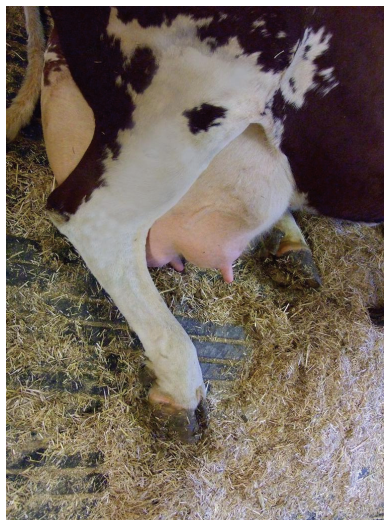




Komjölakens sammansättning vid mastit

– under och efter avslutad antibiotikabehandling

Madeleine Thorngren



Examensarbete

Institutionen för Livsmedelsvetenskap

Publikation nr 278

Swedish University of Agricultural Sciences
Department of Food Science

Uppsala 2010

Självständigt arbete 30 högskolepoäng, agronomprogrammet, SLU

Titel:

Komjölakens sammansättning vid mastit– under och efter avslutad antibiotikabehandling

Student:

Madeleine Thorngren

Handledare:

Åse Sternesjö, Maria Åkerstedt & Lotta Wall, inst. för Livsmedelsvetenskap, avd. mjölkproduktlära, SLU

Examinator:

Anders Andrén, inst. för Livsmedelsvetenskap, avd. mjölkproduktlära, SLU



Komjölakens sammansättning vid mastit

– under och efter avslutad antibiotikabehandling

Madeleine Thorngren

Handledare: Åse Sternesjö, Maria Åkerstedt & Lotta Wall, SLU
Examinator: Anders Andrén, SLU

Institutionen för Livsmedelsvetenskap

Publikation nr 278

Swedish University of Agricultural Sciences
Department of Food Science

Uppsala 2010

Förord

Detta examensarbete är utfört vid Institutionen för livsmedelsvetenskap, Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU) i Uppsala. Vid institutionen bedrivs bl.a. forskning och undervisning angående mjölkens sammansättning samt dess kemiska, mikrobiella och näringsmässiga egenskaper.

Agronomprogrammet är en universitetsutbildning som omfattar fyra och ett halvt års heltidsstudier vilket motsvarar 270 högskolepoäng. Utbildningen ges vid SLU i Uppsala och innehåller fem olika inriktningar; ekonomi, husdjur, landsbygdsutveckling, livsmedel samt mark och växt. Studierna avslutas med ett obligatoriskt examensarbete inom valfritt ämne och kan ha formen av ett försök som utvärderas eller enbart i form av litteratur som analyseras. Examensarbetet sammanställs i en skriftlig rapport och presenteras muntligt vid ett seminarium med opponering. Arbetsinsatsen skall motsvara 20 veckors heltidsstudier á 30 högskolepoäng.

Kor är ett naturligt inslag i agronomprogrammet med husdjursinriktning. Där ingår studier om skötsel, omvårdnad samt avel och utfodring. När jag fick stifta närmare bekantskap med mjölk, ett av de livsmedel som kor producerar blev jag så fascinerad att jag blev tvungen att förkovra mig ännu mer i detta ämne. Resultatet kan ni läsa i denna uppsats.

Examinator har varit professor Anders Andrén och akademisk handledare har varit professor Åse Sternesjö. Biträdande handledare har varit forskare Maria Åkerstedt och laboratorieassistent Lotta Wall.

Ett varmt tack till

Åse Sternesjö för många kloka synpunkter och för att du alltid tog dig tid. Maria Åkerstedt för hjälp med beräkningar och värdefulla tips på hur jag kunde presentera mina resultat. Lotta Wall för all hjälp under arbetets gång, med insamling av prover och bearbetning av dessa på labb.

Ett särskilt tack till

Personal på Kungsängens forskningscenter och Jälla Gård som hjälpte mig med all provtagning och inte minst alla kor som bidrog med mjölk till projektet.

