs.

Syftet med studien var att undersöka hur förekomsten av LAB i mjölk förändras över tid efter en intramammär infusion med lipopolysackarid (LPS) från *Escherichia coli* i en spene vardera hos fem mjölkkor av raserna Svensk låglandsboskap (SLB) och Svensk röd och vit boskap (SRB). Odling på blodagar, de Man Rogosa and Sharpe agar (MRS-agar) och typning med Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) time-of-flight (TOF) mass spectrometry (MS) har använts för att identifiera arter av LAB och koncentrationer av LAB över tid har analyserats med droplet digital PCR (ddPCR). Ytterligare ett syfte var att utvärdera endotoxinmodellens förmåga att experimentellt inducera mastit.

Mjölksprov togs från tio friska lakterande kor på Lövsta forskningscentrum och undersöktes avseende somatiskt celltal (SCC), LAB-koncentration och bakterieinnehåll. Fem kor infuserades med LPS och fem infuserades med NaCl (kontroller) i en spene per ko. Mjölksprover togs vid flera tidpunkter innan och upp till 14 dagar efter infusion. På dagen för infusion bedömdes även kornas kliniska respons på infusion i form av kroppstemperatur, inflammationsskattning och smärtuttryck vid ett antal tidpunkter.

Den kliniska responsen på infusion skilde sig signifikant mellan LPS-infuserade kor och kontrollkor vid ett antal tidpunkter efter infusion. Celltalen var signifikant högre hos LPS-infuserade kor från två timmar ($p < 0,001$) fram till och med fem dagar ($p < 0,001$) efter infusion. Kroppstemperaturen var signifikant högre hos LPS-infuserade kor från två ($p < 0,001$) fram till och med sju timmar ($p = 0,004$) efter infusion och tecken på lokal inflammation var signifikant tydligare från två ($p = 0,009$) till fem dagar ($p = 0,048$) efter infusion. Tydliga smärtsymptom förekom endast hos LPS-infuserade kor.

Av samtliga mjölksprover resulterade 25% i bakterieväxt på blodagar och 50% i bakterieväxt på MRS-agar men samband mellan förekomst av bakterieväxt och tidpunkt kunde inte ses. Från MRS-agar isolerades kolonier för typning med MALDI-TOF MS men endast ett fåtal identifierades som LAB (*Streptococcus*, *Pedococcus pentosaceus*, *Enterococcus casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. faecium* och *Lactobacillus reuteri*) och var inte överrepresenterade vid några särskilda tidpunkter eller i någon av kogrupperna. Resterande prover identifierades framförallt som stafylokocker eller kunde inte identifieras av instrumentet. Resultaten från ddPCR-analysen tyder på att koncentrationen LAB är högst från fyra timmar till fem dagar efter infusion vilket inte var förväntat. Misstanke om falska positiva resultat till följd av bindning av fluoroforen EvaGreen till DNA från neutrofiler i mjölken bekräftades som en trolig orsak i uppföljande

försök utanför studiens ramar. Av denna anledning kunde inga slutsatser om koncentrationsförändringen av LAB över tid i samband med mastit dras.

Resultaten från studien visar att experimentellt LPS-inducerad mastit är en väl fungerande och tillförlitlig modell i syfte att undersöka systemiska och lokala förändringar i juvret i samband med mastit. De visar också att LPS-infuserade kor uttrycker tydlig smärta. Det går dessvärre inte att dra några slutsatser om förekomsten av LAB eller mikrobiotans dynamik i samband med mastit på grund av metodologiska problem.

SUMMARY

For a long time, the bovine udder has been described as a sterile organ. Results from milk analyses with modern methods such as polymerase chain reaction (PCR) and DNA-sequencing, has led to a theory about the existence of a commensal microbiota in milk and that it has endogenous origin. Studies have shown that the microbiota consists of low concentrations of gram positive and gram negative bacteria, including lactic acid bacteria (LAB). This is a heterogeneous group of bacteria with antibacterial and probiotic properties which in theory can be of positive value for udder health and the cow's immune defense in conjunction with mastitis. The microbial diversity has been shown greater in healthy udders than in mastitic udders and some studies show permanent changes while others point out that the microbiota has the ability to recover without the need of antibiotics. Preliminary results from a study yet to be published from the Swedish university of agricultural sciences (SLU) indicate that the presence of LAB in milk is reduced due to an experimentally induced mastitis. Data also indicate that the composition of LAB 14 days after mastitis induction differ from the composition before mastitis but more research is needed.

Preliminära data från en ännu ej publicerad studie vid institutionen för husdjurens utfodring och vård (HUV) på Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) tyder på en minskad förekomst av LAB i mjölk i samband med en experimentellt inducerad mastit. Data indikerar också att sammansättningen av LAB 14 dagar efter mastitinduktionen inte är densamma som innan men mer forskning på området behövs.

The purpose of this study was to investigate how the presence of LAB in milk changes over time after an intramammary infusion with lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* in one teat each in five cows of SLB (Swedish Friesian) and SRB (Swedish red and white) breed. To be able to identify LAB, cultivation on blood agar, de Man Rogosa and Sharpe agar (MRS agar) and typing with Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) time-of-flight (TOF) mass spectrometry (MS) has been used and concentrations of LAB over time has been analyzed with droplet digital PCR (ddPCR). Another purpose was to evaluate ability of the endotoxin model to induce mastitis experimentally.

Milk samples were taken from ten healthy lactating cows at the Lövsta research facility; somatic cell count (SCC), concentration of LAB and bacterial content was investigated. Five cows were infused with LPS and five were infused with sodium chloride (controls) in one teat per cow. Milk samples were taken at several time points before the infusion and up to 14 days after the infusion. On the infusion day, the clinical response to infusion was evaluated by rectal temperature, inflammatory signs and pain expression.

The clinical response to infusion differed significantly between LPS infused cows and control cows at a number of time points after infusion. SCC was significantly higher from two hours ($p<0.001$) up to five days ($p<0.001$) after infusion for LPS infused cows. Body temperatures were significantly higher from two ($p<0.001$) up to seven ($p=0.004$) hours after infusion for LPS infused cows and local signs of inflammation were significantly more distinct from two ($p=0.009$) up to five days ($p=0.048$) after infusion. Distinct pain expressions according to the Cow Pain Scale only appeared for LPS infused cows.

Out of all milk samples, 25% resulted in bacterial growth on blood agar and 50% resulted in bacterial growth on MRS-agar but no correlation between presence of bacterial growth and time point could be seen.

From MRS-agar, colonies were isolated for typing with MALDI-TOF MS but only a few were identified as LAB (*Streptococcus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus casseliflavus*, *E.*

faecalis, *E. faecium* och *Lactobacillus reuteri*) and they were not overrepresented at any time or in any of the cow groups. The non-LAB milk samples with bacterial growth were identified primarily as staphylococcus or could not be identified by the instrument for unclear reason. The results from the ddPCR analysis indicate that the concentration of LAB is highest from four hours to five days after infusion which was an unexpected finding. The suspicion about false positive results due to binding of the fluorochrome EvaGreen to neutrophilic bovine DNA was confirmed as a possible reason in a follow up study outside this work. For this reason, no conclusion about the variation in LAB concentrations over time in relation to mastitis could be drawn.

The results from this study show that experimental LPS induced mastitis is a well-functioning and trustworthy model to investigate the systemical and local changes in the bovine udder that appear during mastitis. They also show that cows infused with LPS do express pain. Unfortunately, no conclusions about the presence of LAB or the dynamics of the microbiota in mastitic udders can be drawn because of methodological problems.

INNEHÅLL

FÖRKORTNINGAR OCH DEFINITIONER	1
INLEDNING	3
LITTERATURÖVERSIKT.....	5
MIKROBIOTA I MJÖLK	5
<i>Finns det en mikrobiota och vad är i så fall källan till denna?</i>	<i>5</i>
<i>Vad består mikrobiotan av?</i>	<i>5</i>
<i>Betydelsen av en mikrobiota</i>	<i>7</i>
<i>Hur påverkas mikrobiotan av mastit?</i>	<i>7</i>
MJÖLKSRYBABAKTERIER (LAB) I KOMJÖLK	8
<i>LAB som probiotika och/eller mastitbehandling</i>	<i>8</i>
TEKNIKER FÖR ATT STUDERA LAB I MJÖLK	10
<i>Odling på MRS</i>	<i>10</i>
<i>MALDI-TOF MS.....</i>	<i>10</i>
<i>PCR</i>	<i>11</i>
DNA extraktion	11
Droplet digital PCR.....	12
MASTITINDUKTION MED LPS FRÅN E.COLI	12
BEDÖMNING AV SMÄRTA VID MASTIT	13
MATERIAL OCH METODER.....	14
LITTERATURÖVERSIKT	14
FÖRSÖKSUPPLÄGG	15
INKLUSIONSKRITERIER FÖR KOR I FÖRSÖKET	15
PROVTAGNINGSSCHEMA OCH SCREENING	15
<i>Bedömningar som gjordes i samband med mjölkprovtagning</i>	<i>16</i>
<i>Sammanställt schema över tidpunkter för provtagningar och bedömningar</i>	<i>16</i>
BAKTERIOLOGISK UNDERSÖKNING	17
<i>Odling</i>	<i>17</i>
<i>MALDI-TOF MS.....</i>	<i>17</i>
DNA EXTRAKTION.....	18
<i>Negativa extraktionskontroller</i>	<i>18</i>
<i>Positiva extraktionskontroller.....</i>	<i>18</i>

DDPCR	19
<i>Bakgrund till val av metoder för optimerad analys</i>	20
<i>Val av primers</i>	20
STATISTIK	22
RESULTAT	23
KLINISK RESPONS PÅ INFUSION MED LPS	23
<i>Celltal</i>	23
<i>Kroppstemperatur</i>	24
<i>Inflammationsskattning</i>	25
<i>Smärtsymptom</i>	26
BAKTERIOLOGISK UNDERSÖKNING	27
<i>Odling</i>	27
Blodagar	27
MRS-agar	29
<i>MALDI-TOF MS</i>	29
DDPCR	33
<i>LPS-infuserade kor och kontrollkor</i>	33
<i>Extraktionskontroller</i>	34
<i>PCR-kontroller</i>	34
JÄMFÖRELSE MELLAN VARIABLER OCH BEHANDLINGSGRUPPER ÖVER TID	34
DISKUSSION	36
KLINISK RESPONS PÅ INFUSION MED LPS	36
BAKTERIOLOGI	36
DDPCR	37
METODOLOGISKA PROBLEM OCH FELKÄLLOR	38
KONKLUSIONER	39
REFERENSER	40

FÖRKORTNINGAR OCH DEFINITIONER

16S rRNA-sekvensering	Sekvensering av en vanlig välbevarad bakteriegen i syfte att studera bakteriell fylogeni och taxonomi
CFU	Colony Forming Units = kolonibildande enheter. Används för att beskriva antal kolonibildande mikroorganismer i ett prov och är därmed uttryck för mängden livsdugliga bakterier per ml.
ddPCR	Droplet Digital Polymerase Chain Reaction
Entero-mammary pathway	Förmågan hos vissa bakterier från maternella magtarmkanalen att translokera med hjälp av mononukleära immunceller och migrera till mjölkkörtlarna via en endogen cellulär väg
FFA	Free Fatty Acids
LAB	Lactic Acid Bacteria
LPS	Lipopolysaccharide
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometer
Mikrobiota	Kollektiv benämning på mikroflora som återfinns i en given miljö. Mikroorganismer som bor i en särskild miljö t.ex. jorden, vätskeansamling eller på en plats i en organism och betraktas som en grupp.
Mock community	En definierad blandning/mix av mikrobiella celler och/eller nukleinsyramolekyler som skapats in vitro för att efterlikna/simulera kompositionen i ett mikrobiellt prov eller nukleinsyran som isolerats därifrån
MRS-agar	de Man, Rogosa and Sharpe Agar
PCR	Polymerase Chain Reaction
Primer	Kort RNA/DNA-sträng som fungerar som startpunkt för DNA-replikation
Pyrosekvensering	Sekvensering av kortare DNA-fragment (SNP – single nucleotide polymorphism)
qPCR	Kvantitativ PCR, från engelskans "quantitative PCR", detsamma som real-tids PCR (RT-PCR)
Ramp rate	Temperaturförändring över tid i PCR-programmet uttryckt i °C/sekund.
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
Respiratory burst	Snabb frisättning av reaktiva syreföreningar från olika typer av celler, vilket t.ex. sker när immunceller kommer i kontakt med bakterier
SCC	Somatic Cell Count
SLB	Svensk Låglandsboskap

SRB

Svensk Rödbrokig Boskap

INLEDNING

Mastit är en av de vanligaste och mest kostsamma sjukdomarna för mjölkindustrin världen över (Halasa *et al.*, 2007) vilket medfört att kunskap om de mastitorsakande patogenerna varit av yttersta vikt för att effektivt kunna diagnostisera och bekämpa infektionen/inflammationen. Under en lång tid har juvret betraktats som ett sterilt organ och det har hävdats att förekomst av bakterier i mjölk är ett resultat av kontamination från spenkanalen, mjölkkningsutrustningen eller omgivande miljö (Mantere-Alhonen, 1995). De senaste årens framsteg inom molekylärbiologiska tekniker som polymerase chain reaction (PCR) och sekvensering har dock utmanat idén om sterilitet och visat på stor bakteriell diversitet i mjölk med efterföljande förslag på att det finns en normal bakterieflora – en mikrobiota – i mjölk (Oikonomou *et al.*, 2012; Rainard, 2017), inte enbart bestående av miljökontaminanter (Cabrera-Rubio *et al.*, 2012).

När det väl gjorts studier på mjölkens innehåll och förändringar i denna har dessa dessutom ofta gjorts ur ett mejeritekniskt perspektiv och inte ur ett juverhälsoperspektiv. Senare års studier tyder dock på att det finns en mikrobiota i mjölk, eftersom bakteriellt DNA har hittats i odlingsnegativa mjölkprover från friska individer. Denna mikrobiota verkar vara mindre artrik hos individer med mastit (Oikonomou *et al.*, 2012; Kuehn *et al.*, 2013) och hos individer med historia av mastit. Huruvida förändringen i sammansättning beror på infektionen i sig eller antibiotikabehandling alternativt fanns redan innan infektionen och eventuellt bidragit till uppkomsten av infektion är inte klarlagt (Falentin *et al.*, 2015). Enligt flera studier är mastit ett resultat av dysbios i juvret snarare än enbart infektionen i sig (Oikonomou *et al.*, 2012; Kuehn *et al.*, 2013; Oikonomou *et al.*, 2014) vilket gör det intressant att studera hur mikrobiotan förändras under sjukdom och i återhämtningsprocessen (även vid behandling och efter behandling) för att få ökad förståelse för mastit som sjukdom.

Mjölksyrabakterier (LAB) är en heterogen grupp bakterier i mjölk med stor betydelse för fermenteringsprocessen vid förädling av mjölkprodukter. Forskningsresultat från försök *in vitro* indikerar också att de skulle kunna agera probiotika för att förebygga (och behandla) mastit hos kvinnor (Heikkilä & Saris, 2003; Martín *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2006; Jiménez *et al.*, 2008; Arroyo *et al.*, 2010) och kor (Crispie *et al.*, 2008; Klostermann *et al.*, 2008; Frola *et al.*, 2011), då olika arter av LAB visats kunna hämma patogena bakterier som associeras med mastit (Woodward *et al.*, 1985; Martín *et al.*, 2006; Klostermann *et al.*, 2008; Frola *et al.*, 2011; Espeche *et al.*, 2012; Bouchard *et al.*, 2013; Okafor *et al.*, 2013; Bouchard *et al.*, 2015). Detta är intressant i en tid då vi söker alternativ till antibiotika med tanke på resistensutveckling, både hos opportunister och kommensaler, och behandlingssvikt. För att få ökad förståelse för sambandet mellan juverhälsa och mikrobiota och förstå om avsaknad eller förekomst av LAB kan påverka utgången av mastit är det därför av intresse att studera vad som händer med LAB i mjölk under hela förloppet av en mastit.

Denna studie är en del av ett forskningsprojekt vid Institutionen för husdjurens utfodring och vård (HUV) på Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) som syftar till att undersöka hur mjölkens mikrobiota ändras i samband med mastit. Preliminära data från en ännu ej publicerad studie vid institutionen indikerar att inducerad inflammation *in vivo* orsakar en minskad förekomst av LAB i mjölk i samband med en experimentell inducerad mastit. Det verkar dock som om LAB återhämtar sig då de upptäckts i mjölkprover senare, vilket är förenligt med vad Ganda *et al.* (2017) såg där mikrobiotan återhämtade sig efter en experimentell infektion med *E. coli* oberoende av antibiotika. Data tyder dock på att sammansättningen LAB 14 dagar efter mastitinduktionen inte är densamma som innan men mer forskning på området behövs. Av dessa anledningar var syftet med denna studie att undersöka vilka effekter en injektion med

endotoxin från *E. coli* *in vivo* ger på kornas allmäntillstånd, juverhälsa och förekomst av LAB i mjölk.

LITTERATURÖVERSIKT

Mikrobiota i mjölk

Finns det en mikrobiota och vad är i så fall källan till denna?

Det råder delade meningar om huruvida det finns en normal, intramammär mikrobiota eller om all bakterieförekomst i mjölk från ett friskt kojuver är resultat av kontamination. Teorin om att juvret är ett sterilt organ (Mantere-Alhonen, 1995) har på senare år utmanats till följd av framsteg inom molekylärbiologiska tekniker som PCR och sekvensering. Dessa tekniker har påvisat stor bakteriell diversitet i mjölk med efterföljande förslag på att det finns en normal mikrobiota (Oikonomou *et al.*, 2012; Rainard, 2017), inte enbart bestående av miljökontaminanter (Cabrera-Rubio *et al.*, 2012). Flera forskare på humansidan diskuterar den möjliga existensen av en s.k. "entero-mammary pathway", vilken i teorin innebär att mikroberna hos ett värdjur inte lever i separata miljöer utan har förmågan att förflytta sig från magtarmkanalen till mesenteriallymfknutor och vidare till mjölkkörtlarna. Juvrets mikrobiota skulle till viss del således ha ett endogent ursprung (Martín *et al.*, 2003; Perez *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2012; Jost *et al.*, 2014) vilket bl.a. Martín *et al.* (2003) visar i en studie där majoriteten av LAB som isolerats från brösthud inte hade några gemensamma DNA-fragment med LAB som isolerats från bröstmjölken då de undersöktes med Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) PCR. Teorin om mikrobiotans endogena ursprung har även prövats på möss (Perez *et al.*, 2007). Stöd för att detta är en fysiologisk möjlighet även hos idisslande djur rapporterades 2015, då forskare fann små mängder bakterier från släktena *Ruminococcus* spp, *Bifidobacterium* spp och familjen *Peptostreptococcaceae* i mjölk, blod och träck hos samma kor. Mjölksproverna togs med hjälp av katetrar för att undvika kontamination. Dock behövs mer forskning på de specifika mekanismer som möjliggör translokationen (Young *et al.*, 2015).

Studier från 1975 visar på negativa odlingsresultat på mjölk som provtagits aseptiskt (Neave, 1975). Dessa forskare som hävdar att mjölken är steril har betonat vikten av sterilt tagna mjölkprover från spenkanalsväggen för att erhålla ett resultat att lita på i syfte att undersöka huruvida det finns en intramammär mikrobiota eller inte. Negativa odlingar på sterilt tagna mjölkprover har dock inte visats kunna räcka för att kunna avskeda teorin om en intramammär variabel mikrobiota eftersom negativa odlingsresultat kan förklaras av många saker såsom oförmåga att odla den sjukdomsalstrande bakterien, koncentrationer under detektionsnivån, intermittent usöndring, andra mastitorsakande mikroorganismer (Britten, 2012; Kuehn *et al.*, 2013), lågt antal levande bakterieceller eller inflammation utan kvarvarande infektion (Britten, 2012).

Vad består mikrobiotan av?

Flertalet faktorer har betydelse för mikrobiotans komposition och diversitet i mjölk. Hos kvinnor har man sett att body mass index (BMI), kroppsviktssuppgång, hur barnet har förlöst respektive laktationsstadium verkar vara kopplade till skillnader i mikrobiota (Cabrera-Rubio *et al.*, 2012). Bakterier som ofta förekommer i bröstmjölk från kvinnor är *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Lactococcus* spp, *Lactobacillus* spp och *Enterococcus* spp (Heikkilä & Saris, 2003; Martin *et al.*, 2003). Mjölksprover från kor på olika gårdar och olika geografiska platser har visats skilja sig åt i sammansättning (Espeche *et al.*, 2012; Oikonomou *et al.*, 2014) vilket tyder på att mikrobiotan varierar med omgivande miljö. Mikrobiotan kan dessutom variera mellan juverdelarna hos ett och samma djur beroende på deras kliniska status (Kuehn *et al.*, 2013; Oikonomou *et al.*, 2014) och man har sett att mikrobiotan kan få permanenta förändringar i

sammansättningen efter en mastit (Falentin *et al.*, 2015). En överkorsningsstudie med ett lågt antal mjölkkor (n=4) indelade i två försöksgrupper som utfodrades med olikstora mängder kraftfoder i två behandlingsomgångar, visar antydning till att mikrobiotan dessutom kan variera med diet och att risken för mastit kan öka med tilltagande mängd kraftfoder (Zhang *et al.*, 2015).