Ultuna maj 2010

Madeleine Thorngren

ABSTRACT

Mastitis is the most common production disease in Swedish dairy cows and approximately half of the cows are annually affected by mastitis. A clinical mastitis (visual symptoms) often causes a severe inflammation in the udder and the secretory tissue may have been seriously damaged. The result of this reduces the milk yield and affects the composition of milk. This influences the economy in a negative way for the individual farmer as well as for the dairy industry, with less dairy products of a lower quality and storage stability. A clinical mastitis is usually treated with antibiotics and it is prohibited to deliver the milk to the dairy during the treatment period and the prescribed withdrawal time, i.e. the time it takes for residues to reach below the permitted levels (MRL, maximum residue limits). Withdrawal periods for antibiotics are only designed from a toxicological perspective and there is lack of information regarding how long time the composition of milk is affected. The purpose of this study was therefore to examine the composition of milk from seven cows of SRB (Swedish Red Cattle) and Swedish Holstein breed that were treated with antibiotics against clinical mastitis. The study lasted throughout the whole treatment period, the subsequent withdrawal period and five days after the withdrawal period when the milk were delivered to the dairy. The experiment was performed at two research farms in Uppsala, Kungsängens Research Center, Department of Animal Nutrition and Management and Jälla Farm, Department of Animal Genetics. The total amount of protein, lactose and fat in milk and whey protein fraction were analyzed by infrared spectroscopy (MilkoScanTM FT 120). The numbers of somatic cells were analyzed by fluorescence based electronic cell counting (Fossomatic 5000). The presences of antibiotics and other inhibitory substances (detrimental for starter activities) were analyzed with Delvotest[®] and Betastar[®]. The result indicates that the composition and number of somatic cells were within normal levels at the end of the withdrawal period. There is a possibility that the values for milk composition and milk yield would have been higher if the cows not had fallen ill with mastitis but it is difficult to prove without a significant reference value.

SAMMANFATTNING

Mastit utgör den vanligast förekommande produktionssjukdomen hos svenska mjölkkor och uppskattningsvis hälften av korna drabbas årligen av mastit. En klinisk mastit (synliga symptom) orsakar ofta en kraftig inflammation i juvret och den sekretoriska vävnaden kan ha blivit utsatt för en allvarlig skada. Resultatet av detta innebär en minskad avkastning och förändringar i mjölkens sammansättning. Detta påverkar i sin tur ekonomin negativt för den enskilde bonden såväl som för mejeriindustrin, med ett minskat produktutbyte, sämre kvalitet och lagringsstabilitet som följd. En klinisk mastit behandlas vanligen med antibiotika och under den fastställda karenstiden, det vill säga den tid som behövs för att restsubstanserna ska underskrida de tillåtna gränsvärdena (MRL, maximum residue limits) är det förbjudet att leverera mjölken till mejeriet. Karenstiderna för antibiotika är endast utformade ur ett toxikologiskt perspektiv och det saknas information angående hur länge mjölkens sammansättning påverkas. Syftet med denna studie var därför att på heljuvernivå undersöka mjölkens sammansättning hos sju kor av rasen SRB (svensk röd och vit boskap) och svensk Holstein som behandlades med antibiotika mot klinisk mastit. Studien pågick under hela behandlingsperioden, påföljande karensperiod och ytterligare fem dagar efter karensperiodens utgång då mjölken åter levererades till mejeriet. Försöket utfördes vid två försöksgårdar i Uppsala, Kungsängens forskningscentrum, Institutionen för husdjurens utfodring och vård och Jälla Gård, Institutionen för husdjursgenetik. Den totala mängden protein, laktos och fett i mjölken samt protein i vasslefraktionen analyserades med IR spektroskopi (MilkoScanTM FT 120). Celltalet analyserades med elektronisk fluorescensbaserad cellräkning (Fossomatic 5000). Förekomst av antibiotika och andra syrningshämmande ämnen analyserades med Delvotest[®] och Betastar[®]. Resultatet tyder på att sammansättningen och celltalet låg inom normala nivåer vid karenstidens utgång. Möjligtvis skulle värdena för mjölkens sammansättning och avkastning varit högre om korna inte insjuknat i mastit, men det är svårt att bevisa utan något egentligt referensvärde.

Innehåll

INTRODUKTION	7
Inledning	7
Bakgrund.....	7
Syfte.....	8
Hypotes.....	8
LITTERATURSTUDIE	9
Mjölken och dess beståndsdelar	9
Protein	11
Laktos.....	12
Fett	12
Celltal	13
Mastit	13
Antibiotikabehandling av mastit.....	14
MATERIAL OCH METODER.....	15
Försöksupplägg	15
Gårdar	15
Kor.....	15
Provtagning och analyser	16
Analysmetoder	17
Protein, laktos och fett.....	17
Kasein och vassleprotein.....	19
Celltal	19
Antibiotika och andra syrningshämmande ämnen	19
Bearbetning av data.....	20
RESULTAT	21
Avkastning	21
Totalprotein, kasein och vassleprotein	21
Kaseintal	23
Laktos	24
Fett.....	24
Celltal	25
Totalprotein, kasein, vassleprotein, laktos och celltal	25
Antibiotika och andra syrningshämmande ämnen	28

DISKUSSION	29
SLUTSATS	31
REFERENSER	32
Bilaga 1.....	34

INTRODUKTION

Inledning

Examensarbetets syfte var att undersöka sammansättningen hos mjölk från kor som behandlades med antibiotika mot klinisk mastit. Försöket pågick under hela behandlingsperioden, påföljande karenperiod samt fem dagar efter karenperiodens utgång då mjölken fick levereras till mejeriet. Karenstiderna för antimikrobiella läkemedel är endast utformade ur ett toxikologiskt perspektiv och det saknas information angående hur mjölkens sammansättning ser ut vid utgången av sista karensdag. En klinisk mastit orsakar ofta en kraftigt inflammatorisk respons och juvret kan ha blivit utsatt för en allvarlig skada i den sekretoriska vävnaden. Det finns därför en ökad risk att mjölkens sammansättning inte är normaliserad vid karenstidens utgång. Intressegrupper för denna studie skulle kunna vara den enskilde lantbrukaren som får betalt för olika kvalitetsparametrar i mjölken, mejeriföretag som vill kunna framställa bra mejeriprodukter och sist men inte minst varje konsument som betalar för att få en säker och högkvalitativ produkt.

Bakgrund

Varje dag levereras det färsk mjölk till ca 35 olika mejerier runt om i Sverige. Mjölken produceras av drygt 360 000 mjölkkor fördelade på runt 6000 mjölgårdar (Svensk mjölk, 2010). Mjölken har ökat i popularitet och används allt oftare som ingrediens och smaksättare till olika sorters kaffe. En ökad efterfrågan på mjölk innebär även ett ökat intresse för livsmedlet och idag är lokalproducerad och ekologisk mjölk på frammarsch. Konsumenternas intresse och medvetenhet för rena livsmedel och en hållbar livsmedelsproduktion ställer krav på såväl livsmedelsbranschen som den enskilda lantbrukaren (Andersson, 2009).

Mjolksektorn är utsatt för en hårdnande konkurrens nationellt såväl som internationellt. Ekonomiskt effektiva besättningar är därför nödvändiga för att en stark och hållbar mjölkproduktion i Sverige ska kunna upprätthållas. Det är viktigt att se över produktionskostnader i synnerhet som produktvärdet minskar. Ett sätt att göra det är att reducera förekomsten av produktionssjukdomar. Den vanligaste utslagningsorsaken bland svenska mjölkkor är kopplade till juversjukdomar. Mastit (juverinflammation) är den vanligast förekommande och under 2009 behandlades uppskattningsvis 20 % av de svenska mjölkorna mot mastit (Svensk mjölk, 2010).

Uppkomsten av mastit kan ha infektiösa såväl som mekaniska orsaker. Infektiösa orsaker är i regel patogena (sjukdomsalstrande) bakterier som infekterar juvret genom spenkanalen och på så vis orsakar mastit. Mekaniska skador kan uppkomma av exempelvis mjölkkningsorgan eller klövtramp. Även sådana skador leder oftast till en infektiös mastit (Nielsen, 2009). Vid en mastit påverkas mjölkens sammansättning, utseende och smak på ett negativt sätt. En indikation på den inflammatoriska processen är att antalet vita blodkroppar (celltalet) ökar i mjölken

liksom halten vassleprotein och salthalten medan laktos och kaseinhalten minskar (Hortet & Seegers, 1998).

Den vanligaste terapiformen vid behandling av klinisk mastit är med olika sorters antibiotika (Heringstad *et al.*, 2000). Under och efter avslutad antibiotikabehandling är det inte tillåtet att leverera mjölken under den för varje läkemedelsprodukt fastställda karenstiden. Det är den tid som behövs för att rests substanserna av eventuell antibiotika skall underskrida de tillåtna gränsvärdena, maximum residue limits, MRL (EEG nr 2377/90).

Syfte

Syftet med detta examensarbete var att undersöka mjölkens sammansättning och avkastning hos sju kor som behandlades med antibiotika mot klinisk mastit. Studien pågick under hela behandlingsperioden, påföljande karensperiod samt fem dagar efter karensperiodens utgång då mjölken åter levererades till mejeriet.