Många av de grampositiva bakterier som isoleras från komjölk återfinns i magtarmkanalen, i gödsel, vatten, jord, grovfoder eller som kommensaler på hud. De dominerar vid ett lågt bakterieantal i mjölk, har olika potential att orsaka sjukdom, olika betydelse för mjölk kvalitet och för värddjuret. Vissa är användbara inom mjölkindustrin, några har även visats ha probiotiska egenskaper. Gramnegativa bakterier blir procentuellt fler vid ett ökat antal totalbakterier, förstör mjölk kvaliteten och kan orsaka magtarmstörningar (Mantere-Alhonen., 1995).

Nedanstående tabell (tabell 1) sammanfattar vilka grampositiva respektive gramnegativa bakterier som isolerats från friska kojuvers mjölk i olika studier.

Tabell 1. Bakterier isolerade från kliniskt friska juver enligt Mantere-Alhonen (1995), Oikonomou *et al.* (2014), Falentin *et al.* (2016) och Ganda *et al.* (2017).

Bakterier isolerade från kliniskt friska juver	Källa
Grampositiva: <i>Micrococcus</i> spp, <i>Staphylococcus</i> spp, <i>Streptococcus</i> spp, <i>Lactobacillus</i> spp, <i>Listeria</i> spp, <i>Microbacterium</i> spp, <i>Propionibacterium</i> spp, <i>Bacillus</i> spp och <i>Clostridium</i> spp. Gramnegativa: <i>Pseudomonas</i> spp, <i>Aeromonas</i> spp, <i>Flavobacterium</i> spp, <i>Alcaligenes</i> spp och <i>Acinetobacter</i> spp, andra psykotrofer, fam. <i>Enterobacteriaceae</i> och koliforma bakterier	Mantere-Alhonen (1995)
<i>Propionibacterium</i> spp, <i>Faecalibacterium</i> spp, oklassificerade <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Aeribacillus</i> spp, <i>Bacteroides</i> spp, <i>Staphylococcus</i> spp, <i>Streptococcus</i> spp, <i>Anaerococcus</i> spp, <i>Porphyromonas</i> spp, <i>Comamonas</i> spp, <i>Fusobacterium</i> spp, <i>Enterococcus</i> spp, <i>Lactobacillus</i> spp och <i>Paeinbacillus</i> spp.	Oikonomou <i>et al.</i> (2014)
<i>Clostridia</i> spp, fylum <i>Bacteroidetes</i> och order <i>Bifidobacteriales</i>	Falentin <i>et al.</i> (2016)
Familjerna <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Aerococcaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Planococcaceae</i> , <i>Bacteroidaceae</i> , <i>Corynebacteriaceae</i> , <i>Clostridiaceae</i> , <i>Bacillaceae</i> och <i>Staphylococcaceae</i>	Ganda <i>et al.</i> (2017)

Oikonomou *et al.* (2014) undersökte mikrobiotan hos friska, subkliniskt och kliniskt infekterade juver med hjälp av 16s sekvensering. Djuren delades in i fem grupper baserat på förekomst eller frånvaro av odlingspositiva prover och celltal. Författarna fann att *Propionibacterium acnes* var den vanligaste bakteriearten i de flesta friska juverdelar. Förutom *Propionibacterium* spp var tre andra bakteriedivisioner gemensamma för samtliga 144 prover från friska juverdelar, med olika celltal (*Faecalibacterium* spp, oklassificerade *Lachnospiraceae*, *Aeribacillus* spp). *Lactobacillus* spp var vanligast hos kliniskt friska, odlingsnegativa juverdelar med celltal mellan 21 000 och 50 000 celler/ml. Förekomst av *Sphingobacterium* spp och

Streptococcus spp var associerat med förhöjt celltal medan förekomsten av *Nocardioides* spp och *Paenibacillus* spp ökade hos juverdelar med lägre celltal. *Staphylococcus* spp och *Streptococcus* spp var de vanligaste bakteriesläktena i alla grupper. Även i friska juver sågs de mastitörsakande agens *Streptococcus uberis* och *Staphylococcus aureus* utan några kliniska tecken på inflammation. Prevalensen anaeroba bakterier som t.ex. *Fusobacterium necrophorum* i friska och subkliniska juverdelar var låg.

Kuehn *et al.* (2013) såg också skillnader i sammansättningen av bakterier i prover från kliniskt sjuka respektive friska juver, genom pyrosekvensering av bakteriellt 16s rRNA. I kliniskt sjuka juver fanns mer av *Brevundimonas* spp, *Burkholderia* spp, *Sphingomonas* spp och *Stenotrophomonas* spp. I friska juver fanns mer av *Pseudomonas* spp, *Psychrobacter* spp och *Ralstonia* spp.

Betydelsen av en mikrobiota

Studier utförda på kvinnor respektive kor pekar på att en intramammär mikrobiota fyller flera viktiga funktioner. Inte minst verkar den kunna ha betydelse för bröst-/juverhälsan. Vissa isolat av stafylokocker, streptokocker, enterokocker och laktobaciller som isolerats från bröstmjölk hos kvinnor har visats hämma proliferation av *S. aureus in vitro* (Heikkilä & Saris, 2003). Andra specifika antibakteriella egenskaper har observerats hos ffa LAB isolerade ifrån både bröstmjölk (Woodward *et al.*, 1985; Martín *et al.*, 2006; Solange *et al.*, 2011) och komjölk (Espeche *et al.*, 2012; Bouchard *et al.*, 2013; Okafor & Umeh, 2013; Bouchard *et al.*, 2015). Mikrobiotan i juver är också viktig för utvecklandet och upprätthållandet av kons immunförsvar (Belkaid & Hand, 2014). Mikroberna kan dessutom vara livsviktiga för etablering av tarmfloran och immuntolerans hos avkomman (Martín *et al.*, 2003; Donnet-Hughes *et al.*, 2010).

Hur påverkas mikrobiotan av mastit?

Det finns flera rapporter som visar på att diversiteten i friska respektive mastitdrabbade juverdelar skiljer sig åt (Oikonomou *et al.*, 2012; Kuehn *et al.*, 2013; Oikonomou *et al.*, 2014; Falentin *et al.*, 2015; Ganda *et al.*, 2016; Ganda *et al.*, 2017). Kuehn *et al.* (2013) använde pyrosekvensering för att studera den bakteriella diversiteten i odlingsnegativ mjölk från tio infekterade juverdelar respektive tio friska juverdelar, från samma kor. En juverdel definierades som frisk vid frånvaro av onormal mjölk och inflammation, men hänsyn till celltal togs ej. Forskarna fann att den bakteriella diversiteten var högre i de friska juverdelarna än i de infekterade juverdelarna.

Även Ganda *et al.* (2016) observerade lägre diversitet i mastitdrabbade juverdelar jämfört med friska men såg 14 dagar efter ställd diagnos inga skillnader i mikrobiotan hos friska respektive antibiotikabehandlade juverdelar. De såg också att odlingsnegativa mjölkprover från juverdelar med mastit skiljde sig i totalantalet bakterier jämfört med friska och kunde inte genom DNA-sekvensering eller kvantitativ PCR (qPCR, från engelskans "quantitative PCR") hitta att dessa fall orsakades av specifika grupper av patogener. Författarna diskuterade huruvida denna ospecifika ökning av bakterier orsakar dysbios i juvret som i sin tur resulterar i mastit.

I en uppföljande studie (Ganda *et al.*, 2017) där en juverdel infekterades experimentellt med 100 colony forming units (CFU) *E. coli*, minskade diversiteten kraftigt och var lägst 30-78 timmar efter infektionen. Mot slutet av den 14 dagar långa försöksperioden hade diversiteten höjts igen hos både obehandlade kor och antibiotikabehandlade kor, vilket tyder på att mikrobiotan har förmåga att återhämta sig oberoende av antibiotikabehandling. Falentin *et al.* (2015)

nyttjade också pyrosekvensering och fann högre diversitet i friska juverdelar men såg också att mastit kan ge permanenta förändringar på den bakteriella kompositionen. De provtog 31 juverdelar med olika sjukdomshistorier, där vissa aldrig tidigare haft mastit medan andra haft det en eller flera gånger. Mjölk från juverdelar som tidigare haft mastit innehöll en större proportion av klassen *Clostridia*, fylumet *Bacterioidetes* och ordern *Bifidobacteriales* medan friska juverdelar innehöll mer av klasserna *Bacillus* och *Clamydia*. Forskarna spekulerade i huruvida denna skillnad kunde förklaras av infektionen i sig, antibiotikabehandlingen eller om mikrobiotan var förändrad redan innan infektionen och istället bidrog till infektionen. Hypotesen att en förändrad mikrobiota kan predisponera för klinisk mastit p.g.a. dysbios i juvret har tagits upp av flera forskare (Oikonomou *et al.*, 2012; Kuehn *et al.*, 2013; Oikonomou *et al.*, 2014; Ganda *et al.*, 2016).

Mjölksyrabakterier (LAB) i komjolk

Studier har påvisat flertalet olika LAB i bröstmjolk (Heikkilä & Saris, 2003; Martín *et al.*, 2003) och komjolk (Espeche *et al.*, 2012; Bouchard *et al.*, 2015). LAB är en taxonomiskt sett heterogen grupp men med den gemensamma egenskapen att de kan fermentera olika näringsämnen till mjölksyra. Samtliga är grampositiva, vanligen katalasnegativa, mikroaerofila, syratoleranta, ej sporulerande stavar eller kocker som återfinns i flertalet olika miljöer. De flesta LAB finns hos växter eller ingår i normalflora hos människors och djurs magtarmkanal, luftvägar, vagina och mjölk (Sun *et al.*, 2014). Woodward *et al.* (1985) har visat att LAB är en del av normalfloran även på spenhud.

De åtta viktigaste bakteriesläkterna tillhör två fylum, nämligen *Firmicutes* och *Actinobacteria*. Inom fylum *Firmicutes* finns ordern *Lactobacillales* och där finns de viktiga släktena *Enterococcus* spp, *Lactobacillus* spp, *Lactococcus* spp, *Leuconostoc* spp, *Pediococcus* spp, *Streptococcus* spp och *Weissella* spp. Inom *Actinobacteria* återfinns LAB i *Bifidobacterium* spp (Vankerckhoven *et al.*, 2004; Zang & Cai, 2014) vilka har biokemiska, fysiologiska och ekologiska egenskaper som är gemensamma med *Lactobacillales* (Aguirre & Collins, 1993; Gasser, 1994; Adams, 1999).

Förutom att ingå i normalfloran hos djur och människor är LAB viktiga i många andra sammanhang. De ingår i starterkulturer för produktion av mjölkprodukter och används som probiotika bl.a. i form av kosttillskott till människor (Aguirre & Collins, 1993; Gasser 1994). LAB i mjölk har också visat sig ha kortlivade effekter på immunsystemet då injektion med levande kulturer av *Lactococcus lactis* i kojuver med lågt celltal resulterade i snabbt tillflöde av neutrofiler påföljande två dagar och ett tillfälligt förhöjt celltal. Denna mekanism skulle kunna bidra till återhämtning i den mastitdrabbade juverdelen och hållas ansvarig för den probiotiska effekten på mastit (Crispie *et al.*, 2008).

LAB som probiotika och/eller mastitbehandling

Probiotika definieras som en levande mikroorganism vilken ger positiva hälsoeffekter hos värddjuret när det ges i tillräcklig mängd (Hill *et al.*, 2014). Så tidigt som 1985 isolerades LAB från spenhud på kvigor där 25 % visade sig ha förmåga att hämma utvalda mastitpatogener tillväxt *in vitro* och effekten var tydligast på grampositiva bakterier (Woodward *et al.*, 1985). Sedan dess har flera studier påvisat probiotiska egenskaper hos LAB isolerade från bröstmjolk (Heikkilä & Saris, 2003; Martín *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2006; Jiménez *et al.*, 2008; Arroyo *et*

al., 2010) respektive från komjölk (Klostermann *et al.*, 2008; Frola *et al.*, 2011; Espeche *et al.*, 2012; Bouchard *et al.*, 2013; Okafor *et al.*, 2013; Bouchard *et al.*, 2015).

Martín *et al.* (2006) är en av flera forskargrupper som visat att LAB har förmåga att även hämma gramnegativer, genom produktion av tillväxthämmande substanser och mjölksyra. De probiotiska, antibakteriella egenskaperna är dock stamspecifika, vilket också Bouchard *et al.* (2015) bekräftar. I försöket av Martin *et al.* (2006) visades att *Lactobacillus salivarius* CECT 5713 från bröstmjolk hos kvinnor producerar L-laktat, acetat och väteperoxid som kan vara orsaken till dess antimikrobiella aktivitet mot bl.a. stafylokokker, *E.coli* och *Klebsiella* spp. I en *in vitro* modell var de även motståndskraftiga mot nedbrytning och adhererade väl till tarmslemhinnan.

Espeche *et al.* (2012) isolerade 117 LAB från komjölk och undersökte egenskaper hos dessa som kan kopplas till den probiotiska förmågan. De fann att nio av 117 LAB-stammar hämmade tre av 13 utvalda bakterier varav endast *Streptococcus dysgalactiae* av dessa tre är en känd mastitpatogen. Solange *et al.* (2011) visade att arter ur *Lactobacillus* spp kunde hämma *Escherichia* spp och *Serratia* spp isolerade från magtarmkanalen och Frola *et al.* (2011) fann att *L. perolens* kunde hämma flera mastitörsakande patogener *in vitro*. *L. casei* är ytterligare en LAB som visats ha probiotiska egenskaper, då den kan hindra *S. aureus* från att ta sig in i juvrets epitelceller (Bouchard *et al.*, 2013). Bouchard *et al.* (2015) fann att *L. brevis* 1595, *L. brevis* 1597 och *L. plantarum* 1610 kan motverka kolonisation av patogener som *S. aureus*, *E. coli* och *S. uberis* och att nio LAB-stammar var antiinflammatoriska.

Studier visar även potential hos LAB att behandla mastiter. Klostermann *et al.* (2008) och Crispie *et al.* (2008) jämförde behandlingsresultaten som uppnåddes med antibiotika respektive frystorkad *L. lactis* DPC3147 vid subkliniska respektive kliniska mastiter hos mjölkkor. Intramammär behandling med bakteriocinproducerande *L. lactis* visade sig vara lika effektiv som antibiotika vid subkliniska mastiter (Crispie *et al.*, 2008; Klostermann *et al.*, 2008) bl.a. genom att bakterien stimulerade juvrets immunförsvar vilket ledde till snabbt tillflöde av neutrofiler och förhöjt celltal (Crispie *et al.*, 2008).

Spanska forskare (Jiménez *et al.*, 2008) publicerade 2008 en studie där 20 kvinnor med kliniska symptom på mastit orsakad av *S.aureus* som inte svarat på antibiotikabehandling istället behandlades med antingen frystorkade, orala kapslar av *L. salivarius* CECT5713 och *L. gasseri* CEC5714 vilka isolerats från bröstmjolk, eller placebo i 30 dagar. Kriterier för kvinnornas deltagande i studien var rodnad och smärta i bröstet, influensaliknande symptom med feber >38,5 °C, att antalet stafylokokker i bröstmjölken översteg 4 log₁₀ CFU/ml och att antalet leukocyter i mjölk var större än 6 log₁₀ CFU/ml. Kliniska symptom utvärderades varje vecka under försöksperioden av en barnmorska. 14 dagar in i behandlingen hade ingen av kvinnorna som fått probiotika kliniska symptom på mastit. Efter hela behandlingstiden hade dessa kvinnor signifikant mindre *S. aureus* i mjölken och laktobaciller kunde detekteras hos 6 av 10 kvinnor i denna grupp. Symptom på mastit persisterade i kontrollgruppen under hela försöksperioden.

I en uppföljande studie (Arroyo *et al.*, 2010) med till viss del samma forskare jämfördes probiotika och antibiotikabehandling. Totalt 352 kvinnor med kliniska symptom på mastit deltog, varav 251 antingen fick *L. fermentum* eller *L. salivarius* och resterande 101 kvinnor behandlades med antibiotika (amoxicillin+klavulansyra, amoxicillin, corimoxazole, cloxacillin eller erytromycin) i 21 dagar. Kliniska symptom på mastit utvärderades även i denna studie av en barnmorska, dag 0 och 21 i försöksperioden, och symptomen försvann helt eller förbättrades markant hos majoriteten kvinnor i probiotikagrupperna medan utvecklingen

varierade mer i antibiotikagruppen. Dessutom fick kvinnorna gradera upplevd bröstsmärta på en skala från 0 (mycket smärtsamt) till 10 (ingen smärta) vid dessa tillfällen. 88% respektive 85% av kvinnorna i de två probiotikagrupperna upplevde sig friska efter 21 dagar och resterande kvinnor upplevde en förbättring men kvarvarande, lätt smärta vid amning. I antibiotikagruppen hade endast 29% tillfrisknat helt. Den upplevda bröstsmärtan var starkt korrelerad till bakterieantalet i bröstmjolk vid både dag 0 (Spearman $p = -0,750$) och 21 ($p = -0,764$) ($p = 0,001$). Efter 21 dagar var bakterieantalet lägre hos probiotikagrupperna än i kontroll/antibiotikagruppen och laktobacillerna kunde isoleras från bröstmjölken, dessa kvinnor fick dessutom färre antal återfall med mastit.

Tekniker för att studera LAB i mjölk

Odling på MRS

Odling har länge varit, och är fortfarande, gold standard för att identifiera mastitorsakande patogener. Det är en enkel men arbetsam och tidskrävande metod som kan underskatta diversiteten av bakterier eftersom många bakterier inte kan odlas konventionellt (Dicksved, 2008; Collado *et al.*, 2009) och bakteriellt DNA hittats i odlingsnegativa mjölkprover även från friska kor (Oikonomou *et al.*, 2012; Kuehn *et al.*, 2013).

För att odla LAB används ofta MRS-agar. MRS är en förkortning för De Man Rogosa Sharpe agar, ett odlingsmedium för genus *Lactobacilli* med namn efter sina skapare. Agarn togs fram 1960 i brist på en kommersiell agar som främjar växt av LAB. Enligt författarna ska den vara extra bra för kräsna stammar av *Lactobacilli* (de Man *et al.*, 1960) men även växt av andra LAB såsom *Streptococcus* spp, *Pediococcus* spp och *Leuconostoc* spp främjas enligt tillverkare av agarn (Oxoid Limited, 2017a). Idag används agarn för att isolera och räkna *Lactobacillus* spp och andra mesofila mjölksyrabakterier från alla typer av prover. Trots detta är agarn inte så selektiv och andra bakterier kan växa till (Hardy Diagnostics, uå).

MALDI-TOF MS

Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) time-of-flight (TOF) mass spectrometry (MS) är ett instrument som utvecklats för att erhålla en snabb artbestämning av bakterier direkt från renkulturer som odlats fram. Tekniken går ut på att analysera särskilda kännetecken hos bakteriella komponenter genom att beskjuta kolonierna med laserstrålar. Proverna prepareras först med en matrix-blandning som kan absorbera laserenergin vilket leder till defragmentering av bakteriernas proteiner. Fragmenten joniseras och accelereras och i vacuum i en masspektrometer där energin detekteras och flygtiden för jonerna räknas ut. Flygtiden ger en s.k. m/z-kvot som kan översättas till en molekylvikt för respektive prov. Spektrat för respektive prov registreras och analyseras i en mjukvara. Resultatet jämförs mot ett bibliotek med kända bakteriespektra och matchningens relevans värderas av mjukvaran och svaras ut som ett score-värde (Suckau *et al.*, 2003; Seng *et al.*, 2009). Matchning baseras på antalet matchande toppar, dess totalantal och artspecifika vikter samt en korrelationsfaktor som relateras till dess olika intensiteter (Cherkaoui *et al.*, 2010).

Endast en bakterieart kan joniseras och analyseras, med avseende på partikelvikt och laddning, åt gången. Samma bakterie kan dock ge upphov till olika spektra beroende på t.ex. odlingsbetingelser, inkubationstid och provberedning varför det är viktigt att optimera och standardisera dessa för att lyckas identifiera bakterier med hög förtrolighet. Likaså kan val av matrix påverka (Carbonelle *et al.*, 2011). En korrekt identifiering påverkas också av bl.a.

bibliotekets storlek då det förekommer att systemet inte anger något bakteriealternativ för att liknande stammar saknas i databasen (Suckau *et al.*, 2003). Om kontamination av provet har skett kommer score-värdet att sjunka (Buchan *et al.*, 2012).

Tekniken har visats lovande för att korrekt identifiera bakteriearter i flera studier. Seng *et al.* (2009) studerade 1660 stammar (45 släkten, 109 olika arter med 1-347 isolat per art). Över 95% av proverna identifierades korrekt varav 84% var på artnivå och 11% på genusnivå. I 46 fall (2,8%) kunde inte bakterierna identifieras och i 28 fall (1,7%) var identifieringen felaktig trots högt score-värde. I en annan studie identifierades över 97% stammar korrekt varav 92% på artnivå (van Veen *et al.*, 2010). Även svenska laboratorier såsom Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) använder MALDI-TOF MS för att identifiera kolonier som isolerats vid mjölkodling och dess bibliotek möjliggör artbestämning av över 200 bakteriearter (SVA, 2015).