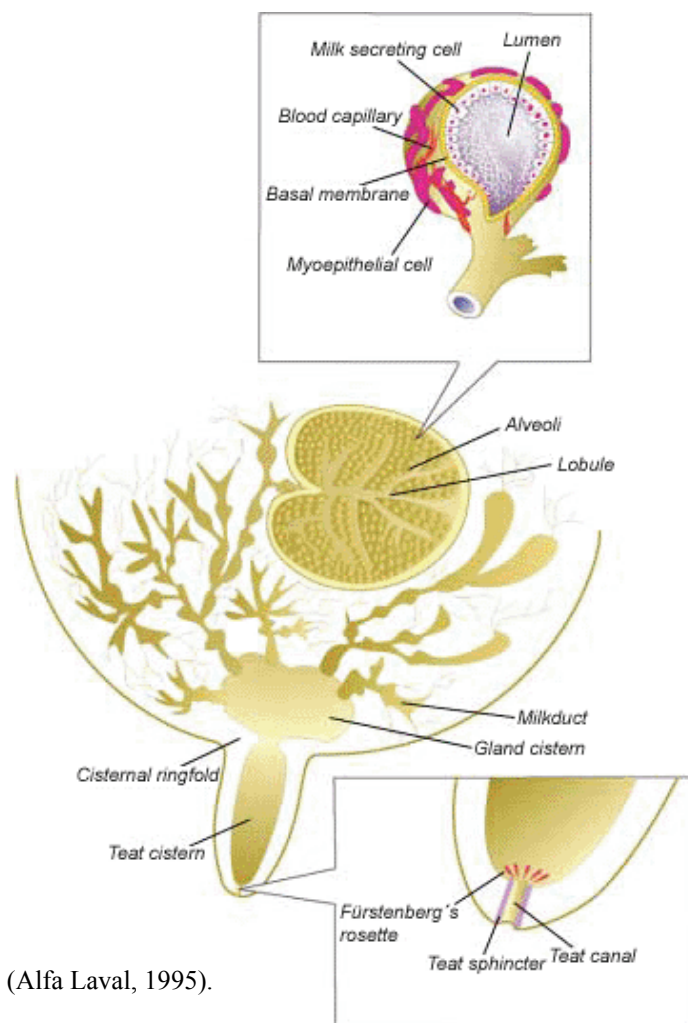
Hypotes

Hypotesen var att karenstiderna vid antibiotikabehandlad mastit inte var tillräckliga för att mjölkens sammansättning skulle hinna återgå till det normala.

LITTERATURSTUDIE

Mjölken och dess beståndsdelar

Mjolk är det livsmedel som bildas av däggdjurshonan för att ge näring till avkomman. Mjölken är specifik för varje art och innehåller allt som ungen behöver för tillväxt och underhåll under perioden den diar. Hos alla däggdjur av honligt kön finns det mjölkkörtlar. Dessa är från början omvandlade svettkörtlar. Korna har fyra åtskilda mjölkkörtlar sammansatta i ett juver med varsin spene. Mjölken bildas i de sekretoriska cellerna som i sin tur består av körteleblåsor (alveoler). En alveol är klädd med ett lager sekretoriska celler som bildar ett hålrum. Alveolen omges av blodkapillärer och muskelceller vilket gör att den kan dras samman, se figur 1. Från alveolen pressas mjölken ut i mjölkgångarna som i sin tur mynnar ut i juvercisternen, spencisternen och slutligen spenkanalen (Nilsson, 2009). Där spenkanalen och spencisternen möts sitter den Fürstenbergska rosetten. Den består av ett antal längsgående veck som anses ha betydelse i juvrets immunförsvar. Runt spenkanalen finns längsgående cirkulära glatta muskelfibrer som hjälper till att hålla spenkanalen stängd mellan mjölkningarna. Ett ytterligare skydd mot patogena bakterier är den keratinliknande substans som täcker spenkanalen (Sandholm *et al.*, 1995).



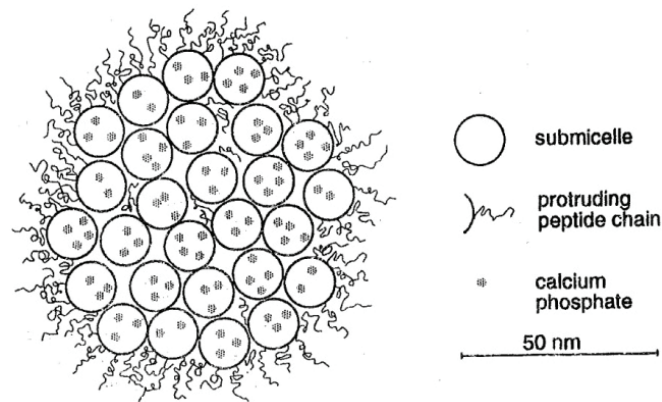
Figur 1. Juvrets anatomi (Alfa Laval, 1995).

Mjölkbildningen sker genom att näringsämnen förs med blodet in i de sekretoriska cellerna och det krävs ungefär 500 liter blodpassage för att bilda en liter mjölk (Sjaastad *et al.*, 2003). Mängden mjölk som bildas styrs av antalet och aktiviteten hos de sekretoriska cellerna. Normalt sker en avkastningsökning under två till åtta veckor i början på laktationen, för att sedan successivt avta till slutet av laktationen (Harding, 1999). Huvudbeståndsdelarna i mjölk är vatten, protein, fett, laktos (mjölksocker), vitaminer och mineraler. Laktos och protein bildas i de sekretoriska cellerna, medan mjölkfettet både bildas i de sekretoriska cellerna (de korta fettsyror) och tillförs från blodet (de långa fettsyror). Mineraler, vitaminer och vatten transporteras direkt från blodet och passerar in i mjölken. I torrsubstansen finns näringsämnen och därför är det önskvärt med en hög torrsubstans, vilket även medför ett högre utbyte per liter mjölk vid framställning av olika mejeriprodukter (Nilsson, 2009). Mjölakens beståndsdelar finns i tre olika faser: äkta lösning, kolloidal lösning och emulsion, beroende på storlek på partiklarna och vilken förmåga de har att lösa sig i vattnet. Fettet i mjölken befinner sig i en emulsion, det innebär att två vätskor inte kan lösa sig med varandra. Fettkulorna är dispergerade i vattenfasen tack vare ett skyddande flerskiktsmembran. Proteinerna befinner sig i den kolloidala fasen vilket innebär att partiklarna svävar fritt i en vätska. Laktos, vattenlösliga vitaminer, salter och lösliga proteiner (enzymer och vassleproteiner) finns i den äkta lösningen (Jonsson *et al.*, 2007). Laktos och mjölkfett ger ungen energi medan mjölkprotein används för tillväxt (Björnhag, 2004). Mjölakens sammansättning hos kor varierar. Det skiljer sig mellan olika raser men även inom och mellan individer av samma ras. Laktationsstadium, ålder, juverhälsa och utfodring är exempel på andra parametrar som spelar in (Nilsson, 2009).