PCR

På senare tid har alltfler DNA-baserade molekylära tekniker utvecklats och använts mer och mer då det ger en bättre uppfattning om diversiteten i ett prov oberoende av föregående odling (Collado *et al.*, 2009). Många tekniker grundar sig på PCR och kan detektera mycket små mängder av bakteriellt DNA i ett prov. Korta startsekvenser av DNA, s.k. primers, väljs ut baserat på vilka bakterier som är av intresse att leta efter och används sedan för att markera vilka sekvenser på DNA-strängarna i provet som ska kopieras av DNA-polymeras genom att fästa in till start- respektive slutplats. Dessa benämns forward primer (F) och reverse primer (R) och initierar amplifiering i två olika riktningar. Sekvenserna kopieras i en temperaturberoende cyklisk process, där en cykel medför fördubbling av antal kopior, tills mängden DNA är tillräckligt stor för att kunna kvantifieras. Cyklisiteten sköts av ett förprogrammerat temperaturprogram i en PCR-maskin. När uppförökningen av DNA/RNA är klar i maskinen kan kopiorna påvisas med hjälp av infärgning med ett fluorescerande färgämne. Resultatet kan sedan åskådliggöras på olika vis, t.ex. genom kurvor i diagram om i qPCR (SVA, 2016), eller på en agarosgel som vid konventionell PCR (Muyzer *et al.*, 1993).

qPCR är en av flera metoder som använts framgångsrikt för att detektera LAB i mjölkprover från bröstmjolk hos kvinnor (Collado *et al.*, 2009) och i komjolk (Koskinen *et al.*, 2010). Tekniken använder sig av standardkurvor för DNA (spädningsserier av DNA med kända koncentrationer) för att mäta startkoncentrationen av DNA-templat i proverna (Higuchi *et al.*, 1993).

DNA extraktion

De flesta molekylära analysmetoder använder sig av föregående extraktion/renande av arvsmassa innan vidare analys, då det minskar riskerna för att kontaminera med substanser som stör testreaktionerna och ökar reproducerbarheten (Hill, 2011). Extraktionen/renandet av DNA är viktigt för att ta bort alternativt neutralisera nedbrytande enzymer eller inhibitoriska substanser. Förfarandet består av tre processer där fler än en kan sammanfogas i ett och samma steg: 1. Lyserande, 2. Denaturering av andra biomolekyler, 3. Separation av nukleinsyran från andra beståndsdelar i provet och/eller koncentrera DNA.

Droplet digital PCR

qPCR har kommit att utmanas av droplet digital PCR (ddPCR) som är en nyutvecklad teknik för absolut kvantifiering av DNA-kopior utan externa standardkurvor (Hindson *et al.*, 2011). Innan DNA-amplifiering delas PCR-volymer upp i små oljedroppar, upp till 20 000 stycken om Bio-Rads system används och DNA-materialet blir således slumpmässigt fördelat på dessa droppar. Efter PCR-reaktionerna avläses DNA-bunden fluorescens från dropparna och fluorescensamplituden/intensiteten plottas i ett diagram för att kunna diskriminera droppar med DNA (positiva) och droppar utan DNA (negativa) (Hindson *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 2012; Porcellato *et al.*, 2016). I mjukvaran QuantaSoft™ (Bio-Rad) finns algoritmer som beräknar tröskelvärden för fluorescensamplituden/intensiteten, men amplituden går även att justera manuellt.

Positiva och negativa droppar räknas till antalet när de passerar igenom en fluorescensdetektor i en droppavläsare men den absoluta kvantifieringen, d.v.s. det initiala antalet målmolekyler som fanns föregående amplifiering, bestäms av Poissonfördelning istället för av standardkurvor. Det är en diskret sannolikhetsfördelning, en funktion som används för att beskriva händelser som inträffar oberoende av varandra (Bio-Rad, uå). Med hjälp av Poissonfördelningen och andelen positiva droppar kan mjukvaran som används räkna ut startkoncentrationen av mål-DNA i proven (antal kopior/ μ l) och multiplicera dessa med den initiala PCR-volymer (20 μ l) för att få absoluta antalet kopior som fanns i PCR-reaktionen från början (Qian *et al.*, 2016).

Porcellato *et al.* (2016) använde ddPCR för att detektera *Bacillus cereus* i mjölk och jämförde metoden med qPCR. De fann att ddPCR var bättre än qPCR på att kvantifiera DNA-material från prover med låga bakterieantal, men sämre på prover med hög förekomst av målmolekyler ($>10^5$) då dessa inte kunde kvantifieras utan föregående spädning p.g.a. mättnad. Qian *et al.*, 2016 jämförde också ddPCR med qPCR men genom att kvantifiera 16S RNA-gener hos *Bifidobacterium* och *Lactobacillus* i bröstmjölk från kvinnor med respektive teknik. Även här visades att ddPCR har högre sensitivitet för att upptäcka låga kvantiteter av mikrobiell arvsmassa i bröstmjölk.

Det finns dock ett antal utmaningar med ddPCR som medför att varje analys bör optimeras för att få så representativa resultat som möjligt. Som tidigare nämnt kan mättnad av ett prov göra att kvantifiering inte är möjligt utan spädning (Porcellato *et al.*, 2016; Qian *et al.*, 2016). Ett problem som framkommit är ofullständig separation/diskriminering mellan positiva och negativa droppar då vissa droppar har "intermediära fluorescens-värden" vilket resulterar i att de inte med säkerhet kan klassas korrekt som positiva eller negativa utan syns som "regn" i 1D-diagrammen. Detta kan ha många orsaker och för att kringgå problemet bör man optimera PCR-programmet med förlängda tider och ökat antal cykler (Witte *et al.*, 2016).

Mastitinduktion med LPS från E.coli

Escherichia coli, en gramnegativ kort stav tillhörande familjen *Enterobacteriaceae*, är en relativt vanlig orsak till akut klinisk mastit i Sverige som oftast drabbar äldre, högproducerande kor i lösdrifter (SVA, 2017). Lokala och systemiska symptom av mer allvarig grad ses främst i tidig laktation och orsakas huvudsakligen av bakteriens endotoxin, lipopolysackarid (LPS). Symptomen kommer ofta snabbt men är kortvariga och innefattar hög feber, påverkat allmäntillstånd, sänkt mjölkproduktion, ömt juver och förändringar i mjölkens sammansättning, pH-värde och konsistens.

I syfte att undersöka förändringar i juvret till följd av *E.coli*-mastit utan att orsaka försöksdjuren onödigt lidande, har en modell för mastit som innebär infusion av LPS endotoxin etablerats. Metoden innebär injektion av LPS intramammärt utan levande *E.coli*-bakterier. Efter injektion aktiverar LPS makrofager i juvret som då producerar cytokiner, t.ex. TNF α och interleukiner, vilka i sin tur rekryterar och påverkar leukocyter till "respiratory burst" och fagocytos (Dosogne, 1998). Det ger i sin tur upphov till både lokala och systemiska symptom vilka kan skilja sig åt beroende på skillnader i produktion och kinetik hos de inflammatoriska mediatorerna (Hoeben *et al.*, 2000).

Endotoxin-modellen har använts i tidigare försök av Hoeben *et al.* (2000), Mehrzad *et al.* (2001), Lehtolainen *et al.* (2003) och Zimov *et al.* (2011) och korna har då svarat snabbt på infusionen. Lehtolainen *et al.* (2003) injicerade 100 μ g lipopolysackarid B från *E. coli* 0111:B4 utspädd i 5 ml sterilt NaCl i en spene vardera hos nio kor med celltal < 150 000 celler/ml. Korna hade delats in slumpmässigt i två grupper där ena gruppen fick infusionen tidigt i laktationen (EL) och den andra gruppen senare i laktationen (LL). Som kontroller användes de kontralaterala juverdelarna på respektive individ. Syftet var att undersöka responsskillnader hos kor i tidig respektive sen laktation med avseende på lokala och systemiska parametrar, daglig mjölmängd, inflammationsmarkörer i blod och mjölk, serumkoncentration av free fatty acids (FFA) och urea, celltal i mjölk, leukocytfunktion, antal neutrofiler i blod och serumkortisol. Samtliga djur uppvisade kliniska tecken på mastit, där de lokala symptomen var av allvarligare grad hos korna i tidig laktation och som störst ca tre-åtta timmar efter infusion. Lokala symptom uppträdde från två timmar efter infusionen medan tidpunkten för uppträdande av systemiska symptom varierade mellan fyra och åtta timmar efter infusionen. Celltal och antalet cirkulerande leukocyter i blodet ökade simultant efter infusionen.

I försöket av Zimov *et al.*, (2011) infuserades tio kor med LPS och tio kor med NaCl. De LPS-infuserade korna fick klinisk mastit som även associerades med förhöjda hjärt- och andningsfrekvenser, rektaltemperaturer, kortisolnivåer och celltal. Dessutom åt de mer sällan, idisslade mindre, hade färre våmkontraktioner och låg ner mer än de 10 kor som infuserats med NaCl.

Bedömning av smärta vid mastit

Många forskare är överens om att mastit är smärtsamt och att djur som lider av sjukdomen har en försämrad välfärd (Leslie *et al.*, 2010). Smärta är dock en subjektiv upplevelse av obehag i någon form som associeras med faktisk eller potentiell vävnadsskada (IASP, 2011) och kor kan dölja smärta vilket ytterligare försvårar smärtbedömningen hos djuren (Fitzpatrick *et al.*, 1998). Vidare kan smärtuttryck vid lindriga och måttliga fall av mastit vara svåra att upptäcka (Fitzpatrick *et al.*, 1998).

Inflammation och smärta ger upphov till neurala, endokrina, hematologiska, immunologiska, metaboliska och beteendeförändringar med syfte att återställa kroppens homeostas (Keyserlingk *et al.*, 2009) som kan nyttjas för att skatta smärta hos kor. Att bedöma smärta hos en ko utifrån fysiologiska parametrar är dock inte alltid användbart då de ofta påverkas av stress hos djuret, är ospecifika och svåra att mäta i fält (Hansen, 1997). Exempel på sådana parametrar, som har associerats med klinisk mastit hos kor, är förhöjda hjärt- och andningsfrekvenser, rektaltemperaturer, kortisolnivåer och celltal (Fitzpatrick *et al.*, 2000). Istället för fysiologiska parametrar kan tre kategorier av beteenden användas som indikatorer på sjukdom och/eller smärta: 1) smärtspecifika beteenden, 2) en förändring av ett särskilt beteende som djuren är väldigt motiverade till att utföra (t.ex. äta) och 3) individuella

preferenser. Mest användbara kategorier för forskningssyften är nummer ett men även nummer två som dock kräver långa observationstider. Exempel på beteenden ur dessa kategorier är minskat intag av grovfoder, minskad vattenkonsumtion, sänkt mjölkproduktion (Weary *et al.*, 2006), minskad social aktivitet, somnolens, förändrat ryktbeteende (Hart, 1988), nedstämdhet (Millman, 2007), förändrat rörelsemönster, vokalisation och kroppshållning (Anil *et al.*, 2005). Även små subtila beteendeförändringar som förändring av ansiktsuttryck har visats vara goda indikatorer på smärta hos bl.a. möss (Leach *et al.*, 2012) och hästar (Gleerup *et al.*, 2015b).

I en dansk-svensk studie (Gleerup *et al.*, 2015a) studerades smärtspecifika beteenden hos lakterande mjölkkor utan diagnos och som kalvat för minst två veckor sedan, i syfte att kombineras i ett praktiskt användbart protokoll där olika beteenden kopplade till smärta poängsätts. Systemet kom att kallas Cow Pain Scale, där sex bedömningskriterier kan ge 0, 1 eller 2 poäng (tabell 2) och avses användas i kommersiella mjölkkobesättningar som ett verktyg för att kontrollera smärta i en besättning och eventuellt för uppföljning av smärtlindringseffekter hos djur som medicineras. Bedömningsskalan är viktad och kan ge maximalt 10 poäng, en totalpoäng ≥ 3 tyder på att kon är smärtpåverkad.

Tabell 2. Bedömningskriterier för smärta i Cow Pain Scale från Gleerup *et al.* (2015a)

Poäng	0	1	2
Uppmärksamhet mot omgivningen	Aktiv och uppmärksam. Kon är aktiv; äter, idisslar, ryktar sig. Kon är eller söker uppmärksam(het) på/från sin omgivning	Lugn, introvert Kon är inte aktiv, undviker ögonkontakt, flyttar sig från observatören	Ej möjlig poäng
Huvudposition	Huvud över eller i höjd med skuldror Kon är aktiv, äter, idisslar eller söker kontakt/är nyfiken	Huvud i höjd med skuldror Kon är inte aktiv. Äter, idisslar, ryktar sig eller sover inte.	Huvud lägre än skuldror Kon är inte aktiv. Äter, idisslar, ryktar sig eller sover inte. Läger sig snart efter resning
Öronposition	Båda öron framåt alternativt ett öra framåt eller bakåt och det andra örat lyssnar	Båda öron bakåt alternativt båda öronen rör sig åt olika håll	"Lammöron" Båda öron är riktade åt sidorna och lägre än normalt. Öronen sluttar neråt
Ansiktsuttryck	Uppmärksam/neutral Kon är uppmärksam eller fokuserad på en uppgift t.ex. idissla, äta eller sova	Spänt ansiktsuttryck/ ansträngt utseende Kon har ett oroligt eller ansträngt utseende, rynka över näsborrar	Ej möjlig poäng
Respons på närmande	Tittar på observatören, håller huvudet upp, har öronen framåt eller är upptagen med aktivitet (äta, idissla)	Tittar på observatören, öronen är inte riktade framåt, backar vid närmande	Tittar eller tittar inte på observatören, öronen är inte riktade framåt, backar eventuellt långsamt
Ryggsposition	Normal	Lätt krökt rygg	Krökt rygg

MATERIAL OCH METODER

Litteraturöversikt

Information till litteraturöversikten är inhämtad från vetenskapliga artiklar erhållna efter sökning i databaserna Pubmed och Web of Science, i SLU-bibliotekets söktjänst Primo och i referenslistorna till nedladdade artiklar med liknande ämne. Sökord som har använts och kombinerats, både på svenska och engelska, är mjölksyra(producerande) bakterier,

lactobaciller, (mjölk)ko, mjölk, mastit, mikrobiota, diversitet, probiotika, antibiotika, odling, MRS-agar, MALDI-TOF MS, identifiering bakterier, PCR, ddPCR, *Escherichia coli*, endotoxin, LPS, cow pain scale och DNA extraktion. Vissa artiklar har tagits emot direkt från handledare.

Försöksupplägg

Studien ingår i ett pågående flerårigt forskningsprojekt vid Institutionen för husdjurens utfordring och vård (HUV) på Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU) som syftar till att undersöka hur mjölkens mikrobiota ändras i samband med mastit. Proverna som analyseras i denna studie används också inom ramen för försöket "Rollen av mastceller i bovin mastit" (avhandlas ej här) vid Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF). Försöket genomfördes på Nationellt forskningscentrum för lantbrukets djur, Lövsta forskningscentrum, tillhörande SLU under en period på 20 dagar (mellan 3 och 23 maj 2017) med nio dagar avsatta för mjölkprovtagning. På forskningsanläggningen går korna som ingår i detta försök normalt sett i varm lösdrift inomhus och mjölkas i automatisk mjölkningsskarusell (DeLaval AMR™, "Automatic Milking Rotary") två gånger om dagen. Djuren stod uppbundna på gummimattor och spån fr.o.m. dagen innan infusion för att underlätta upprepade provtagningar och kunna ge dem extra tillsyn eftersom feber och nedsatt allmäntillstånd förväntades efter LPS-infusionen. Under tiden de stod uppbundna mjölkades de på heljuvernivå med mjölkningssmaskin två gånger per dag och hade fri tillgång till grovfoder och vatten dygnet runt medan kraftfoder utfodrades manuellt i relation till den individuella mjölkavkastningen. Korna återgick till lösdriften när deras allmäntillstånd återigen var opåverkat.

Försöket var godkänt av Uppsala Djurförsöksetiska Nämnd (diarienummer C 102215/15).

Inklusionskriterier för kor i försöket

Tio dräktiga kor i sin första laktation, varav fem stycken av svensk låglandsboskap (SLB) och fem stycken av svensk röd boskap (SRB), valdes ut baserat på uppgifter om juverhälsa (celltal, SCC) och juverhälsoklass från Kokontrollen de senaste tre månaderna och ett medeltal för samma egenskaper 12 månader tillbaka. Urvalskriteriet var god juverhälsa med ett celltal på <100 000 celler/ml på konivå de tre senaste provmjölkningarna. Fem av dessa kor blev genom lottning slumpmässigt uttagna för infusion med LPS från *E. coli* och fem för infusion med NaCl (kontrollkor) i en spene vardera. Två nervösa kor valdes ut till kontroller, dels av säkerhetsskäl då en LPS-infusion skulle riskera att dessa djur blev än mer svårhanterade på grund av smärta i juvret och därmed svåra att ta mjölkprov ifrån, dels med hänsyn till risken att erhålla resultat som påverkats av rädsla/nervositet hos djuren. Urval av spenar för infusion baserades på resultat från mjölkprovtagningar innan infusion (se "Provtagningsschema och screening").

Provtagningsschema och screening

Mjölkprover togs från de tio korna vid totalt tolv olika tidpunkter – fyra tillfällen innan infusion och åtta tillfällen efter infusion. Mjölkproverna togs av en och samma person vid alla tillfällen. Inför varje provtagning tvättades spenen, tre strålar mjölkades ur och spenen desinficerades. Därefter togs 25 ml mjölk ut för prov och spenen spensprayades.

Innan infusionsdagen togs mjölkprover från samtliga spenar på de tio utvalda korna vid tre tillfällen med start 6 dagar (d) innan infusion (i-) för att undersöka celltal och bakterieväxt. Detta gjordes i syfte att välja ut en juverdel per ko som skulle ingå i försöket, det vill säga en spene

per ko som skulle infuseras slumpmässigt med antingen LPS eller NaCl. För att mäta celltal i mjölk användes en CombiScope FTIR från DeltaInstruments, Holland. Den juverdel per ko vars mjölk hade det mest stabila celltalet under de tre screeningstillfällena (i-6d, i-4d och i-2d) och genererade ingen/låggradig bakterieväxt på odlingar som satts vid två av tre screeningsdagar, valdes ut för infusion. En dag innan infusion (i-1d) flyttades korna, som tidigare nämnt, till ett uppbundet stall på forskningsanläggningen.

På infusionsdagen togs ett mjölkprov från vardera utvald spene innan infusion (-0 timmar (h)). Därefter injicerades de tio utvalda spenarna på de tio korna slumpmässigt med antingen 100 µg LPS i 10 ml NaCl ("LPS-infuserade kor") eller enbart 10 ml NaCl ("kontrollkor"). Utvalda tidpunkter för mjölkprovtagning samma dag och efterföljande två veckor redovisas i tabell 4.

Bedömningar som gjordes i samband med mjölkprovtagning

I samband med de provtagningstidpunkter som följde efter infusionen skattades kliniska tecken på inflammation och smärtpåverkan. Kroppstemperaturen uppmättes rektalt med en digital termometer utan glidslem. Symptomen på inflammation (svullnad, värme, rodnad, smärta i juvret och förändrat mjölkutseende) graderades utefter en fyrgradig skala, där 0 = inga symptom, 1 = lindriga symptom, 2 = måttliga symptom och 3 = kraftiga symptom. Smärtpåverkan bedömdes enligt Cow Pain Scale (Gleerup *et al.*, 2015a).

Sammanställt schema över tidpunkter för provtagningar och bedömningar

En sammanställning över de utvalda tidpunkterna för provtagning av mjölk, kroppstemperatur och vilka bedömningar som gjordes vid de olika tidpunkterna redovisas i tabell 3.

Tabell 3. Utvalda tidpunkter för provtagningar och bedömningar. *Antal kontrollkor som provtogs = 4, provtagning av kroppstemperatur utgår för ko-ID 529 (kontrollko).

Tidpunkt→ Provtagning/bedömning↓	i -6d	i -4d	i -2d	i -0h	i +1h	i +2h	i +4h	i +5h	i +6h	i +7h	i +9h	i +10h	i +24h	i +3d	i +5d	i +7d	i +14d
Mjölkprov	x	x	x	x	x	x	x						x	x	x	x	x
Celltal	x	x	x	x	x	x	x						x	x	x	x	x
Kroppstemperatur*				x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Inflammation				x	x	x	x						x	x	x	x	
Smärtpåverkan				x	x	x	x	x	x	x							

Samtliga mjölkprover förvarades i kylväska med is fram tills provtagningarna var färdiga för dagen. Därefter överfördes mjölken till mikrorör vilka förvarades i kyl i väntan på transport från Lövsta till SVA och HUV för vidare bakteriologisk odling och förvaring i -80°C.

Bakteriologisk undersökning

Odling

Mjölkproverna odlades på hästblodagarplattor med eskulin och MRS-agarplattor. Även en anrikning i MRS-buljong gjordes innan en ny strykning på MRS-agar.

10 µl mjölk ströks ut på hästblodagarplattor som inkuberades aerobt i 37°C för avläsning efter 24 och 48 timmar. Vid avläsning noterades växt och kolonier (antalet kolonier, antalet olika typer av kolonier och antalet kolonier av varje typ) och växten graderades i efterhand 0-3 (0= ingen växt, 1= växt av 1-2 cfu, 2= växt av 3-10 cfu och 3 = växt av >10 cfu). Vid signifikant växt av bakterier (>3 kolonier från 10 µl mjölk) efter 24 eller 48 h skickades plattan till mastitlaboratoriet på SVA för avläsning och typning.