Protein

Mjölks proteiner bildas av aminosyror som kommer från blodet. Ursprunget till aminosyrorna är dels mikrobprotein från fodrets råprotein som bildats i våmmen, dels från svårlösliga proteiner i fodret som spjälkats i löpmagen och tunntarmen (Nilsson, 2009). Mjolkproteinerna brukar indelas i olika klasser beroende på dess kemiska och fysiologiska egenskaper. Klassindelningen är kaseiner och vassleproteiner, enzymer och andra proteiner med specifika funktioner (Sjaastad *et al.*, 2003). Mjölks protein utgörs uppskattningsvis till 80 % kasein och 20 % av vassleprotein (Sandholm *et al.*, 1995). Medelhalten för totalprotein utgjordes under 2008 av 3,5 % för SRB-kor och 3,3 % för Holsteinkor (Svensk mjölk, 2010).

Kasein är ett fosforylerat protein som binder kalcium. Ungefär 65 % av det totala innehållet av kalcium i mjölken är bundet till kasein. Kasein finns i tre huvudgrupper, alfa (α)-, beta (β)- och kappa- (κ) kasein. Kaseinerna består av olika strukturer och har därmed olika biokemiska egenskaper (Sjaastad *et al.*, 2003). I mjölken förekommer kasein som stora aggregat (miceller). Varje micell är uppbyggd av mindre submiceller och hela micellstrukturen hålls samman med kalciumfosfatbryggor, se figur 2. Ytterst på micellen finns utstickande hydrofila kedjor vilka till stor del utgörs av κ -kasein (Andersen, 1993). Kasein är det protein som koagulerar vid tillsats av syror eller enzymet kymosin som finns i löpe. Det är därmed kasein som fälls ut vid osttillverkning och det är mängden och kvaliteten på kaseinet som påverkar konsistensen och ostutbytet. Vassleproteiner är de proteiner som kvarstår i lösning då kaseinet fällts ut (Andersen, 1993).



Figur 2. Kaseinmicellen är uppbyggd av mindre submiceller. Ytterst på strukturen sitter de polära kedjorna (Walstra, 1999).

De viktigaste vassleproteinerna är beta (β)-laktoglobulin, alfa (α)-laktalbumin, immunoglobuliner och serumalbumin. β -laktoglobulin utgör den största delen av vassleproteinerna men har ingen känd regulatorisk funktion. α -laktalbumin utgör den näst största andelen av vassleproteinerna och tillsammans med andra enzymer medverkar den i biosyntesen av laktos (Sandholm *et al.*, 2005). Immunoglobuliner är antikroppar som framförallt bildas i blodet och sedan transporteras aktivt från blod till mjölk. De finns i en låg koncentration i vanlig mjölk, men i mycket höga halter i råmjölken (kolostrum). Från komjölk har man isolerat fyra isotoper av immunoglobuliner, IgG, IgA, IgM och IgE (Sandholm *et al.*, 1995). IgA är viktig för immunförsvaret i juvret, men även hos den nyfödda kalven där den tas upp i tunntarmen de tre första dagarna (Sjaastad *et al.*, 2003).

Enzymer är proteiner med en speciell funktion. Vissa typer av enzymer ingår normalt i mjölken, exempelvis laktoperoxidas, katalas, fosfatas, proteas och lipas (Jonsson *et al.*, 2007), medan andra typer av enzymer ökar vid mastit. Ett viktigt enzym som ofta finns i mjölk med ett högt celltal är plasmin. Förstadiet till plasmin, finns i blodplasman, plasminogen. Plasmin kan tillsammans med andra enzymer bryta ned proteinet kasein vilket kan innebära en stor minskning av kaseinhalten (Harding, 1999). De enzymer som härrör från bakterier är uppdelade i grupper beroende på vilket ämne de påverkar. Grupperna är fettspjälkande enzymer (lipas), laktosspjälkande enzymer (laktas), proteinspjälkande enzymer (proteas), samt reducerande och oxiderande enzymer. Vissa av enzymerna finns kvar även om bakterien dör vilket kan orsaka problem för mejeriindustrin vid exempelvis osttillverkning (Jonsson *et al.*, 2007).