MRS-agarplattor strukna med 100µl mjölk och MRS-anrikningsrör med 900 µl MRS-buljong blandad med 900 µl mjölk inkuberades i anaerobklocka med aktiverad påse för anaerob miljö i 37°C i 2 dygn. Dag 2 lästes MRS-agarplattorna och plattor med växt sparades. Från anrikningsrören med MRS-buljong pipetterades 100 µl mjölk till MRS-agarplatta för att inkuberas anaerobt i 37°C i ytterligare 2 dagar. Dag 4 skedde slutavläsning av samtliga MRS-plattor och renodling av kolonier på hästblodagar. I de fall det fanns kolonier på MRS-platta från dag 2 men inte från MRS-platta dag 4 renströks kolonin från MRS-platta dag 2. Renstrykta hästblodagarplattor inkuberades anaerobt i 37°C i 2 dygn. Efter 2 dygn överfördes hälften av alla kolonier till 0,5 ml frysbuljong (serumbuljong med 15% glycerol) och andra hälften till 1 ml 70% odenaturerad alkohol (etOH). Rör med sparade kolonier förvarades i frys -20°C för framtida artbestämning med MALDI-TOF MS (etOH) eller framodling (frysbuljong).

MALDI-TOF MS

Etanolsparade kolonier centrifugerades i 11 000 G i 2 minuter. Etanolen pipetterades av från eppendorfrören och bakteriepelleten fick lufttorka. Därefter lades bakteriepelleten på MALDI-TOF MS-provplattorna i duplikat på respektive markerad provplats med hjälp av tandpetare. En µl 70%:ig myrsyra adderades för att lysera de hårda cellväggarna som finns hos LAB och tilläts torka in i rumstemperatur innan 1 µl matrix bestående av α-cyano-4-hydroxikanelnsyra (HCCA) tillsattes. När även matrix torkat in, kördes plattan i MALDI-TOF MS-instrumentet och spektrat för respektive isolat jämfördes gentemot spektrat för ca 2500 bakterier i referensbiblioteket MBT 7311 MSP Library av mjukvaran MBT Compass, Revision D Flex Control (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany).

Matchning mellan bakterieisolaten i proverna och referensbiblioteket uttrycktes av BioTyper med hjälp av "log(score)" och en tillhörande färg (grön, gul eller röd). Logscore > 2,0 (grön) betecknad "high-confidence identification" av mjukvaran kan översättas till tillförlitlig identifikation av prov. Logscore 1,70-1,9 (gul), "low-confidence identification", indikerar en mindre tillförlitlig identifikation. Värden <1,69 (röd), "no organism identification possible" eller "no peaks found" innebär att provet inte kunde identifieras och matchas mot något ur referensbiblioteket respektive att instrumentet inte hittar provmaterial. Programmet väljer också ut en "best match" respektive "second best match".

Prover som inte kunde identifieras alternativt hade låga-medel score-värden eller duplikat som inte gav samma resultat när etanolsparade kolonier analyserades med MALDI-TOF MS (totalt 32 prover), odlades upp på nytt på hästblodagar från de nedfrysta mjölkprovsvörerna. Plattorna inkuberades aerobt i 37°C i 24-48 timmar innan de färska kolonierna användes direkt på MALDI-TOF MS-plattan.

DNA extraktion

Kittet som användes för extraktion och rening i denna studie kommer från Qiagen (DNeasy® PowerFood® Microbial Kit, GTINr 04053228029656, LOTnr 157017245 från Qiagen i Tyskland). Cell-lysering var direkt kopplat till rening. DNA från alla mjölkprov från valda spenar (10st) från samtliga provtillfällen (12st) isolerades, vilket innebar totalt 120 mjölkprover. Tillverkarnas protokoll efterföljdes men med viss modifikation. Mjölkproverna, som förvarats i frys -80°C, tinades i rumstemperatur inför varje körning och mjölk som återstod i rören sparades i frys igen. 1 ml mjölk från provrören centrifugerades och supernatanten avlägsnades enligt instruktionerna medan fettlager och cellpellet lämnades kvar i röret och löstes upp i MBL-lösning. Lösningen som överfördes till MicroBead-rör placerades i en Precelly24 (6500 rpm i 2x45 sek med 60 sek paus emellan) för att mekaniskt lysera bakteriernas cellväggar. Efter lyseringen centrifugerades proverna i 13,000xg i 1 minut och fettlagret kastades i samband med att supernatanten överfördes till rena 2 ml-rör. Slutligen eluerades DNA från spinnkolumnen med 50 µl vatten, elueringen upprepades två gånger med samma vätska för att öka DNA-koncentrationen i den slutgiltiga lösningen. Det extraherade DNA:t sparades i frys i -20°C.

Negativa extraktionskontroller

För att kontrollera kontamination mellan prover och av extraktionsreagenser under preparation och extraktion, kördes för varje extraktionsserie med mjölkprover en negativ extraktionskontroll med DNA-fritt H₂O istället för mjölk.

Positiva extraktionskontroller

För att utvärdera hur en definierad bakteriekultur skulle kunna påverkas i sin komposition av extraktionsmomentet (kontamination m.m.) användes en s.k. "mock community" att skapa positiva extraktionskontroller. På så vis finns möjlighet att upptäcka steg i extraktionsmomentet där kontaminationsrisker föreligger. För hela batchnumret analyserades två positiva extraktionskontroller (10^3 respektive 10^7 celler/ml) och även en negativ kontroll för denna extraktionsserie med ddPCR.

Fem olika bakteriestammar, vanligt förekommande i mjölk och med kända koncentrationer, nämligen *E. coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* (Kleb) CCUG 225T/ATCC13883, *Streptococcus dysgalactiae* (Str d) CUG 39323, *Staphylococcus aureus* PC- (SA) ATCC 25923 och *Trueperella pyogenes* (TP) CCUG 39326 späddes med 0,9% NaCl var för sig till nya koncentrationer. Därefter gjordes en blandning för att skapa ett "mock community" där varje bakterieart förekom i lika stor koncentration. Från det nytillverkade "mock community" gjordes en spädningsserie för att erhålla en "mock community" med lägre koncentrationer av varje bakterieart (celler/ml) med tre olika exponenter (10^7 , 10^5 samt 10^3). I mock community 10^7 ingår således 10 000 000 bakterieceller av varje bakterieart. Även spädningar med 1×10^6 och 1×10^4 celler/ml gjordes i serien men kastades efter att all spädning var färdig. Spädningarna gjordes i duplikat och därför erhöles totalt 6 positiva extraktionskontroller (tabell 4).

Tabell 4. Skapandet av tre mock community med olika koncentrationer av en blandning med kända bakteriestammar (10^7 , 10^5 respektive 10^3 celler/ml).

Bakterie	Startkoncentration (celler/ml)	Spädning för mock community tillverkning	V (µl) för 1×10^7 celler	1/10 spädningar för mock community 10^7 , 10^5 och 10^3 celler/ml		
E coli	$6,1 \times 10^8$	1/10	160	1×10^7	1×10^5	1×10^3
Kleb	$6,2 \times 10^8$	1/10	160	1×10^7	1×10^5	1×10^3
Str d	$1,8 \times 10^8$	1/5	270	1×10^7	1×10^5	1×10^3
SA	$4,75 \times 10^8$	1/10	210	1×10^7	1×10^5	1×10^3
TP	$6,8 \times 10^7$	1/1	140	1×10^7	1×10^5	1×10^3
			addera H ₂ O upp till 1 ml			

ddPCR

För att kvantifiera mängden LAB i proverna med extraherat DNA användes en LAB-specifik region på 16S rRNA-genen i en ddPCR-analys med en Automated Droplet Generator och en QX200 Droplet Reader och QuantaSoft Software version 1:7:4 (Bio-Rad, Munich, Tyskland). Sekvensen på 16S rRNA-genen som valdes för amplifiering var ca 350 baspar (bp) långt. Mastermix och inställningar för PCR-programmet är gjorda efter instruktioner från Bio-Rad.

Till en brunn på en 96-hålsplatta tillsattes 20 µl PCR-reaktion bestående av 15 µl MasterMix och 5 µl DNA-templat från mjölkprov. Samma blandning användes även för negativa respektive och positiva extraktionskontroller. Mastermixen blandades och vortexades noga inför varje körning och bestod av 10 µl QX200 ddPCR EvaGreen Supermix, 0,4 µl forward primer Lac1F (5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3') av koncentrationen 10 µM, 0,4 µl reverse primer LAB677-R (5'-CACCGCTACACATGGAG-3') av koncentrationen 10 µM och 4,2 µl DNA-fritt H₂O. Proverna från en respektive två timmar efter infusion (i +1h och i +2h) analyserades inte då dessa ansågs mindre relevanta för frågeställningen. För varje PCR-körning skapades även en negativ amplifieringskontroll (PCR(-)) per kolumn av brunnar för att kontrollera kontamination av reagenser och ospecificitet i amplifiering, bestående av 15 µl MasterMix och 5 µl DNA-fritt vatten. För varje körning skapades också en positiv amplifieringskontroll (PCR(+)) för att kontrollera amplifieringsreagensernas funktion. Den bestod av 15µl MasterMix och 5 µl av 10 ng känd bakterielösning innehållande bl.a. 12% *Lactobacillus* spp, spädd 1:100 (ZymoBIOMICS Microbial community standard).

Dropparna genererades i Automated Droplet Generator med EvaGreen-olja. När dropparna var färdiga förslöts plattan med plastfilm som smälte fast i en "sealer" innan den placerades i PCR-maskinen (Bio-Rad MyCycler Thermal cycler) för amplifiering av DNA i samtliga brunnar. Valet av det PCR-program som efter en del utvärdering (se senare) slutligen användes illustreras i tabell 5.

Tabell 5. PCR-program som används i denna studie.

Steg	Temperatur (°C)	Tid	Ramphastighet	Antal cykler
1. Enzymatisk aktivering	95	5 min	2°C/sek	1

2. Denaturering	95	30 sek		40
3. "Annealing/extension"	63	90 sek		40
4. "Signal stabilization"	4	5 min		1
	90	5 min		1
5. "Hold"	4	Oändlig		1

I denna studie användes EvaGreen som fluorofoer för att färga in DNA. Efter PCR-körningen avlästes dropparnas fluorescence i Droplet reader och analyserades av mjukvaran Quantasoft. För varje droppe mättes fluorescensamplituden/intensiteten och plottades i ett diagram. Datan från droppsignalerna avseende antal genererade droppar, antal positiva respektive negativa droppar, tröskelvärden, och provens startkoncentrationer av mål-DNA i kopior/ μ l uträknade av mjukvaran exporterades som csv-filer (Excel) och användes för att sammanställa till ett resultat.

Bakgrund till val av metoder för optimerad analys

Valet av PCR-program och tröskelvärde för fluorescensamplituden i QuantaSoft baserades på ett resultat med så täta kluster av negativa droppar som möjligt, eftersom vi med provernas koncentrationer inte lyckades skapa täta kluster för både positiva och negativa droppar trots flera försök. För att komma fram till det optimala PCR-programmet, kördes några testomgångar med olika inställningar gällande antalet cykler, temperaturer och tider. I ett test undersöktes effekten av att öka antalet cykler i steg 2 och 3 från 40 till 50 stycken, men ingen större skillnad i antal genererade droppar och positiva droppar kunde ses (resultat redovisas ej här). Att öka antalet cykler kan dessutom öka risken för bl.a. primer-dimer och ospecifik produkt (Qiagen, uå), varför beslut om att använda 40 cykler i detta PCR-program togs. I samma försök förlängdes även tiden för "annealing/extension" från 60 sekunder till 120 sekunder och ramphastigheten minskades från 2°C/sekund till 1,5°C/sekund, men inte heller detta gav någon synlig förbättring i form av större och jämnare amplitud på de positiva dropparna.

I syfte att hitta den optimala annealingtemperaturen, kördes en PCR-gradient med olika temperaturer (65, 64,3, 63,2, 61,4, 59,3, 57,7, 56,6 och 56°C) på material från ett och samma mjölkprov. I ddPCR QuantaSoft visade sig 63,2°C ge tätast kluster av negativa droppar och mindre "regn" av positiva droppar än övriga temperaturer (resultat redovisas ej här), varför denna temperatur kom att användas i programmet för samtliga mjölkprover och kontroller. Då ddPCR-resultatet från alla prover inte gav ett sammantaget förväntat och enhetligt resultat, testades samma temperaturer på ett prov med känd koncentration av *Lactobacillus* spp, återigen och visualiserades med gelelektrofores (konventionell PCR). Starkast PCR-produkt genererades då vid 57,5 °C. PCR-produkten vid 63,2°C var svagare men bedömdes starkt och tydligt nog för att kunna ge bra resultat i ddPCR.

Val av primers

För att detektera mjölksyrabakterier valdes här ett primerpar med specificitet primärt för genus *Lactobacillus* med en amplikonstorlek på 341 baspar. Vilka arter detta inkluderar samt vilka övriga genus som plockas upp, däribland några andra LAB-arter från släktena *Pediococcus* spp och *Weisella* spp, redovisas i tabell 6. De digitala databaserna Primer-BLAST och SILVA

har använts för att söka efter vilka bakteriearter som primerparet riktas mot. Samma primerpar har tidigare använts av Rinttilä et al. (2004) i syfte att kvantifiera mjölksyrabakterier i avföring från människor. Bakom utvecklingen av primer F (5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3') står Walter et al. (2001) och för primer R (5'-CACCGCTACACATGGAG-3') står Heilig et al. (2002). Författarnas rekommenderade annealingtemperatur för primerparet (58°C) har inte använts i denna studie. Istället har temperaturen, som tidigare beskrivits, anpassats efter resultatet i ddPCR QuantaSoft och 63°C valdes.

Tabell 6. Bakteriearter som plockas upp av det valda primerparet enligt databaserna Primer-BLAST och SILVA

Bakteriegenus (amplikonstorlek)	Bakteriearter
<i>Lactobacillus</i> spp (341 bp)	<i>Lactobacillus acetotolerans</i> , <i>L. acidipiscis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. agilis</i> , <i>L. algidus</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>L. amyolyticus</i> , <i>L. amylophilus</i> , <i>L. amylovorus</i> , <i>L. animalis</i> , <i>L. antri</i> , <i>L. apinorum</i> , <i>L. apis</i> , <i>L. aquaticus</i> , <i>L. aviarius</i> , <i>L. backii</i> , <i>L. bifermentans</i> , <i>L. bombicola</i> , <i>L. brantae</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. cacaonum</i> , <i>L. camelliae</i> , <i>L. capillatus</i> , <i>L. coleohominis</i> , <i>L. collinoides</i> , <i>L. concavus</i> , <i>L. coryniformis</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. crustorum</i> , <i>L. curieae</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. dextrinicus</i> , <i>L. diolivorans</i> , <i>L. equi</i> , <i>L. equicursoris</i> , <i>L. equigenerosi</i> , <i>L. fabifermentans</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. farraginis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. floricola</i> , <i>L. florum</i> , <i>L. frumenti</i> , <i>L. fuchuensis</i> , <i>L. gallinarum</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. gastricus</i> , <i>L. ghanensis</i> , <i>L. gigeriorum</i> , <i>L. ginsenosidimutans</i> , <i>L. graminis</i> , <i>L. hamsteri</i> , <i>L. harbinensis</i> , <i>L. hayakitensis</i> , <i>L. heilongjiangensis</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. herbarum</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>L. hokkaidonensis</i> , <i>L. hominis</i> , <i>L. hordei</i> , <i>L. iners</i> , <i>L. ingluviei</i> , <i>L. intestinalis</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L. kalixensis</i> , <i>L. kefiranofermentans</i> , <i>L. kimchicus</i> , <i>L. kimchiensis</i> , <i>L. koreensis</i> , <i>L. kullabergensis</i> , <i>L. kunkeei</i> , <i>L. lindneri</i> , <i>L. mellis</i> , <i>L. mindensis</i> , <i>L. mucosae</i> , <i>L. nagelii</i> , <i>L. nasuensis</i> , <i>L. nodensis</i> , <i>L. odoratitofui</i> , <i>L. oeni</i> , <i>L. oligofermentans</i> , <i>L. ozensis</i> , <i>L. pantheris</i> , <i>L. parabuchneri</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. paracollinoides</i> , <i>L. parafarraginis</i> , <i>L. paralimentarius</i> , <i>L. pasteurii</i> , <i>L. paucivorans</i> , <i>L. perolens</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. pobuzihii</i> , <i>L. pontis</i> , <i>L. psittaci</i> , <i>L. rapi</i> , <i>L. rennini</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. ruminis</i> , <i>L. saerimneri</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. saniviri</i> , <i>L. satsumensis</i> , <i>L. secaliphilus</i> , <i>L. selangorensis</i> , <i>L. senioris</i> , <i>L. senmaizukei</i> , <i>L. sharpeae</i> , <i>L. shenzhenensis</i> , <i>L. silagei</i> , <i>L. siliginis</i> , <i>L. similis</i> , <i>L. spicheri</i> , <i>L. sucicola</i> , <i>L. suebicus</i> , <i>L. thailandensis</i> , <i>L. tucetii</i> , <i>L. uvarum</i> , <i>L. vaccinostercus</i> , <i>L. vaginalis</i> , <i>L. wasatchensis</i> , <i>L. versmoldensis</i> , <i>L. vini</i> , <i>L. xiangfangensis</i> och <i>L. zymae</i>
<i>Pediococcus</i> spp	<i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>P. argentinus</i> , <i>P. cellicola</i> , <i>P. clausenii</i> , <i>P. damnosus</i> , <i>P. ethanolidurans</i> , <i>P. inopinatus</i> , <i>P. pentosaceus</i> och <i>P. stilesii</i>
<i>Weissella</i> spp	<i>Weissella ceti</i> , <i>W. cibaria</i> , <i>W. jogaejeotgali</i> , <i>W. kandleri</i> , <i>W. koreensis</i> , <i>W. minor</i> , <i>W. oryzae</i> , <i>W. paramesenteroides</i> och <i>W. viridescens</i>
Övriga	<i>Abiotrophia defectiva</i> , <i>Aerococcus christensenii</i> , <i>A. sanguinicola</i> , <i>A. urinae</i> , <i>A. urinaehominis</i> , <i>A. viridans</i> , <i>Alicyclobacillus kakegawensis</i> , <i>A. macrosporangioides</i> , <i>A. mali</i> , <i>Alkalibacterium gilvum</i> , <i>A. pelagium</i> , <i>A. subtropicum</i> , <i>Allofustis seminis</i> , <i>Alloiococcus otitis</i> , <i>Anaerobacillus alkalilacustris</i> , <i>A. arseniciselenatis</i> , <i>A. tyrosinisolvens</i> , <i>Anoxybacillus amyolyticus</i> , <i>A. gonensis</i> , <i>Atopostipes suicloacalis</i> , <i>Bacillus andreae</i> , <i>B. bataviensis</i> , <i>B. cecembensis</i> , <i>B. cohnii</i> , <i>B. dielmoensis</i> , <i>B. drementensis</i> , <i>B. eiseniae</i> , <i>B. fastidiosus</i> , <i>B. fumarioli</i> , <i>B. glycinifermentans</i> , <i>B. halmopalus</i> , <i>B. hemicellulosilyticus</i> , <i>B. horikoshii</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. jeddahensis</i> , <i>B. ligniniphilus</i> , <i>B. manliponensis</i> , <i>B. massiliobacter</i> , <i>B. mesonae</i> , <i>B. ndiopicus</i> , <i>B. novalis</i> , <i>B. oceanisediminis</i> , <i>B. psychrosaccharolyticus</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. rubiinfantis</i> , <i>B. shackletonii</i> , <i>B. simplex</i> , <i>B. smithii</i> , <i>B. solani</i> , <i>B. soli</i> , <i>B. sp.</i> , <i>B. testis</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. tuaregi</i> , <i>B. vireti</i> , <i>Bhargavaea cecembensis</i> , <i>Carnobacterium alterfunditum</i> , <i>C. divergens</i> , <i>C. funditum</i> , <i>C. gallinarum</i> , <i>C. inhibens</i> , <i>C. maltaromaticum</i> , <i>C. mobile</i> , <i>C. pleistocenium</i> , <i>Caryophanon latum</i> , <i>C. tenue</i> , <i>Cohnella kolymensis</i> , <i>C. panacarvi</i> , <i>Dolosigranulum pigrum</i> , <i>Edaphobacillus lindanitolerans</i> , <i>Eremococcus coleocola</i> , <i>Exiguobacterium aurantiacum</i> , <i>E. sibiricum</i> , <i>Fructobacillus fructosus</i> , <i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> , <i>Globicatella sulfidifaciens</i> , <i>Gracilibacillus timonensis</i> , <i>Halobacillus salinus</i> , <i>Jeotgalibacillus campisalis</i> , <i>J. halophilus</i> , <i>J. psychrophilus</i> , <i>Kurthia huakuii</i> , <i>K. massiliensis</i> , <i>K. senegalensis</i> , <i>Lysinibacillus fusiformis</i> , <i>L. macroides</i> , <i>L. sphaericus</i> , <i>Marinilactibacillus piezotolerans</i> , <i>Megasphaera cerevisiae</i> , <i>Nosocomiicoccus massiliensis</i> , <i>Oceanobacillus jeddahense</i> , <i>O. picturae</i> , <i>Paenibacillus antibiotrophicus</i> , <i>P. barengoltzii</i> , <i>P. glucanolyticus</i> , <i>P. herberti</i> , <i>P. ihumii</i> , <i>P. macerans</i> , <i>P. naphthalenovorans</i> , <i>P. polymyxa</i> , <i>P. rhizosphaerae</i> , <i>P. sp.</i> , <i>P. swuensis</i> , <i>P. tuaregi</i> , <i>P. wynnii</i> , <i>P. yonginensis</i> , <i>Paenisporosarcina indica</i> , <i>Planococcus kocurii</i> , <i>P. rifetoensis</i> , <i>Pontibacillus litoralis</i> , <i>P. yanchengensis</i> , <i>Rummeliibacillus stabekisii</i> , <i>Saccharibacillus sacchari</i> , <i>Salimicrobium flavidum</i> , <i>Salinibacillus kushneri</i> , <i>Salinicoccus carniancri</i> , <i>S. halodurans</i> , <i>Solibacillus silvestris</i> , <i>Sporolactobacillus laevolacticus</i> , <i>S. nakayamae</i> , <i>S. terrae</i> , <i>Sporosarcina koreensis</i> , <i>S.</i>

	<i>newyorkensis</i> , <i>S. psychrophila</i> , <i>S. ureae</i> , <i>Staphylococcus capitis</i> , <i>S. equorum</i> , <i>S. lentus</i> , <i>S. pettenkoferi</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. succinus</i> , <i>S. vitulinus</i> , <i>Virgibacillus alimentarius</i> , <i>V. pantothenicus</i> , <i>Viridibacillus arvi</i> , <i>Xenorhabdus cabanillasii</i>
--	--

Statistik

Deskriptiva sammanställningar av insamlad data för klinisk respons på LPS (kroppstemperatur, inflammationsskattning, celltal, smärtsymptom), odling och ddPCR genomfördes med hjälp av Microsoft Excel. Separata diagram har skapats för LPS-infuserade kor respektive kontrollkor, i syfte att illustrera hur värdena för respektive utkomstvariabel förändras över tiden hos de olika individerna. För kontinuerliga variabler med delvis normalfördelad data (celltal, kroppstemperatur och ddPCR-koncentration) räknades medelvärden ut och för kategoriska variabler med ej normalfördelad data (inflammationsskattning, smärtbedömning) räknades medianvärden ut. Dessa medel- och medianvärden logaritmerades ($\log_{10}$) för att kunna åskådliggöras tillsammans i ett diagram för LPS-infuserade kor och ett diagram för kontrollkor.

För att se om det finns någon statistisk signifikans i skillnad mellan de två behandlingsgrupperna inom respektive responsvariabel, har de tidpunkter då misstanke om att en signifikant skillnad föreligger analyserats. Eftersom variationen i celltal är stor logaritmerades dessa innan statistisk bearbetning ($\log_{10}$). Normalfördelad data har analyserats med t-test och icke normalfördelad data har analyserats med Mann-Whitney. Alla statistiska analyser genomfördes med hjälp av statistikprogrammen MiniTab® 18 och Past 3.17.

Bakteriefynd som erhållits från MALDI-TOF MS har sammanställts i en tabell med samtliga kor och en tidslinje. Resultatet har dock inte bearbetats statistiskt, dels eftersom ingen antydning till korrelation mellan bakteriefynd, behandlingsgrupp och tidpunkt i förhållande till infusion kunde ses och dels p.g.a. för få antal identifierade prover. Även koncentrationsdata från ddPCR har sammanställts i en tabell med samtliga kor och en tidslinje, men har inte heller analyserats statistiskt eftersom resultaten inte var trovärdiga och inte korrelerade med vad som förväntades.

Eftersom ko-materialet för studien var begränsat till totalt tio djur och delar av datan ej varken var tillförlitlig eller normalfördelad, bedömdes det inte finnas någon relevans i att utföra några korrelationsanalyser. Om en liknande studie hade genomförts med ett betydligt större antal djur och data varit normalfördelad hade t.ex. utkomstvariablerna temperatur, inflammation, celltal och smärtsymptom kunnat analyseras som kontinuerliga i en mixad linjär modell.

RESULTAT

Med syfte att besvara studiens frågeställning redovisas endast resultat från mjölkprover som tagits från valda spenar. Totalt togs 120 mjölkprover från valda spenar före, samma dag som och efter infusion. Alla prover undersöktes avseende celltal och bakteriologi genom odling och då indikerat, med MALDI-TOF MS. Alla prover utom de från en respektive två timmar efter infusion (i+1h, i+2h) analyserades avseende koncentration av LAB med ddPCR.

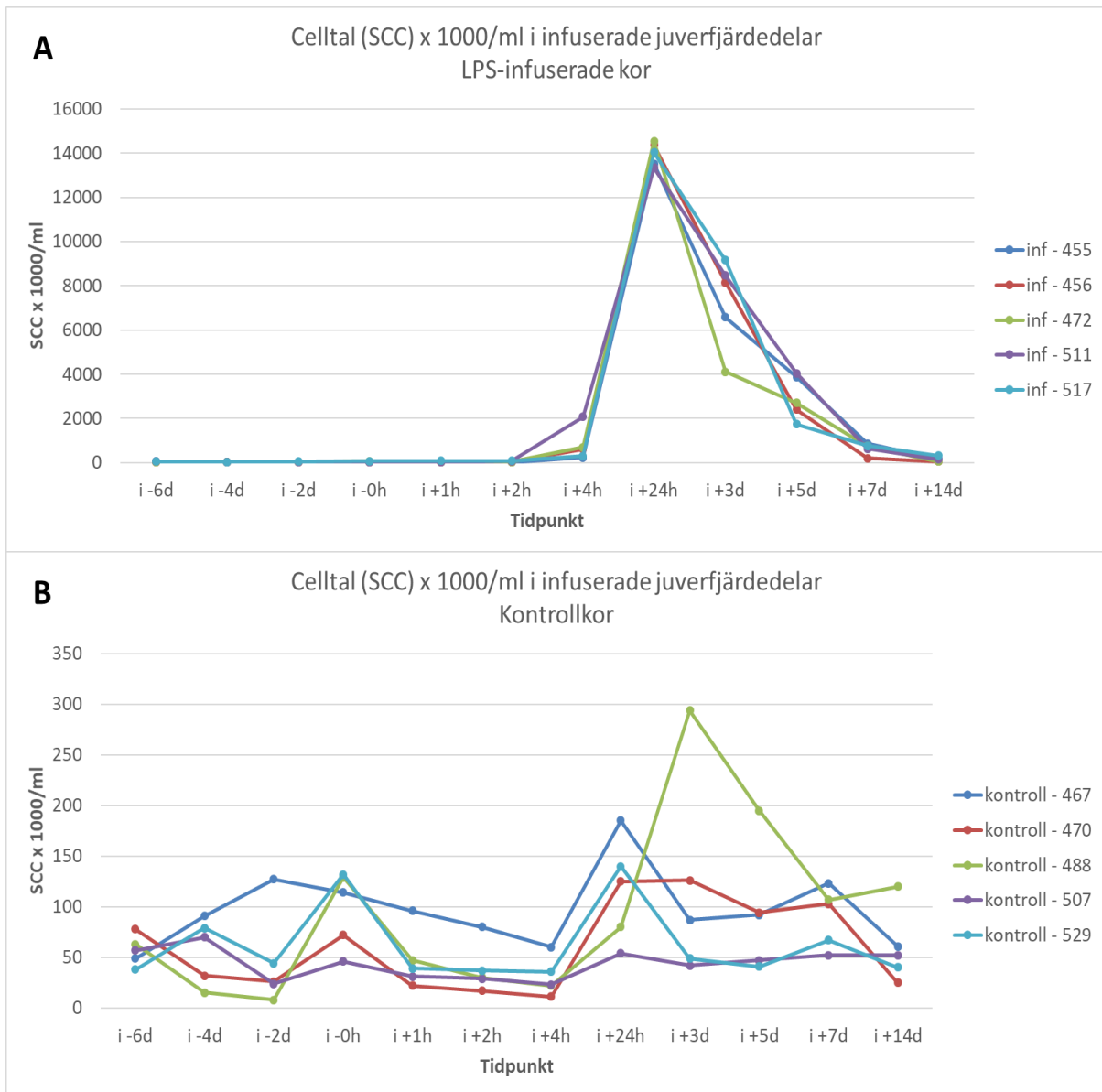
Klinisk respons på infusion med LPS

Celltal

Celltalets variation hos LPS-infuserade och kontrollkor tidpunkter före och efter infusion redovisas i figur 1. Vid försökets start låg celltalet hos alla utvalda kor mellan 12000 och 86000 celler/ml (juverhälsoklass 0-1). Medelcelltalet för valda spenar sex dagar innan infusion (i -6d) var 34400 celler/ml för spenar som skulle infuseras med LPS och 57000 celler/ml för spenar som skulle infuseras med NaCl. Det fanns ingen statistiskt signifikant skillnad i celltal mellan de två behandlingsgrupperna sex dagar ($p=0,110$), fyra dagar ($p=0,121$) eller två dagar innan infusion ($p=0,234$). Samma dag som, men strax innan, infusionen var medelcelltalet för valda spenar 40800 celler/ml (LPS) respektive 98600 celler/ml vilket gav en signifikant skillnad mellan de två behandlingsgrupperna ($p=0,027$).

För LPS-infuserade kor började celltalet att stiga vid fyra timmar och nådde sitt högsta värde 24 timmar efter infusion för att därefter successivt sjunka under försöksperioden och normaliseras någon gång mellan sju och 14 dagar efter infusion.. Högst uppmätta celltal i ett prov var 14 544 000 celler/ml 24 timmar efter infusion, då celltalet hos alla LPS-infuserade kor var $> 13\,000\,000$ celler/ml.

För kontrollkorna varierade celltalet både före och efter infusion och inget uppenbart samband mellan förändrat celltal och tidpunkt i förhållande till infusionstillfället kan utläsas. Högst uppmätta celltal i ett prov var 294 000 celler/ml tre dagar efter infusion. Vid jämförelse av de två behandlingsgrupperna ses att celltalet var avsevärt lägre hos kontrollkorna 24 timmar efter infusion än vad det var hos de LPS-infuserade korna. Kontrollkornas celltal varierade då mellan 54 000 och 185 000 celler/ml medan det hos LPS-infuserade kor låg mellan 13 326 000 och 14 544 000 celler/ml. Statistisk signifikant skillnad i celltal mellan juverdelar som infuserats med LPS och kontrollkor förelåg två timmar efter infusion ($p<0,001$), 24 timmar efter infusion ($p<0,001$), tre dagar efter infusion ($p<0,001$) och fem dagar efter infusion ($p<0,001$). När det gått sju dagar efter infusion förelåg inte längre någon statistiskt signifikant skillnad i celltal mellan de två grupperna ($p=0,723$).



Figur 1. Uppmätt celltal hos LPS-infuserade kor (A) och kontrollkor (B) i infuserade juverfjärdedelar upp till 14 dagar efter infusionen. Notera skillnaden i skala mellan (A) och (B).

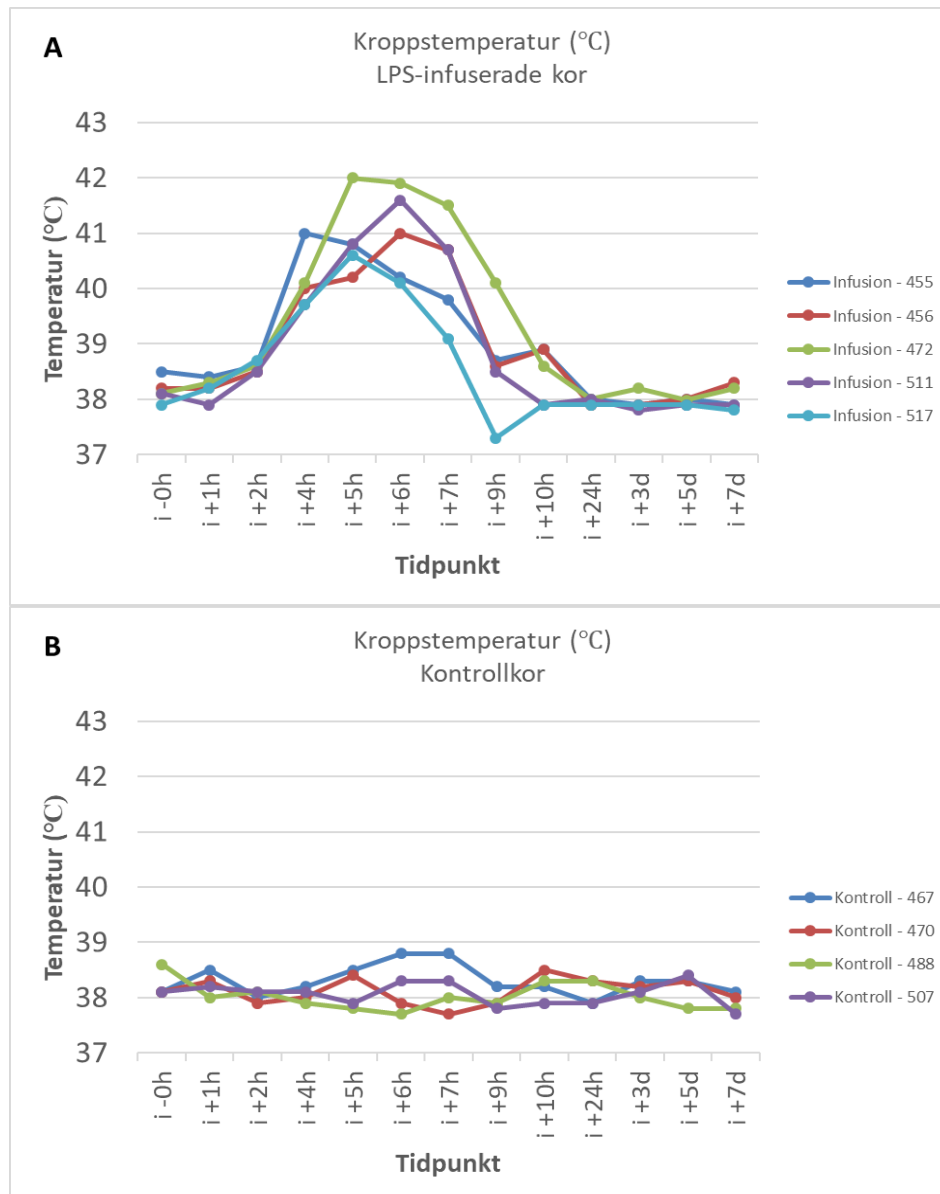
(A). Observera skalan till följd av stor spridning i celltal mellan de olika tidpunkterna vilket gör att celltalen framställs som noll innan infusion. I själva verket pendlar celltalet mellan 7000 och 63000 celler/ml vid tidpunkterna innan infusion.

Kroppstemperatur

Uppmätta temperaturer för respektive behandlingsgrupp, individ och tidpunkt redovisas i figur 2. Kroppstemperaturen började öka hos de LPS-infuserade korna två timmar efter infusionen och skilde sig signifikant mot temperaturen hos kontrollkorna vid samma tidpunkt ($p < 0,001$), fyra timmar efter infusion ($p = 0,001$), fem timmar efter infusion ($p < 0,001$), sex timmar efter infusion ($p = 0,001$) och sju timmar efter infusion ($p = 0,004$). Temperaturen nådde sitt högsta värde hos de LPS-infuserade korna efter fyra-sex timmar, och hade normaliserats 10-24 h efter infusionen. Den högst uppmätta kroppstemperaturen var 41,9 °C.

Hos kontrollkorna varierade temperaturen inom individerna vid de olika tidpunkterna men förändringarna var små och inte associerat med de tidpunkter då en höjning eller sänkning kan

förväntas till följd av infusion med en exogen vätska i juvret. Högst uppmätta temperatur hos kontrollkorna var 38,8°C vid två tillfällen (i +6h, i+7h) hos en och samma individ (ko-ID 467). Ko 529 provtogs inte för kroppstemperatur vid två timmar efter infusion och framåt i tiden, då hon var svårhanterad vid detta moment och utgår därför från resultatet för kroppstemperatur.

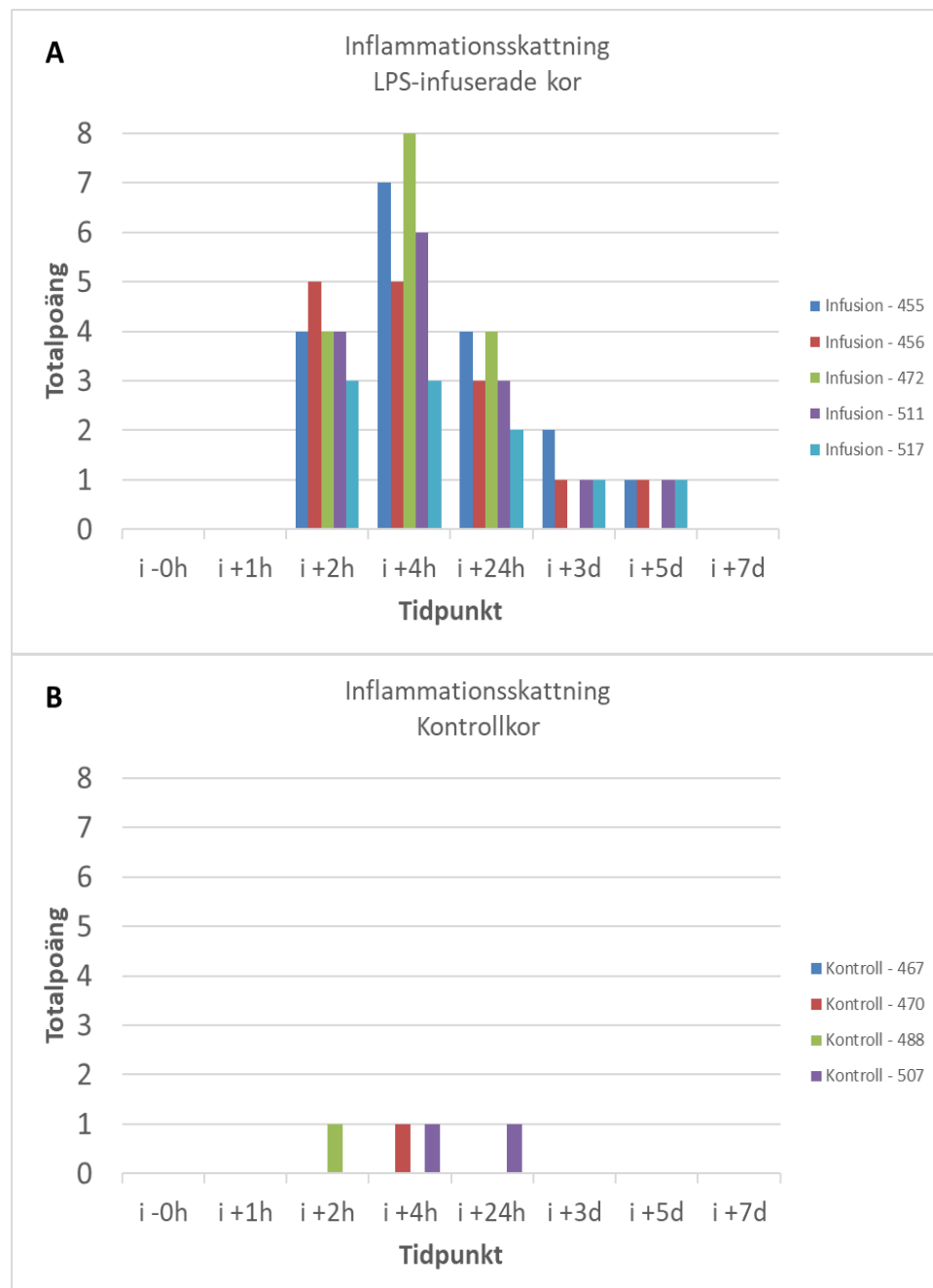


Figur 2. Kropptemperatur uppmätt hos kor infuserade med LPS (A) och hos kontrollkor (B) upp till sju dagar efter infusionen.

Inflammationsskattning

Lokala tecken på inflammation utvecklades två timmar efter infusion och kvarstod efter fyra timmar hos samtliga LPS-infuserade kor (figur 3). Hos tre av fem LPS-infuserade kor peakade inflammationen efter fyra timmar. Högsta inflammationspoäng fyra timmar efter infusionen var åtta av 15 möjliga. Låggradiga symptom i form av lindrig svullnad (1) kvarstod dag fem hos fyra av fem LPS-infuserade kor men var helt borta dag sju. Lindrig svullnad observerades hos en kontrollko två timmar efter infusion, hos två andra kontrollkor fyra timmar efter infusion varav en hade kvarstående lindrig svullnad 24 timmar efter infusion (figur 6).

De lokala symptomen på mastit skilde sig signifikant i grad jämfört med kontrollkorna två timmar ($p=0,009$), fyra timmar ($p=0,011$), 24 timmar ($p=0,009$), tre dagar ($p=0,048$) och fem dagar ($p=0,048$) efter infusion.