Laktos

Laktos är en diasaccarid bestående av en glukos och en galaktosmolekyl sammanlänkade med en β -1-4 glykosidbindning. I Golgiapparaten formas laktos och därefter utsöndras den i mjölken tillsammans med protein (Sjaastad *et al.*, 2003). Laktos är den främsta osmotiska regulatorn i mjölken, men även natrium, klorid, och kalium spelar in (Phillips, 2006). Vid bildning av laktos strömmar vatten från blodet in i alveolcellen för reglering av det osmotiska trycket. Plasmans joner följer då med vätskan. En del av dessa joner måste sedan pumpas ut för att behålla en jämvikt. Natriumjonerna pumpas tillbaka med en aktiv natriumkaliumpump. En del kloridjoner följer då med ut och en mindre mängd kaliumjoner går in för att bibehålla en elektrisk neutralitet. I alveolcellerna bildas således hela mjölkens vattenfas (Björnhag, 2004). En viss mängd laktos som bildats kräver en viss mängd vatten. Det innebär att mängden producerad mjölk styrs av hur mycket laktos som bildas (Nilsson, 2009). Laktoshalten i mjölk varierar mellan 3,5–5,5 % (Sandholm, 1995).

Fett

Mjölkfettet förekommer i mjölken i form av mikroskopiskt små fettkulor omgärdade av ett membran. Fettet består till 97-98% av triglycerider vilka är uppbyggda av en glyceroldel och tre fettsyror. Resterande del består av fosfolipider och kolesterol som utgör en stor del av membranet (Sjaastad *et al.*, 2003). Membranskiktet är 0,01 μ m tjockt och skyddar fettet från att brytas ned av mjölkens lipas (Jonsson *et al.*, 2007). Den största andelen fettsyror i mjölken utgörs av palmitinsyra (C16:0), oljesyra (C18:1), myristinsyra (C14:0) och stearinsyra (C18:0). Halten fleromättade fettsyror är förhållandevis låg i mjölkfett. Det beror på att mikroorganismerna i vämnen hydrogenerar de fleromättade fettsyrorerna till mättade fettsyror vilket även leder till uppkomsten av transfettsyror. Sammansättningen av fettsyrorerna varierar med årstiden då korna får olika föda. Under sommaren då korna äter färskt gräs innehåller mjölken mer omättat fett än under vintern (Andersen, 1993). Ungefär hälften av fettsyrorerna i mjölken bildas genom *de novo* syntes i alveolernas epitelceller och hälften av fettsyrorerna tas upp direkt från blodet (Sjaastad *et al.*, 2003). Idisslarna använder huvudsakligen ättiksyra från fodrets jäsning i vämnen för fettbildning i alveolcellerna. Glukos är utgångsmaterial vid bildandet av glycerol. Den färdiga fett droppen vandrar genom cytoplasman i den sekretoriska cellen och avknoppas från cellen genom att bukta ut cellmembranet tills den är helt omgiven av membran och sedan avsnörs den. Membranet är elektriskt laddat vilket gör att fettkulorna repellerar varandra. Fettet hålls en stund i en suspension men då gravitationen är större än kraften från de elektriska laddningarna samt att fett har en lägre densitet än vatten så flyter fett så småningom upp till ytan på mjölken (Björnhag, 2004). År 2008 var medelhalten fett 4,3 % för SRB-kor och 4,0 % för Holsteinkor (Svensk mjölk, 2010).

Celltal

Det finns alltid en viss mängd somatiska celler (celltal) i mjölken. Dessa anges som antalet celler per ml mjölk (Harding, 1999). En frisk ko förväntas ha ett celltal under 100 000 celler/ml mjölk men förändringar i mjölkens sammansättning har observeras vid celltal över 50 000 celler/ml mjölk på juverfjärdedelsnivå (Forsbäck *et al.*, 2009). En ökning av celltalet kan påvisa en infektion i juvret, oftast orsakad av bakterier. Då ökar de vita blodkropparna, främst de polymorfonukleäreutrofila (PMN) leukocyterna i blodet som ett skydd mot infektionen. Dessa förs med blodet och ansamlas i kapillärerna utanför de sekretoriska cellerna i alveolerna innan de tar sig in mellan cellerna och in i mjölken vilket ger ett högre celltal (Harding, 1999). Antalet celler är ett mått på juvrets hälsa och används även som en indirekt parameter för mjölk kvaliteten (Sjaastad *et al.*, 2003). Antalet celler brukar vara högt i samband med kalvning men sjunker därefter snabbt (1-2 veckor) och kan sedan öka igen i slutet av laktationen. Antalet celler påverkas av exempelvis antal laktationer, stress och årstid. En frisk ko har övervägande celler som domineras av makrofaggruppen, medan en ko med mastit har övervägande neutrofila granulocyta celler. Det finns olika metoder att mäta celltalet i mjölk, indirekt i fält med California Mastitis Test (CMT) och direkt med Fossomatic cellräknare på laboratorium (Sandholm *et al.*, 1995).