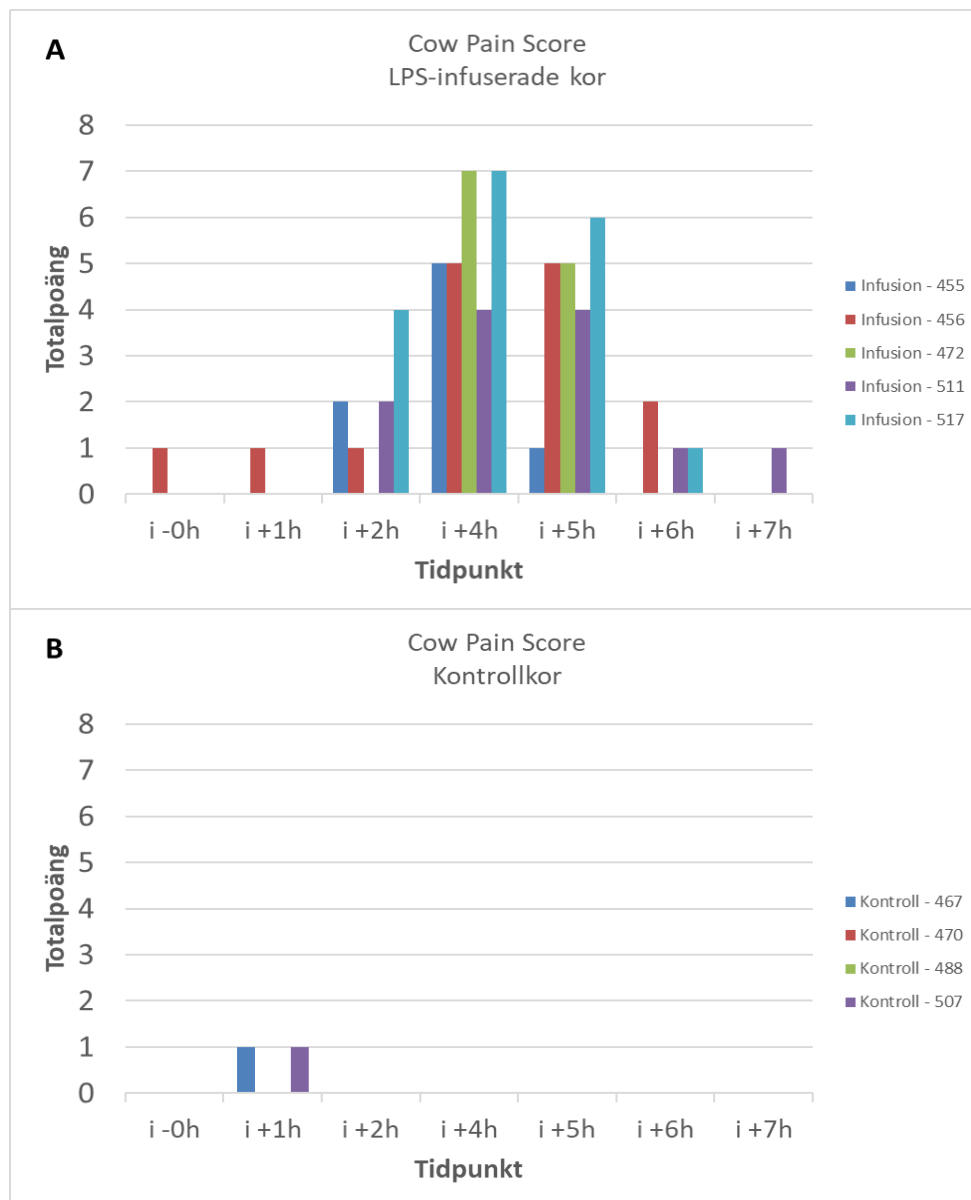


Figur 3. Bedömning av inflammation i juvret hos LPS-infuserade kor (A) och kontrollkor (B) upp till sju dagar efter infusion, i form av totalpoäng där 0-3 delpoäng ges för svullnad, värme, svullnad, rodnad, ömhet respektive mjölkutseende och max totalpoäng är 18.

Smärtsymptom

Den sammanlagda poängen för observerade smärtsymptom enligt Cow Pain Scale redovisas i figur 4. Det var inget enskilt smärterelaterat symptom som var vanligare än de andra (poäng för de olika bedömningskriterierna redovisas ej här). Två timmar efter infusion bedöms endast en ko vara smärtpåverkad (3 poäng) och fyra timmar efter infusion är samtliga LPS-infuserade

kor smärtpåverkade och poängen den högsta för försöksperioden (4-7 poäng). Fem timmar efter infusion bedöms fyra av fem kor fortfarande känna smärta (4-6 poäng) för att vid sex timmar efter infusion inte uppvisa tillräckligt många symptom på smärta för att de ska bedömas som smärtpåverkade (1-2 poäng). Kontrollkorna bedömdes ej som smärtpåverkade under försöksperioden (<3poäng). Smärtsymptomen hos de LPS-infuserade korna skilde sig signifikant från kontrollkornas fyra timmar ($p=0,007$) och fem timmar ($p=0,007$) efter infusion.



Figur 4. Totalpoäng för smärta enligt de sex bedömningskriterierna från Cow Pain Scale (Gleerup et al., 2015a) hos LPS-infuserade kor (A) och kontrollkor (B) upp till sju timmar efter infusion med NaCl. >3poäng = smärtpåverkad. Max poäng = 10.

Bakteriologisk undersökning

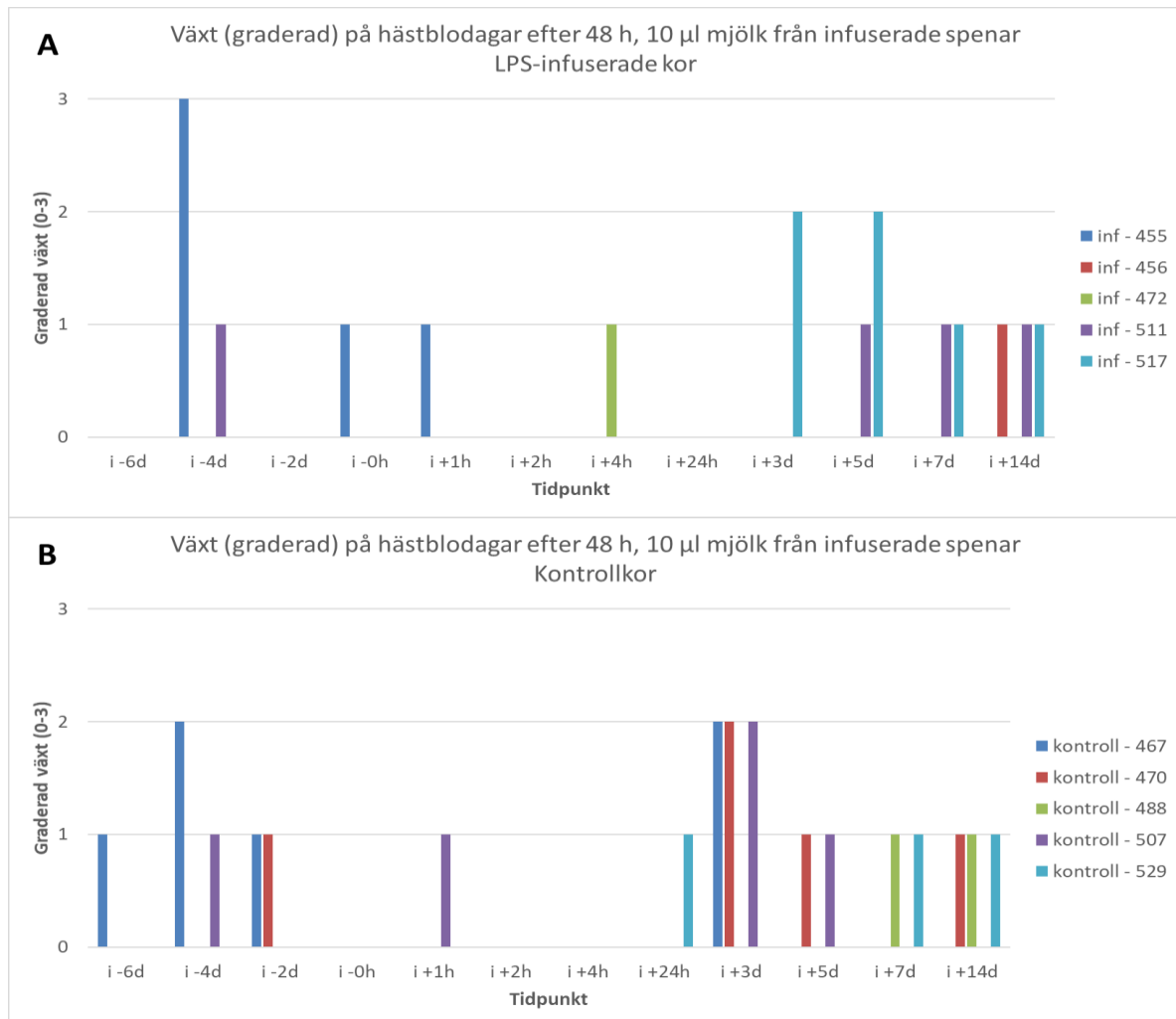
Odling

Blodagar

Av 120 mjölkprover från 12 tidpunkter resulterade totalt 30 (25%) i växt på blodagarplattor som strukits med 10 µl mjölk. Av dessa 30 prover var åtta tagna innan infusion (tre från LPS-

infuserade kor, fem från kontrollkor) och 22 var uttagna efter infusion (10 från LPS-infuserade kor, 12 från kontrollkor). 24 timmar efter infusion resulterade enbart ett mjölkprov i växt, vilket kom från en kontrollko. Tre dagar efter infusion växte det endast på en agarplatta från en LPS-infuserad ko jämfört med växt på tre plattor från kontrollkorna. Ingen tydlig association mellan växt av olika grad och olika tidpunkter kan utläsas.

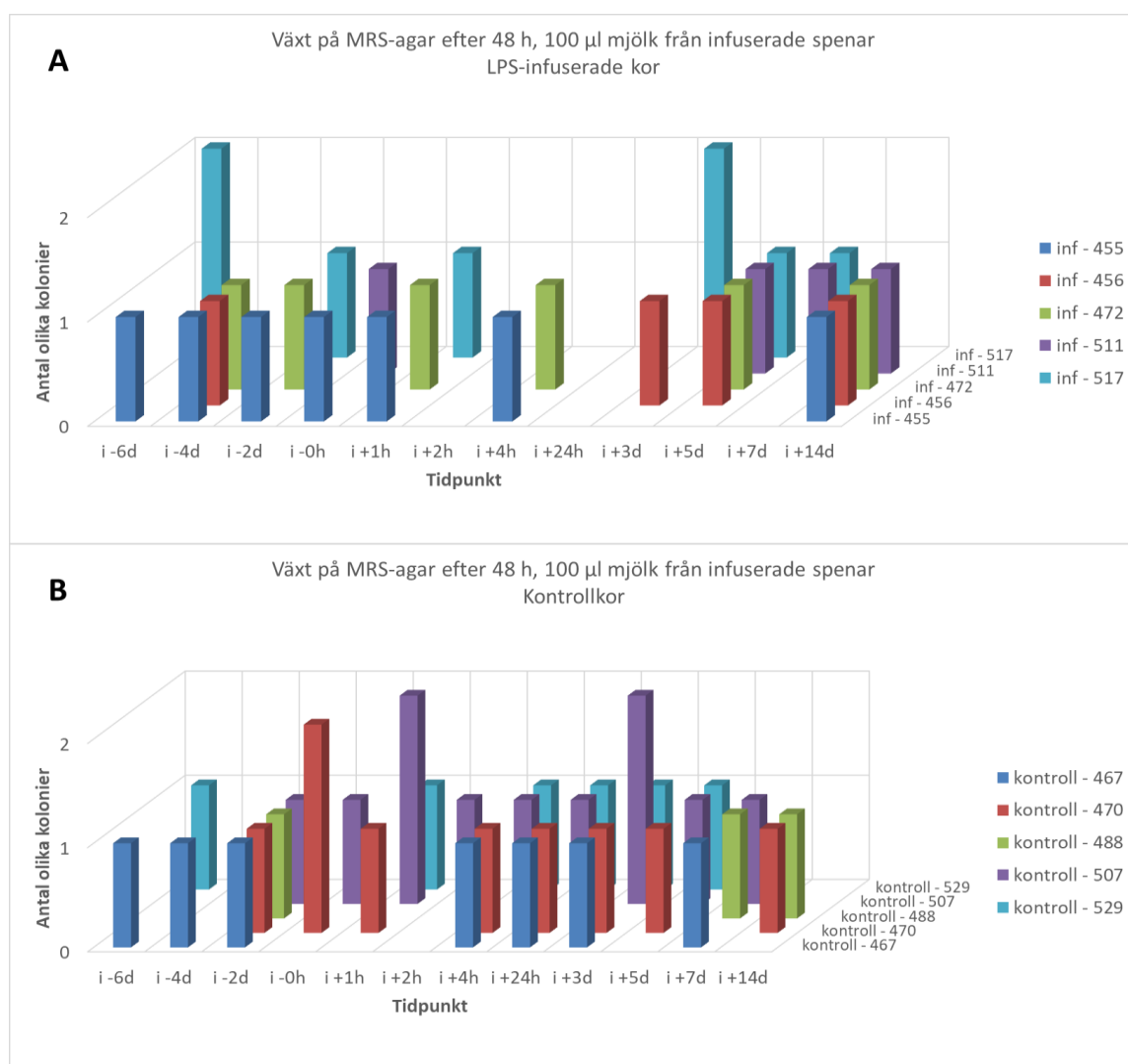
Resultaten från den bakteriologiska odlingen för LPS-infuserade kor och kontrollkor, i form av växt som graderats 0-3, presenteras på en tidslinje i figur 5. Totalt sju agarplattor (fem från kontrollkor och två från LPS-infuserade kor) hade >3 cfu/10µl på blodagar och analyserades av mastitlab på SVA och svarades ut som sparsam (sex stycken) eller måttlig (en) blandflora.



Figur 5. Graderad växt på blodagar 48 timmar efter utstryk med 10 µl mjölk från infuserade spenar vid olika tidpunkter för LPS-infuserade kor (= "inf - Ko-ID") (A) och kontrollkor (= "kontroll - Ko-ID") (B). 0= ingen växt, 1 = 1-2 cfu, 2 = 3-10 cfu, 3 = >10 cfu.

MRS-agar

Totalt 60 mjölkprover (50%) genererade växt av 65 olikartade kolonier på MRS-agarplattor och artbeständes därför vidare med MALDI-TOF MS. 25 av dessa 60 mjölkprov (ca 38%) hade även gett växt av varierande grad på blodagar. Resultaten från odlingen på MRS-agar för LPS-infuserade kor och kontrollkor presenteras på en tidslinje i figur 6. Som framgår finns ingen bakteriologisk växt 24 timmar efter infusion hos kor LPS-infuserade kor, jämfört med kontrollkorna där mjölk från fyra av fem kor genererat växt. Även tre dagar efter infusion är det vanligare med växt hos kontrollkorna jämfört med de LPS-infuserade korna. Fem respektive 14 dagar efter infusion har fyra av fem mjölkprov från LPS-infuserade kor genererat växt på MRS-agar, medan endast två av fem mjölkprov genererat växt sju dagar efter infusion.



Figur 6. Antal isolerade kolonier från MRS-agar, 48 timmar efter utstryk med 100 µl anrikad mjölk från infuserade spenar vid olika tidpunkter för LPS-infuserade kor (= "inf - Ko-ID") (A) och kontrollkor (= "kontroll - Ko-ID") (B).

MALDI-TOF MS

60 av 120 prover genererade växt av 65 olika kolonier på MRS-agar. Av dessa 65 kunde 47 identifieras på art- eller genusnivå med höga score-värden (>2), 5 med låga score-värden (1,7-1,99) medan resterande 13 inte kunde identifieras ("No organism identification possible").

Av de 32 prover från vilka färskas kolonier användes för analys med MALDI-TOF MS fick 17 ett bättre resultat i form av högre score-värden än tidigare. Bakteriearter med det högsta score-värdet för respektive provduplikat har använts i resultatet. Om två olika bakteriearter svarades ut i ett provduplikat och bägge arter hade ett score-värde >2 , redovisas båda arter i resultatet. Detsamma gäller även om ett prov hade två olika arter i "best" respektive "second best match". Även resultat med låga score-värden redovisas för att få en uppfattning om vilka bakterier som kan förekomma. I de fall två kolonier från en och samma ko och tidpunkt isolerats från MRS-agar, angavs resultatet från båda även om de identifierats som samma bakterieart.

Vilka bakterier som identifierades vid de olika tidpunkterna för LPS-infuserade kor respektive kontrollkor redovisas i tabell 7 respektive 8. Inget samband mellan vilka bakterier som identifierats och tidpunkt i förhållande till infusion med LPS kan ses. *S. epidermidis* är den bakterieart som förekommer flest gånger hos båda behandlingsgrupper men vid olika tidpunkter och hos olika individer. Bakteriearterna som odlats fram hos var och en av kontrollkorna varierade mellan tidpunkterna och dessa individer hade också flest "No ID". Inget samband mellan misslyckad identifiering och tidpunkt i förhållande till infusion med LPS eller NaCl kan ses.

Tabell 7. Bakteriearter vid tolv tidpunkter före och efter infusion isolerade från MRS-agar och som svarats ut av MALDI-TOF MS, LPS-infuserade kor. Tomma rutor innebär att provet inte genererade någon växt på MRS-agar. Bakterier inom parentes () har fått godkända score-värden me inte lika höga som de första som anges i fälten. "Koloni 1" och "Koloni 2" betyder att två kolonier med olika utseende isolerats från samma ko och tidpunkt. S = Staphylococcus spp, Str. = Streptococcus spp, E. = Enterococcus spp, No ID = No Identification, A. = Aerococcus spp, P = Pediococcus spp.

Ko-ID	i-6d	i-4d	i-2d	i -0h	i +1h	i +2h	i +4h	i +24h	i +3d	i +5d	i +7d	i +14d
455	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Str. lutetiensis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>		<i>S. epidermidis</i>					<i>E. faecalis</i>
456		No ID							No ID	<i>E. faecalis</i>		<i>S. epidermidis</i>
472		<i>Corynebacterium</i> spp	<i>S. hominis</i>		<i>A. viridans</i>		<i>Str. mitis/pneumoniae</i>			<i>S. capitis</i>		<i>E. casseliflavus</i>
511				<i>Str. mitis</i> (<i>Str. oralis</i>)						<i>S. aureus</i>	<i>Str. lutetiensis</i>	<i>S. epidermidis</i>
517	Koloni 1: <i>Str. mitis</i> (<i>Str. pneumoniae</i>)		<i>S. epidermidis</i>		No ID				Koloni 1: <i>P. pentosaceus</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>S. epidermidis</i>	
	Koloni 2: <i>S. hominis</i>								Koloni 2: <i>P. pentosaceus</i>			

Tabell 8. Bakteriearter vid tolv tidpunkter före och efter infusion isolerade från MRS-agar och som svarats ut av MALDI-TOF MS, kontrollkor. Tomma rutor innebär att provet inte genererade någon växt på MRS-agar. Bakterier inom parentes () har fått godkända score-värden men inte lika höga som de första som anges i fälten. "Koloni 1" och "Koloni 2" betyder att två kolonier med olika utseende isolerats från samma ko och tidpunkt. S. = *Staphylococcus* spp, Str. = *Streptococcus* spp, E. = *Enterococcus*, No ID = No Identification,

Ko-ID	i-6d	i-4d	i-2d	i-0h	i+1h	i+2h	i+4h	i+24h	i+3d	i+5d	i+7d	i+14d
467	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. pentosaceus</i>	No ID				<i>Str. pluranimalium</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>		<i>S. epidermidis</i>	
470			<i>Corynebacterium</i> spp	No ID No ID	No ID		No ID	<i>Str. auricularis</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>E. faecalis</i>		<i>S. hominis</i>
488			<i>Bacillus licheniformis</i>								<i>S. capitis</i>	<i>E. faecium</i> (L. reuteri)
507			No ID	<i>S. epidermidis</i>	No ID No ID	<i>P. pentosaceus</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i> <i>S. epidermidis</i>	No ID	No ID	
529	<i>S. chromogenes</i>				<i>Str. vestibularis</i>		<i>Str. infantis</i>	<i>S. capitis</i>	<i>Corynebacterium</i> spp	<i>E. faecalis</i>		

A. = *Aerococcus*, P. = *Pediococcus*.

ddPCR

Totalt analyserades 100 av 120 mjölkprover från tio tidpunkter (exklusive prover från en och två timmar innan infusion) och 36 extraktions- och PCR-kontroller med ddPCR. Antalet genererade oljedroppar varierade mellan 4944 och 21665 och medianvärdet var 18668. Åtta av 136 prover (ca 6%) hade färre än 10 000 droppar och av dessa kom fem stycken från LPS-infuserade kor från 24 timmar efter infusion, en från en LPS-infuserad ko 5 dagar efter infusion och övriga två var positiva extraktionskontroller 10^7 respektive en PCR(-). För majoriteten (86%) av alla prover, inklusive extraktions- och PCR-kontroller genererades >15 000 droppar. Tröskelvärden för fluorescenceamplituden/intensiteten justerades manuellt och anpassades efter kluster med negativa droppar från PCR(-) för respektive körning. Tröskelvärdet sattes så att 99,999% av alla droppar i PCR(-) klassades som negativa av Droplet reader. Alla droppar med en fluorescensamplitud högre än tröskelvärdet klassades således som positiva. Andelen positiva droppar bestämmer sedan startkoncentrationen av mål-DNA i proven i kopior/ μ l, vilket är det slutliga resultatet som redovisas här.

LPS-infuserade kor och kontrollkor

Resultatet från ddPCR-analysen redovisas i tabell 9. Fyra timmar efter infusion med LPS ses en tydligt ökad koncentration PCR-produkt hos fyra av fem LPS-infuserade kor. Det högst uppmätta antalet kopior/ μ l är 10^6 och ses fyra timmar, tre dagar och fem dagar efter infusionen hos två LPS-infuserade kor per tidpunkt. Koncentrationerna fortsätter vara höga hos samtliga LPS-infuserade kor till och med dag fem efter infusion, för att på dag 7 och 14 ha minskat till <300 kopior/ml respektive <5 kopior/ml.