Mastit

Juvinflammation är en sammanfattande benämning på de reaktioner som uppstår i juvret till följd av en juverskada. Mastiter delas in i infektiösa (vanligast), traumatiska och toxiska beroende på den skadegörande faktorn. De infektiösa skadorna orsakas av att bakterier tränger in i juvret via spenkanalen och börjar föröka sig. De bildar därefter toxiner som skadar juvervävnaden. Skadorna kan bland annat orsaka störd ämnesomsättning, nedsatt vitalitet och vävnadsdöd. Till de traumatiska skadorna hör exempelvis spentramp och taggtrådsskador på spenar och juver. Skadorna utgörs av sår i spenarnas och juvrets hud, i slemhinnan på spenkanalen, bristningar, blödningar och krosskador i vävnaderna. Toxiska skador orsakas av toxiner som bildas i magar och tarmar på grund av funktionsstörningar. De kan uppstå vid utfodring av fodermedel av dålig hygienisk kvalitet men även vid snabb övergång till nya fodermedel. Toxinerna förs ut till kroppens alla delar via blodet (Anon, 1986). Mastiter delas in i kliniska (synliga symtom) och subkliniska (utan synliga symtom). De kliniska mastiterna är lättare att upptäcka då kon ofta får feber och juvret kan bli rött och svullet samt visa tecken på smärta. Mjölken kan innehålla synliga förändringar som flockor och även blod. Kliniska mastiter är vanligast i början av laktationen. Subkliniska mastiter upptäcks av ett ökat celltal alternativt av den mikrob som ger upphov till mastiten (Andrews *et al.*, 2004).

Det finns många olika bakterier som kan orsaka mastit och nedan beskrivs endast de bakterier som förekom i mjölken hos korna i försöket.

Staphylococcus (S.) aureus anses som den mest betydelsefulla bakterien för uppkomst av både subklinisk och klinisk mastit i flera länder. De viktigaste källorna vid infektion är juver och spenar men den finns även på tonsiller och slemhinnor. Bakterien är mycket smittsam (Andrews *et al.*, 2004).

Streptococcus (Str.) dysgalactiae finns i den omgivande miljön och associeras ofta med dålig juverhälsa och sår. Kvigor och sinkor drabbas oftare. Dålig hygien och juverskador ger oftare en ökning av bakterien som även kan finnas på tonsiller och genitalier. Ett bra sätt att undvika smitta är desinfektion av juvret då bakterien ofta sprids från ko till ko (Andrews *et al.*, 2004).

Str. uberis är i vissa besättningar den främsta orsaken till klinisk mastit. Bakterien finns främst i den omgivande miljön och är vanlig i träck och strömedel. Den ger ofta upphov till kroniska mastiter (Andrews *et al.*, 2004).

Koagulasnegativa staphylococcer (KNS) finns ofta i låg dos även om de förekommer vid kliniska sjukdomar. De orsakar ofta ett något högre celltal vilket ökar resistensen mot andra mikrober. De kan kolonisera spenkanalen och många arter har isolerats från aseptiskt samlade mjölkprover (Andrews *et al.*, 2004).

Antibiotikabehandling av mastit

Namnet antibiotika kommer från grekiskan och betyder *anti*-mot och *bios*-liv. Det är ett läkemedel som används för att behandla infektioner av bakteriell uppkomst. Medicinen måste oskadliggöra bakteriecellen (prokaryot) utan att skada den mänskliga- eller djurcellen (eukaryot). Antibiotika som hindrar eller förstör uppbyggnaden av cellväggen hos bakterier tillhör de mest använda läkemedlen och den största gruppen kallas betalaktamantibiotika (Boden, 2005).

I denna studie användes två antibiotika, Penovet[®] och Ethacilin[®] vilka båda ingår i gruppen betalaktamantibiotika. Vissa av korna i studien fick även läkemedlet Metacam[®] som används som understödjande terapi i kombination med antibiotikabehandling vid akuta mastiter. Penovet[®] har den aktiva substansen bensylpenicillin medan Ethacilin[®] har den aktiva substansen bensylpenicillinprokain. Båda tillhör gruppen penicillinaskänsliga penicilliner (smalt spektrum) med en baktericid (bakteriedödande) effekt och de angriper i cellväggssyntesen. Normaldosering för båda preparaten är 20 mg/kg kroppsvikt och behandlingen pågår under minst tre dagar. Karenstiden för mjölk är sex dygn (Fass, 2007). Metacam[®] har den verksamma substansen meloxicam och tillhör gruppen oxikam. Den har antiinflammatoriska, antiexsudativa (vätskedrivande) och antipyretiska (febernedsättande) effekter. Den hjälper även till att minska infiltrationen av leukocyter (vita blodkroppar). Normal behandling är 0.5 mg meloxicam/kg kroppsvikt under ett behandlingstillfälle. Karenstiden för mjölk är fem dagar (Fass, 2007).