I mjölkproverna från kontrollkorna detekterades låga mängder bakteriellt DNA under hela försöksperioden. Högst uppmätta koncentration var 20,9 kopior/ μ l fyra dagar innan infusion med NaCl men därefter är koncentrationerna <1 kopia/ μ l hos samma individ. Totalt 35 av 50 mjölkprover hade en koncentration <1 kopia/ μ l. Koncentrationer >1 kopia/ μ l förekom hos fyra av fem kontrollkor sex dagar innan infusion, hos alla kontrollkor fyra dagar innan infusion, hos två kontrollkor 24 timmar efter infusion, hos två kontrollkor fem dagar efter infusion och hos en kontrollko sju respektive 14 dagar efter infusion.

Tabell 9. Koncentration PCR-produkt (kopior/ μ l) enligt ddPCR

Behandling och Ko-ID	Tidpunkt									
	i-6d	i-4d	i-2d	i-0h	i+4h	i+24h	i+3d	i+5d	i+7d	i+14d
LPS-infuserade kor										
455	4	0	2,1	6,4	7200	2990	6220	2597	0,77	4
456	4,9	1,1	0,21	0,36	685	2310	6770	1000000	0,13	0,7
472	5,5	3,9	0,29	0,13	1000000	2830	1000000	9100	293	1,7
511	0	6,6	1,08	0,29	1000000	4000	1126	7600	151	0,06
517	9,2	9,1	0,31	0,06	0,05	1231	1000000	1000000	32	1,7
Kontrollkor										

467	0,5	20,9	0,17	0,26	0	0,14	0,32	0	0,24	0,53
470	9,3	8,6	0,75	0,06	0,07	0,14	0,37	0,12	0,94	0,12
488	9,2	3,9	0,72	0,18	0,14	0,54	0,36	1,3	1,1	0,46
507	3,3	4,7	0,66	0,31	0,57	1,7	0,71	0,24	0,49	2,4
529	4,8	2,3	0,3	0	0	1,5	0,15	1,3	0,12	0,44

Extraktionskontroller

Det kördes totalt 13 extraktionsserier (av olika storlek) och därmed skapades 13 negativa extraktionskontroller. Från mock community analyserades två positiva extraktionskontroller med 10^3 respektive 10^7 celler/ml. De negativa extraktionskontrollerna innehöll PCR-produkter även om koncentrationerna var <1 kopia/ μ l för majoriteten av proverna (ca 67%) medan resterande fyra negativa extraktionskontroller innehöll 17,7, 8,8 respektive 1,8 kopior/ μ l. De bakterier som ingår i "mock community" ska inte generera någon PCR-produkt med de primrar som använts, men båda positiva extraktionskontroller genererade låga koncentrationer bakteriell arvsmassa (2,3 respektive 0,9 kopior/ μ l).

PCR-kontroller

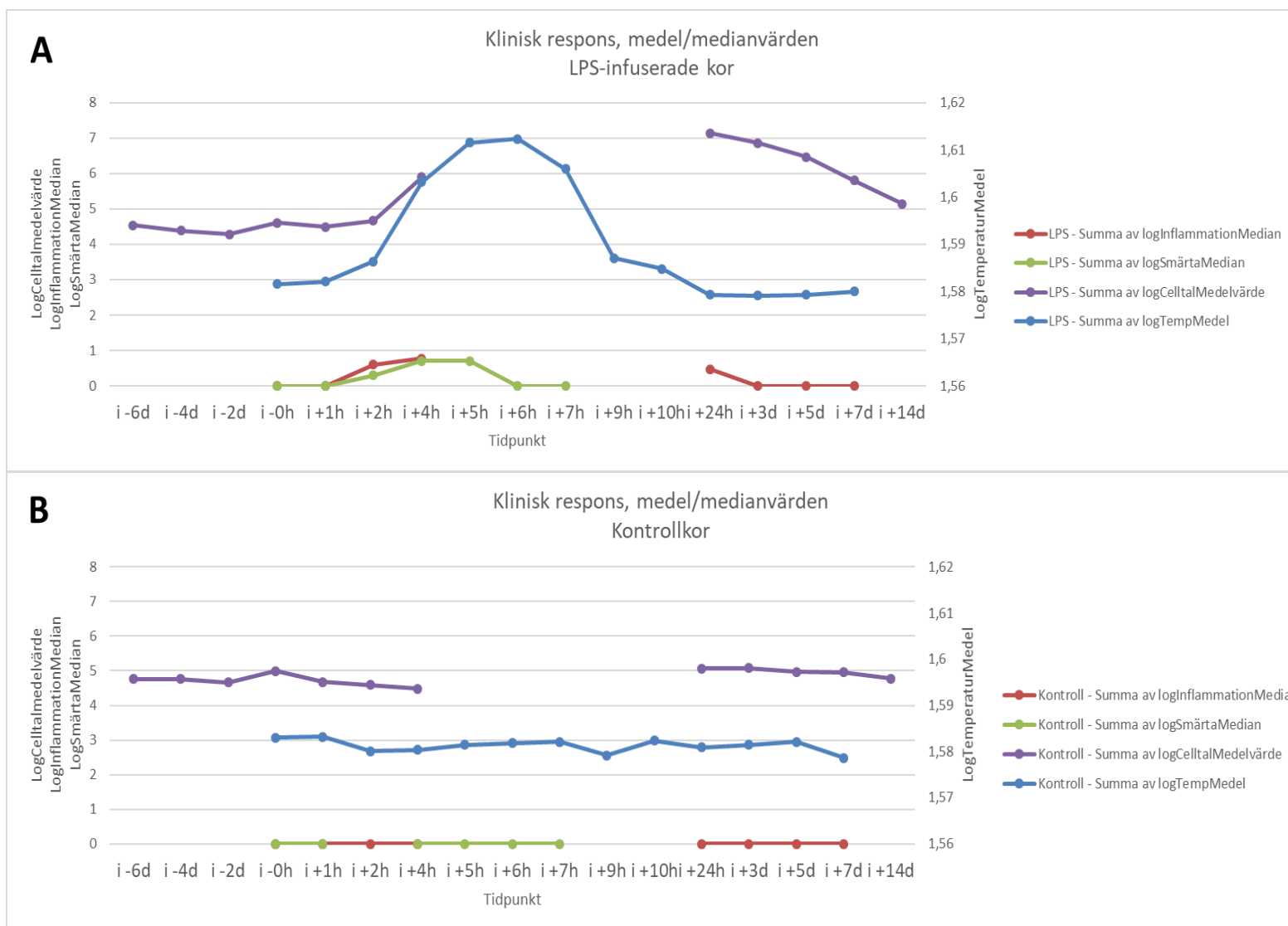
Totalt kördes 4 positiva amplifieringskontroller (PCR(+)) och 17 negativa amplifieringskontroller (PCR(-)). Samtliga PCR(+) innehöll relativt höga halter PCR-produkter (391-679 kopior/ μ l). PCR(-) användes för att sätta ett tröskelvärde där 99,999% av alla droppar i PCR(-) klassas som negativa. Fyra PCR(-) innehöll mycket små mängder ($<0,1$ kopior/ μ l).

Jämförelse mellan variabler och behandlingsgrupper över tid

Figur 7 visar logaritmerade medelvärden (kroppstemperatur, celltal, ddPCR-koncentration) eller medianvärden (inflammationsskattning, celltal) för respektive behandlingsgrupp, variabel och tidpunkt. Syftet med logaritmeringen var att möjliggöra presentation av variablernas förändring över tid i förhållande till varandra i ett och samma diagram per behandlingsgrupp.

Ur diagrammet för LPS-infuserade kor kan utläsas att den tydliga ökningen av kroppstemperatur från två till fyra timmar efter infusion åtföljs av en höjning av medelcelltalet såväl som av uppkomst av symptom på smärta och inflammation. Därefter finns ej data för celltal förrän 24 timmar efter infusion. Vid 24 timmar efter infusion är koncentrationen PCR-produkt hög hos LPS-infuserade kor (mellan 1231 kopior/ μ l och 4000 kopior/ μ l) samtidigt som celltalet når sitt högsta värde (medelvärde 139536 $\times 1000$ celler/ml) och kliniska tecken på inflammation finns (medianvärde 3 poäng) medan kroppstemperaturen återgått till normala värden (medelvärde 37,6°C). PCR-produkterna fortsätter vara höga till och med fem dagar efter infusion, och då är celltalet på väg ner men har inte normaliserats än.

I diagrammet för kontrollkor ses inget uppenbart samband mellan de olika variablerna. Samliga värden ligger relativt stabilt över tid utan några tydliga ökningar eller sänkningar vid några särskilda tidpunkter.



Figur 7. Logaritmerade medelvärden (kroppstemperatur, celltal, ddPCR-koncentration) och medianvärden (inflammationsskattning, smärtpredömning) för respektive variabel och tidpunkt för LPS-infuserade kor (A) och kontrollkor (B).

DISKUSSION

Klinisk respons på infusion med LPS

Det finns en tydlig, signifikant skillnad i celltal mellan LPS-infuserade kor och kontrollkor strax före infusion ($p=0,027$), två timmar efter infusion ($p<0,001$), 24 timmar efter infusion ($p<0,001$), tre dagar efter infusion ($p<0,001$) och fem dagar efter infusion ($p<0,001$). Kroppstemperaturen var signifikant förhöjd hos LPS-infuserade kor två timmar ($p<0,001$), fyra timmar ($p<0,001$), fem timmar ($p<0,001$), sex timmar ($p=0,001$) och sju timmar efter infusion ($p=0,004$) med det högsta medelvärdet sex timmar efter infusion ($40,96^{\circ}\text{C}$) och en normalisering någon gång mellan 10 och 24 timmar efter infusion. Det stämmer bra överens med vad Lehtolainen *et al.* (2003) såg, nämligen att lokala symptom uppträdde någon gång mellan fyra och åtta timmar efter infusion.

Korna responderade på LPS med tydliga tecken på lokal inflammation som skiljer sig signifikant från det som ses hos kontrollkorna två timmar ($p=0,009$), fyra timmar ($p=0,011$), 24 timmar ($p=0,009$), tre dagar ($p=0,048$) och fem dagar ($p=0,048$) efter infusion. Lehtolainen *et al.* (2003) såg också att lokala symptom uppträdde från två timmar efter infusion. Smärtsymptom förekom endast hos de LPS-infuserade korna och skilde sig signifikant från totalpoängen för smärta hos kontrollkorna fyra timmar ($p=0,007$) och fem timmar ($p=0,007$) efter infusion. Sammantaget tyder responsdatan från denna studie på att experimentell mastitinduktion med LPS från *E.coli* är en bra modell för att undersöka systemiska och lokala förändringar i juver i samband med mastit vilket är förenligt/i linje med resultat från tidigare studier (Hoeben *et al.*, 2000; Mehrzad *et al.*, 2001; Lehtolainen *et al.*, 2003).

Ett dygn innan infusionen, när korna bands upp i en separat stallavdelning, ändrades mjölkningstekniken abrupt från automatisk i karusell till mjölkningsmaskin vilket skulle kunna ha bidragit till effekterna av LPS-infusionen men också till de lindriga symptom på lokal inflammation som observerades hos enstaka kontrollkor. Detta eftersom mjölkning på heljuvernivå ökar risken för övermjölkning, då de olika juverfjärdedelarna kan behöva mjölkas olika lång tid och inte tas av förrän alla fyra delar är färdigmjolkade (Ferneborg, 2016), vilket kan resultera i inflammation och obehag för kon. Författaren till detta examensarbete närvarade dock ej vid mjölkningstillfällena och känner dessvärre inte till om korna uppvisade symptom på obehag vid mjölkning, t.ex. i form av att sparka av sig mjölkningsmaskinerna.

Bakteriologi

Utifrån studiens odlingsdata och resultat från MALDI-TOF MS är det inte möjligt att dra några slutsatser om vilka bakterier som förekommer i mjölk från friska kor respektive från kor som drabbats av mastit. Av samtliga mjölkprover resulterade 25% i växt på hästblodagar och då i form av blandflora, varav åtta var växt innan infusionsdagen. Hälften av alla prover resulterade i växt på MRS-agar av vilka 38% även genererat växt på hästblodagar. Mjölkprover från LPS-infuserade kor 24 timmar efter infusion hade ingen växt varken på hästblodagar eller MRS-agar. Huruvida det är en effekt av LPS-infusionen i sig går inte att dra några slutsatser om p.g.a. för litet underlag och att anledningarna till utebliven växt kan vara många. Det är känt att inte alla bakterier kan odlas konventionellt (Collado *et al.*, 2009; Dicksved, 2008; Kuehn *et al.*, 2013; Britten, 2012) och att odlingsnegativa mjölkprover också bland annat kan bero på intermittent utsöndring, koncentrationer under detektionsnivån d.v.s. att ingen bakterieart är överrepresenterad (=friska juver) och lågt antal levande celler (Kuehn *et al.*, 2013; Britten,

2012). I övrigt har inga tydliga samband mellan förekomst av växt och behandlingsgrupp eller tidpunkt i förhållande till infusion kunnat ses.

Förhoppningen var att majoriteten av de 60 bakterier som växt fram på MRS-agarn skulle identifieras som LAB av MALDI-TOF MS. Enligt Hardy Diagnostics (uå) finns det dock en känd risk för att andra än bakterier än LAB växer fram på MRS-agar, och med flertalet identifierade stafylokocker i mjölkproverna har så troligen kunnat ske i detta fall. Endast ett fåtal identifierades som olika typer av LAB (streptokocker, *P. pentosaceus*, *Enterococcus casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. faecium* och *Lactobacillus reuteri*) och kom från olika individer och tidpunkter i förhållande till infusionen varför inget mönster i förekomsten av LAB över tid som respons på LPS-infusion kunde ses. En agar som är mer selektiv för laktobaciller, Rogosa-agar, hade med facit i hand kunnat användas för att eventuellt hämma tillväxt av annan bakterieflora ytterligare och därmed öka chansen för kolonier av LAB att framträda (Oxoid Limited, 2017b).

Av de 60 mjölkprover som genererade växt på MRS-agarplattor kunde endast 47 identifieras med höga score-värden av MALDI-TOF MS. Resterande hade antingen låga score-värden (fem stycken) eller kunde inte identifieras (13 stycken). Osäkerhet från analysmetoden för vilka bakterier som finns i provet kan bero på kontamination (Buchan *et al.*, 2012), eller att matrix, odlingsbetingelser eller inkubationstid inte är tillräckligt anpassade för bakterierna i proven (Carbonelle *et al.*, 2011). Att ett prov inte kan identifieras kan bero på att aktuella bakterier saknas i analysmaskinens bibliotek (Suckau *et al.*, 2003). 17 av 32 prover fick ett bättre scorevärde då färskas kolonier användes, vilket indikerar att etOH-sparade prover inte är optimalt för analys med MALDI TOF MS. Om mer tidsutrymme funnits för praktiskt arbete inom denna studie kunde ytterligare arbete lagts på att försöka utreda varför MALDI TOF MS inte lyckats identifiera vissa prover och finna ett sätt att möjliggöra analys av dessa med instrumentets hjälp.

ddPCR

Data tyder på att det finns en skillnad i ddPCR-koncentrationer mellan LPS-infuserade kor och kontrollkor över tid. Variationen av PCR-produkt över tid för LPS-infuserade kor stämmer dock inte överens med den förväntade variationen enligt tidigare studier inom projektet. Enligt ddPCR-analysen för denna studie är koncentrationerna PCR-produkt som högst från fyra timmar till fem dagar efter infusion vilket enligt tidigare, ännu ej publicerade, studier är en tidsperiod som visat sig innebära minskade koncentrationer av LAB. Av den anledningen uppstod osäkerhet kring huruvida resultaten verkligen var biologiskt inducerade och funderingar på om resultaten kunde bero på bindning mellan EvaGreen och DNA från inflammatoriska celler i juvret och därmed vara falskt positiva. Med anledning av de osäkra resultaten togs beslut om att inte gå vidare med några statistiska signifikansanalyser av ddPCR-data.

För att utvärdera vad det oväntade resultatet i denna studie berodde på, gjordes uppföljande undersökningar (resultat presenteras ej här) där prover med höga koncentrationer ddPCR-produkt spädades och testades i gelelektrofores. Resultaten från gelelektroforesen visar att sannolikheten för att EvaGreen bundit till DNA från inflammationsceller är stor. För att undgå detta problem i framtiden kan man designa och utvärdera nya prober specifikt anpassade för studien och använda dessa istället för EvaGreen.

ddPCR valdes som kvantitativ analysmetod delvis med hänsyn till att metoden visats vara bättre än konventionell PCR på att upptäcka och kvantifiera bakteriellt DNA som förekommer

i låga koncentrationer i ett prov (Porcellato *et al.*, 2016; Qian *et al.*, 2016) vilket är fallet med mjölk från friska juver. I resultatet ses mycket höga kvantiteter arvsmassa från vissa tidpunkter hos LPS-infuserade kor. De riktigt höga koncentrationerna (10 000 000 kopior/ μ l) ger misstanke om mättade ddPCR-reaktioner vilket skulle stämma med teorin om att det är arvsmassa från kornas neutrofiler (vilka rekryteras i rikliga mängder i början av en inflammation) som kvantifierats istället för DNA från LAB.

Resultat från de negativa extraktionskontrollerna innehållande DNA-fritt H₂O, extraktions- och PCR-reagenser visar att samtliga prov innehöll DNA-material, även om koncentrationerna i majoriteten av dem var små. Det kan tyda på kontamination som skett under provpreparering, extraktionsmomenten eller vid förberedelserna av PCR-reaktionerna och då oavsiktligt från omgivningen, från andra prover, extraktionsreagenser eller PCR-reagensvätskor. Förekomst av DNA-positiva negativa extraktionskontroller sänker alltid förtroligheten i resultatet för de faktiska proverna. Även ett fåtal av de 17 negativa PCR-kontrollerna, PCR(-), innehållande DNA-fritt H₂O och en PCR-reagens, uppvisar resultat som tyder på kontamination och/eller ospecificitet i amplifiering.

Båda positiva extraktionskontroller med 10³ respektive 10⁷ celler/ml av "mock community", genererade positiva oljedroppar innehållande låga koncentrationer bakteriell arvsmassa. Det kan tyda på att primrarna inte är tillräckligt diskriminerande utan binder in till och amplifierar andra bakterierarter än enbart de som listas i tabell 7. De fyra positiva PCR-kontrollerna, PCR(+), bestående av en PCR-reagens och en känd spädd bakterielösning med bl.a. *Lactobacillus*, innehöll relativt höga halter amplifierat DNA vilket indikerar välfungerande amplifieringsreagenser.

Skapandet av oljedroppar i Droplet Generator fungerade bra, då endast åtta av totalt 136 prover (ca 6%) hade färre än 10 000 droppar. Av dessa kom majoriteten (fem stycken) från LPS-infuserade kor 24 timmar efter infusion, men huruvida det föreligger något samband mellan antal genererade droppar och provtyp (mjölkprov, kontrollprov), behandlingsgrupp eller tidpunkt i förhållande till infusion går inte att dra slutsatser om p.g.a. för litet underlag. I majoriteten av alla prov hade det genererats >15 000 droppar vilket ger goda förutsättningar för analys med ddPCR.

Metodologiska problem och felkällor

Djurmaterialet som denna studie bygger på är litet men sannolikt tillräckligt stort för att kunna dra vissa slutsatser om kornas respons på LPS-infusion, som är en mycket kraftfull behandling med tydliga behandlingseffekter (Hoeben *et al.*, 2000; Mehrzad *et al.*, 2001; Lehtolainen *et al.*, 2003; Zimov *et al.*, 2011). Troligtvis räcker det med fem individer per behandlingsgrupp, som i detta försök, för att med säkerhet kunna säga att LPS-infusionen är förenad med förhöjd kroppstemperatur och lokala symptom på inflammation. Djurantalet har bedömts vara tillräckligt stort även för slutsatser om bakteriologi och diversitet av LAB i mjölk i samband med mastit innan försökets start, men de metodproblem som uppkommit vid analyserna med MALDI TOF-MS och ddPCR har förhindrat dessa slutsatser. Parametrar som kan variera relativt kraftigt från dag till dag, som t.ex. celltal och eventuellt även koncentration LAB i mjölk, kräver dock troligen ett större antal individer. En liten studie som denna är ändå värdefull då det ger en fingervisning om hur LPS-infusionen är korrelerad till celltal och LAB-koncentrationer, vilket påverkar vad framtida studier ska inriktas på. För statistiska beräkningar och signifikansanalyser är djurmaterialet egentligen för litet, men har bedömts ge värdefull information i syfte att bekräfta slutsatserna om kornas respons på LPS-infusionen.

Samtliga mjölkprov som togs ut i syfte att användas för denna och övriga studier inom ramen för detta projekt, togs av en och samma person. Det ger en säkerhet i att förfarandet med förberedelser av spenen inför provtagning och själva provtagningen sett likadant ut för alla provtagningar. Även inflammationsskattningen, som är en subjektiv bedömning, gjordes av denna person och i samband med mjölkprovtagningen.

Smärtbedömningar enligt Cow Pain Scale gjordes av en och samma person och är subjektiva. Tillförlitligheten i observatörens iakttagelser hade dock ökat om hen var blindad, d.v.s. att hen var ovetandes om vilka kor som fått vilken behandling och hur många timmar eller dagar det var sedan infusionen gavs. Tillförlitligheten hade också förhöjts om ytterligare en person hade poängsatt de olika beteendeparametrarna hos korna enligt Cow Pain Scale och då gärna en veterinär med erfarenhet av att bedöma och behandla smärtsamma tillstånd hos kor.

Ingen i försöksgruppen hade tidigare erfarenhet av klinisk användning av Cow Pain Scale. Utmaningar som uppmärksammades med smärtbedömning enligt Cow Pain Scale var att positionera betraktaren så att alla aktiviteter/beteenden kunde observeras och bedömas, samtidigt som avståndet försökte hållas lika långt till samtliga kor för att inte påverka deras aktivitet/beteenden och/eller uppvisande av smärtsymptom. Det förekom också att en individ skiftade i uttryck under en och samma observationstid, d.v.s. hon kunde ena stunden vara inaktiv för att någon minut senare bli aktiv. I dessa fall registrerades det beteende som föreföll tydligast och förekom under längst tid.

Att ta ut mjölkprov för bakteriologisk undersökning är alltid förenat med vissa kontaminationsrisker. Samtliga kolonier som odlats fram på blodagar identifierades som blandflora, vilket skulle kunna förklaras av kontamination i samband med provtagningsmomentet alternativt senare hantering av proverna. Kontaminering av prover kan även ske i extraktionsförfarandet, vilket skulle kunna vara en förklaring till varför flertalet negativa extraktionskontroller har flera DNA-positiva oljedroppar enligt ddPCR.

KONKLUSIONER

Denna mindre studie bekräftar tidigare studiers slutsatser om att intramammär infusion med LPS från *E. coli* kan efterlikna delar av den biologiska respons som ses i samband med akut klinisk mastit. I denna studie påvisades förhöjt celltal, förhöjd kroppstemperatur, lokala symptom på inflammation i juvret och även symptom på smärta vid ett antal tidpunkter efter infusion. Experimentellt LPS-inducerad mastit utgör därmed en väl fungerande och tillförlitlig modell i syfte att undersöka systemiska och lokala förändringar i juvret i samband med mastit.

Det är dock inte möjligt att dra några slutsatser om studiens huvudsakliga frågeställning, förekomsten av LAB i mjölk i samband med mastit. Det beror dels på att resultaten från MALDI-TOF MS är begränsade men också oväntade, med arter av LAB som sällan identifieras i mjölkprover, dels på att data från ddPCR troligtvis är falskt positiva till följd av användning av fluorensen EvaGreen istället för prober och därmed inte reflekterar den sanna koncentrationsförändringen av LAB över tid. Det finns ett stort behov av utökade kunskaper i optimerande av ddPCR-analys avsedda för undersökning av LAB i mjölk, vilket troligen innefattar bland annat probutveckling och -utvärdering.

REFERENSER

- Adams, MR. (1998). Safety of industrial lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, 68: 171-178.
- Aguirre M. & Collins MD. (1993). Lactic acid bacteria and human clinical infection. *Journal of Applied Bacteriology*, 75: 95- 107.
- Anil, L., Anil, S.S. & Deen, J. (2005). Pain detection and amelioration in animals on the farm: issues and options. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 8(4): 261-278.
- Arroyo, R., Martín, V., Maldonado, A., Jimenéz, E., Fernández, L. & Rodríguez, J.M. (2010). Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics vs oral administration of Lactobacilli isolated from breast milk. *Clinical Infectious Diseases*, 50(12): 1551-1558.
- Belkaid, Y. & Hand, TW. (2014). Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*, 157: 121-141.
- Bio-Rad Laboratories Inc (uå). Absolute Quantification of PCR Targets with the Droplet Digital™ PCR System <http://www.bio-rad.com/en-se/applications-technologies/absolute-quantification-pcr-targets-with-droplet-digital-pcr-system> [2017-12-04].
- Bouchard S, D., Rault, L., Berkova, N., Le Loir, Y. & Even, S. (2013). Inhibition of Staphylococcus aureus invasion into bovine mammary epithelial cells by contact with live Lactobacillus casei. *Applied and Environmental Microbiology*, 79: 877-885.
- Bouchard D.S., Seridan, B., Saraoui, T., Rault, L., Germon, P., Gonzales-Moreno, C., Nader-Macias, F.M.E., Baud, D., François, P., Chuat, V., Chain, F., Langella, P., Nicoli, J., Le Loir, Y. & Even, S. (2015). Lactic acid bacteria isolated from bovine mammary microbiota; potential allies against bovine mastitis. *PLoS ONE*, 10(12):e0144831.
- Britten, A. M. (2012). The role of diagnostic microbiology in mastitis control programs. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 28: 187–202.
- Buchan, B.W., Riebe, K.M. & Ledebøer, N.A. (2012). Comparison of the MALDI Biotyper system using sepsityper specimen processing to routine microbiological methods for identification of bacteria from positive blood culture bottles. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(2): 346-352.
- Cabrera-Rubio, R., Collado, M.C., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E. & Mira, A. (2012). The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 96: 544–551.
- Carbonelle, E., Mesquita, C., Bille, E., Day, N., Dauphin, B. Beretti, J-L., Ferroni, A., Gutmann, L., Nassif, X. (2011). MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry*, 44: 104-109.
- Cherkaoui, A., Hibbs, J., Emonet, S., Tangomo, M., Girard, M., Francois, P., Schrenzel, J. (2010). *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4): 1169-1175.
- Collado, M.C., Delgado, S., Maldonado, A. & Rodríguez, J.M. (2009). Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 48: 523-528.
- Crispie, F., Alonso-Gómez, M., O'Loughlin, C., Klostermann, K., Flynn, J., Arkins, S., Meaney, W., Ross, R.P. & Hill, C. (2008). Intramammary infusion of a live culture for

treatment of bovine mastitis: effect of live lactococci on the mammary immune response. *Journal of Dairy Research*, 75: 374-384.

Dencker, A. (2009). Mjölksyrabakterier isolerade in vivo och deras hämmande effekt på tillväxten av mastitörsakande patogener in vitro

Dicksved, J. (2008). *Exploring the human intestinal microbiome in health and disease*. Diss. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet.

Donnet Hughes, A., Perez, P.F., Doré, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., Segura-Roggero, I. & Schiffrin, E.J. (2010). Potential role of the intestinal microbiota of the mother in neonatal immune education. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69: 407-415.

Dosogne, H. (1998). Defense against intramammary *Escherichia coli* infections by bovine neutrophil leukocytes during the early postpartum period: phagocytosis and detoxification of endotoxins. Ph.D. Diss., Gent University. Merelbeke, Belgium.

Espeche, M.C., Pellegrino, M., Frola, I., Larriestra, A., Bogni, C. & Nader-Macías, M.E.F. (2012). Lactic acid bacteria from raw milk as potentially beneficial strains to prevent bovine mastitis. *Anaerobe*, 18: 103-109.

Falentin, H., Rault, L., Nicolas, A., Bouchard, D.S., Lassalas, J., Lamberton, P., Aubry, J-M., Marnet, P-G., Le Loir, Y. & Even, S. (2016). Bovine teat microbiome analysis revealed reduced alpha diversity and significant changes in taxonomic profiles in quarters with a history of mastitis. *Frontiers in Microbiology*. 7:480.

Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R. & Rodríguez, J.M. (2013). The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research*, 69: 1-10.

Ferneborg, S. (2016). *Milk removal. Effect on Milk Yield, Milk Composition and Milking Efficiency in Dairy Cows*. Diss. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet.

Fitzpatrick, J.L., Young, F.J., Eckersall, D., Logue, D.N., Knight, C.J. & Nolan, A. (1998). Recognising and controlling pain and inflammation in mastitis. I: Proceedings of the British Mastitis Conference, Institute for Animal Health. Stoneleigh, Coventry. West Midlands (UK); 36-44.

Fitzpatrick, J.L., Nolan, A.M., Young, F.J., Hogarth, C., McDonald, T., Weber, A., Eckersall, P.D. & Davison, H.C. (2000). Objective measurement of pain and inflammation in dairy cows with clinical mastitis. I: Proceedings of the International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics, Breckenridge (Colorado): 73.

Frola, I.D., Pellegrino, M.S., Espeche, M.C., Giraudo, J.A., Nader-Macias, M.E.F. & Bogni, C.I. (2011). Effects of intramammary inoculation of *Lactobacillus perolens* crl1724 in lactating cows' udders. *Journal of Dairy Research*, 79: 84-92.

Ganda, E.K., Bisinotto, R.S., Lima, S.F., Kronauer, K., Decter, D.H., Oikonomou, G., Schukken, Y.H. & Bicalho, R.C. (2016). Longitudinal metagenomic profiling of bovine milk to assess the impact of intramammary treatment using a third-generation cephalosporin. *Scientific Reports*, doi: 10.1038/srep37565. [2017-11-13].

Ganda, E.K., Gaeta, N., Sipka, A., Pomeroy, B., Oikonomou, G., Schukken, Y.H. & Bicalho, R.C. (2017). Normal milk microbiome is reestablished following experimental infection with *Escherichia coli* independent of intramammary antibiotic treatment with a third-generation cephalosporin in bovines. *Microbiome*, 5:74.

- Gasser, F. (1994). Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 92: 45-67.
- Gleerup, K.B., Andersen, P.H., Munksgaard, L. & Forkman, B. (2015a). Pain evaluation in dairy cattle. *Applied Animal Behaviour Science*, 171: 25-32.
- Gleerup, K.B., Forkman, B., Lindegaard, C. & Andersen, P.H. (2015b). An equine pain face. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 42: 103-114.
- Halasa, T., Huijps, K., Østerås, O. & Hogeveen, H. (2007). Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary Quarterly*, 29(1): 18-31.
- Hardy Diagnostics (uå). *Lactobacilli MRS Agar*.
https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/LactobacilliMRS Agar.html [2017-12-02].
- Hart, B.L. (1988). Biological basis of the behavior of sick animals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 12: 123-37.
- Heikkilä, M.P. & Saris, P.E.J. (2003). Inhibition of *S. aureus* by the commensal bacteria of human milk. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 471-478.
- Heilig, H.G.H.J., Zoetendal, E.G., Vaughan, E.E., Marteau, P., Akkermans, A.D.L. & de Vos, W.M. (2002). Molecular diversity of *Lactobacillus* spp and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1): 114-123.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology*, 11:1026-1030.
- Hill, C.E. (2011). Nucleic acid isolation: overview of sample preparation methods. I: Persing, D.H., Tenover, F.C., Tang, Y-W., Nolte, F.S., Hayden, R.T. & van Belkum, A. (red), *Molecular microbiology: Diagnostic principles and practice*. 2nd ed. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 119-125. E-brary. [2017-12-07].
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 11(8): 506-514.
- Hindson, B.J., Ness, K.D., Masquelier, D.A., Belgrader, P., Heredia, N.J., Makarewicz, A.J., Bright, I.J., Lucero, M.Y., Hiddessen, A.L., Legler, T.C., Kitano, T.K., Hodel, M.R., Petersen, J.F., Wyatt, P.W., Steenblock, E.R., Shah, P.H., Bousse, L.J., Troup, C.B., Mellen, J.C., Wittmann, D.K., Montesclaros, L., Wang, S., Stumbo, D.P., Hodges, S.P., Romine, S., Milanovich, F.P., White, H.E., Regan, J.F., Karlin-Neumann, G.A., Hindson, C.M., Saxonov, S. & Colston, B. (2011). High-Throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical Chemistry*, 83: 8604-8610.
- Hoeben, D., C. Burvenich, E. Trevisi, G. Berton, J. Hamann, R. M. Bruckmaier, & J.W. Blum. (2000). Role of endotoxin and TNF α in the pathogenesis of experimentally induced coliform mastitis in periparturient cows. *Journal of Dairy Research*, 67: 503-514.
- International Association for the Study of Pain (IASP) (2011). *Pain terms*.
<http://s3.amazonaws.com/rdcms->

iasp/files/production/public/Content/ContentFolders/Publications2/ClassificationofChronicPain/Part_III-PainTerms.pdf [2017-12-30].

Jiménez, E., Fernández, L., Maldonado, A., Martín, R., Olivares, M., Xaus, J. & Rodríguez, J.M. (2008). Oral administration of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(15):4650-4655.

von Keyserlingk M.A.G., Rushen, J., de Passillé, A.M. & Weary, D.M. (2009). Invited review: the welfare of dairy cattle – key concepts and the role of science. *Journal of Dairy Science*, 92(9): 4101-4111.

Klostermann, K., Crispie, F., Flynn, J., Ross, R.P., Hill, C. & Meaney, W. (2008). Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis comparison with antibiotic treatment in field trials. *Journal of Dairy Research*, 75: 365-373.

Koskinen, M.T., Wellenberg, G.J., Sampimon, O.C., Holopainen, J., Rothkamp, A., Salmikivi, L., van Haeringen, W.A., Lam, T.J.G.M. & Pyörälä, S. (2010). Field comparison of real-time PCR and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *Journal of Dairy Science*, 93(12): 5707-5715.

Kuehn, J.S., Gorden, P.J., Munro, D., Rong, R., Dong, Q., Plummer, P.J., Wang, C. & Phillips, G.J. (2013). Bacterial community profiling of milk samples as a means to understand culture-negative bovine clinical mastitis. *PLoS ONE*, 8(4): e61959.

Leach, M.C., Klaus, K., Miller, A.L., Scotto di Perrotolo, M., Sotocinal, S.G. & Flecknell, P.A. (2012). The assessment of post-vasectomy pain in mice using behaviour and the mouse grimace scale. *PLoS ONE*, 7(4): e35656.

Lehtolainen, T., Suominen, S., Kutila, T. & Pyörälä, S. (2003). Effect of intramammary *Escherichia coli* endotoxin in early- vs. late-lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 86:2327-2333.

Leslie, K.E., Kielland, C., Millman, S.T. (2010). Is mastitis painful and is therapy for pain beneficial? I: National Mastitis Council, National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings. Madison (Wisconsin). Albuquerque (New Mexico), 114–30.

Man, J.C., Rogosa, M. & Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(1): 130-135.

Mantere-Alhonen, S. (1995). Microbiology of normal milk. I: Sandholm, M., Honkanen-Buzalski, T., Kaartinen, L. & Pyörälä, S. (red), *The bovine udder and mastitis*. Helsinki: University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, 115-120.

Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, L.M., Xaus, J., Fernández, L. & Rodríguez, J.M. (2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of Pediatrics*. 143:754-758.

Martín, R., Olivares, M., Marín, M.L., Fernández, L., Xaus, J., Rodríguez, J.M. (2005). Probiotic potential of three *Lactobacilli* strains isolated from breast milk. *Journal of Human Lactation*. 21(1): 8–17.

Martin, R., Jiménez, E., Olivares, M., Marín, M.L., Fernández, L., Xaus, J. & Rodríguez, J.M. (2006). *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair. *International Journal of Food Microbiology*, 112:35-43.

- Mehrzad, J., Dosogne, H., Meyer, E & Burvenich, C. (2001). Local and systemic effects of endotoxin mastitis on the chemiluminescence of milk and blood neutrophils in dairy cows. *Veterinary Research*, 32:131–144.
- Millman, S.T. (2007). Sickness behaviour and its relevance to animal welfare assessment at the group level. *Animal Welfare*, 16:123-125.
- Muyzer, G., de Waal, E.C. & Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3): 695-700.
- Neave, F.K. (1975). Diagnosis of mastitis by bacteriological methods alone. In: Dodd FH, Griffin TK, Kingwill RG (eds) IDF seminar on mastitis control, Reading, UK, pp 19–36
- Oikonomou, G., Bicalho, M.L., Meira, E., Rossi, R.E., Foditsch, C., Machado, V.S., Teixeira, A.G.V., Santisteban, C., Schukken, Y.H. & Bicalho, R.C. (2014). Microbiota of Cow's Milk; distinguishing healthy, sub-clinically and clinically diseased quarters. *PLoS ONE*, 9(1): e85904.
- Oikonomou, G., Machado, V.S., Santisteban, C., Schukken, Y.H. & Bicalho, R.C. (2012). Microbial diversity of bovine mastitic milk as described by pyrosequencing of metagenomic 16s rDNA. *PLoS ONE*, 7(10): e47671.
- Okafor, A.C. & Umeh, C.N. (2013). Studies on the probiotic properties of some *Lactobacillus* species isolated from local raw cow milk. *Asian Journal of Biological Sciences*, 6(6): 277-291.
- Oxoid Limited (2017a). Dehydrated *Culture Media – MRS Agar (De Man, Rogosa, Sharpe)* http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0361&org=82 [2017-12-03].
- Oxoid Limited (2017b). *Dehydrated Culture Media – Rogosa Agar*. http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0627&org=82&c=UK&lang=EN [2017-12-03].
- Perez, P.F., Doré, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., Segura-Roggero, I., Schiffrin, E.J. & Donnet-Hughes, A. (2007). Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics*, 119:e724-e732.
- Pinheiro, L.B., Coleman, V.A., Hindson, C.M., Herrmann, J., Hindson, B.J., Bhat, S. & Emslie, K.R. (2012). Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Analytical Chemistry*, 84: 1003-1011.
- Porcellato, D., Narvhus, J. & B. Skeie, S. (2016). Detection and quantification of *Bacillus cereus* group in milk by droplet digital PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 127:1-6.
- Qiagen (uå). *PCR protocols and applications*. <https://www.qiagen.com/gb/resources/molecular-biology-methods/pcr/> [2017-12-11].
- Qian, L., Song, H. & Cai, W. (2016). Determination of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* in breast milk of healthy women by digital PCR. *Beneficial Microbes*, 7(4): 559-569.
- Rainard, P. (2017). Mammary microbiota of dairy ruminants: fact or fiction?. *Veterinary Research*, 48:25.
- Reid, G. (1999). The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9): 3763-3766.

- Reid, G. (2006). Probiotics to prevent the need for, and augment the use of, antibiotics. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 17(5): 291-295.
- Reid G., Burton J., (2002). Use of Lactobacillus to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes and Infection*, 4: 319-324.
- Rinttilä, T., Kassinen, A., Malinen, E., Krogus, L. & Palva, A. (2014). Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 97:1166-1177.
- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P-E., Rolain, J.M. & Raoult, D. (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Infectious Diseases*, 49:543-551.
- Solange, J., Sánchez, M., Vera. R., Cofré, J. & Castro, E. (2011). The inhibitory activity of Lactobacillus spp isolated from breast milk on gastrointestinal pathogenic bacteria of nosocomial origin. *Anaerobe*, 17:474-477.
- Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J. & Holle, A. (2003). A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376: 952-965.
- Sun, Z., Yu, J., Dan, T., Zhang, W. & Zhang, H. (2014); Phylogenesis and Evolution of Lactic Acid Bacteria. I: Zhang, H. & Cai, Y. (red). *Lactic acid bacteria – fundamentals and practice*. kap 1. Springer Dordrecht Heidelberg New York London, 1-3. Tillgänglig: E-brary. [2017-12-07].
- SVA (2017-04-07). *Mastit orsakad av Escherichia coli hos nötkreatur*. <http://www.sva.se/djurhalsa/notkreatur/endemiska-sjukdomar-notkreatur/mastit-notkreatur/mastit-orsakad-av-escherichia-coli-notkreatur> [2017-12-05].
- SVA (2016-05-19). *PCR-metoden*. <http://sva.se/analyser-och-produkter/pcr-metoden> [2017-12-05].
- SVA (2015-03-16). *Diagnostik av mjölkprover med hjälp av maldi-tof*. www.sva.se/analyser-och-produkter/analyser-av-djur-och-foder/notkreatur/mastit-notkreatur/diagnostik-av-mjolkprover. [2017-12-05].
- Vankerckhoven, V.V., Autgaerden, T.V., Huys, G., Vancanneytm N. Swings, J. & Goossens, H. (2004). Establishment of the PROSAFE collection of probiotic and human lactic acid bacteria. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 16:131-136.
- van Veen, S.Q., Claas, E.C. & Kuijper, E.J. (2010). High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDITOF MS) in routine medical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(3):900-907
- Weary, D.M., Niel, L., Flower, F.C. & Fraser, D. (2006). Identifying and preventing pain in animals. *Applied Animal Behaviour Science*, 100:64-76.
- Walter, J., Hertel, C., Tannock, G.W., Lis, C.M., Munro, K. & Hammes, W.P. (2001). Detection of Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc and Weissella species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6): 2578-2585.

Witte, A.K., Mester, P., Fister, S., Witte, M., Schoder, D. & Rossmanith, P. (2016). A systematic investigation of parameters influencing droplet rain in the *Listeria monocytogenes* prfA assay - reduction of ambiguous results in ddPCR. *PLoS ONE*, 11(12): e0168179.

Woodward, W.D., Besser, T.E., Ward, A.C.S. & Corbeil, L.B. (1987). In vitro growth inhibition of mastitis pathogens by bovine teat skin normal flora. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 51:27-31.

Young, W. Hine, B.C., Wallace, O.A.M., Callaghan, M. & Bibiloni, R. (2015). Transfer of intestinal bacterial components to mammary secretions in the cow. *PeerJ*, 3:e888

Zhang, R., Huo, W., Zhu, W. & Shengyoung, M. (2015). Characterization of bacterial community of raw milk from dairy cows during subacute ruminal acidosis challenge by high-throughput sequencing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95: 1072-1079.

Zimov, J.L., Botheras, N.A, Weiss, W.P. & Hogan, J.S. (2011). Associations among behavioural and acute physiologic responses to lipopolysaccharide-induced clinical mastitis in lactating dairy cows. *American Journal of Veterinary Research*, 72(5):620-627.