MATERIAL OCH METODER

Försöksupplägg

Provperioden sträckte sig från den 4 augusti 2009 då de två första korna i försöket fick behandling mot antibiotika och avslutades den 26 oktober 2009 med provtagning av den sjunde och sista kon i försöket.

Gårdar

Studien utfördes vid två försöksgårdar i Uppsala där SLU bedriver forskning och undervisning. Dessa två gårdar valdes för att de ligger på ett geografiskt fördelaktigt avstånd och för att personalen är van att assistera under olika forskningsprojekt. Två gårdar valdes för att få ihop ett tillräckligt stort djurantal under en begränsad tid.

Kungsängens forskningscentrum, Institutionen för husdjurens utfodring och vård (HUV), ligger belägen söder om Uppsala. På anläggningen bedrivs forskning och utbildning om nötkreatur. Försöksanläggningen ägs av SLU och det finns cirka 110 mjölkkor plus cirka 70 rekryteringskvigor av rasen SRB. Stallet har konventionellt inhysta kor i kortbås samt ett lösdriftsstall med ett automatiserat mjölkningssystem från DeLaval. I det konventionella stallet mjölkades korna två gånger per dag, på morgonen cirka 06³⁰ och på eftermiddagen cirka 15³⁰. Mjölkningsen utfördes med ett duovac-system (MU 350) från DeLaval. Djuren utfodrades *ad libitum* med grovfoder (ca 11,5 MJ/kg ts) fyra gånger per dag och kraftfoder (15 MJ/kg ts) anpassat efter laktationsperiod och underhåll (Patel., pers. medd., 2009).

Jälla Gård, Institutionen för husdjursgenetik, ligger belägen nordöst om Uppsala. På gården bedrivs naturbruksgymnasium samt forskningsförsök på uppdrag av SLU. Gården har cirka 100 mjölkkor av rasen svensk Holstein och SRB samt uppfödning av ett 100-tal rekryteringskvigor. Alla mjölkkor i normal produktion står i den nybyggda lösdriften medan sin- och mastitkor står inhysta i den äldre konventionella ladugården med kortbås. Korna mjölkades två gånger dagligen i den äldre avdelningen. Första mjölkpasset började klockan 05⁰⁰ på morgonen och sista passet började 15³⁰ på eftermiddagen. Mjölkningssystemet bestod av ett automatiserat duovac[®] system från DeLaval (MU 210D). På Jälla Gård utfodrades djuren med fullfoder tre gånger per dag (5MJ/kg ECM) för produktion samt tillägg för underhåll (Franzén.,pers.medd., 2009).

Kor

Totalt ingick sju kor med diagnostiserad klinisk mastit i studien. Från Kungsängens forskningscentrum ingick tre SRB kor i försöket och från Jälla Gård ingick två SRB kor och två svenska Holstein kor i försöket. Sex kor behandlades under fem dagar med antibiotika med en karenstid på sex dagar. En ko behandlades med antibiotika i sex dagar och fick därför en förlängd karenstid till åtta dagar. Sex av de sju korna var nykalvade och var därmed i början av sin laktationsperiod. Undantaget var ko nummer fem som var i slutet av sin laktationsperiod, se tabell 1.

Tabell 1. Sjukdomsalstrande patogen och behandling för de sju kor som ingick i studien samt kalvningsdatum, laktationsnummer och datum för upptäckt av mastit

Ko [nr]	Bakterie	Antibiotika	Dos [ml]	Kalvning [datum]	Laktation [nr]	Mastit [datum]
1	<i>Str. dysgalactiae</i>	Penovet + Metacam	50 + 17.5	090730	6	090804
2	<i>S. aureus</i>	Penovet + Metacam	50 + 17.5	090802	3	090804
3	<i>Str. uberis</i>	Ethacilin + Metacam	45 + 16	0907xx ²	4	090823
4	<i>Str. dysgalactiae</i>	Ethacilin	50	090902	1	090905
5	KNS	Penovet	65	081211	1	090929
6	KNS + <i>Str. dysgalactiae</i>	Penovet	x ¹	090918	1	091001
7	<i>S. aureus</i>	Penovet	45	091003	4	091009

1. Dos okänd.

2. Kalvningsdatum okänt.

Provtagning och analyser

Provtagningen inleddes i samband med första mjölkningstillfället efter att kon behandlats med antibiotika och pågick under hela den pågående behandlingsperioden och påföljande karenstid samt fem dagar efter sista karenstid. Exempelvis gav fem dagars behandling med Penovet[®] en karenstid på sex dagar för att få leverera mjölk till mejeriet. Provtagningen fortsatte fem dagar efter sista karenstid vilket gav en total provtagningsperiod om 16 dagar med två provtagningar per dag.

Stallpersonalen tog prover på heljuvernivå samt registrerade den totala mjölmängden i samband med ordinarie mjölkning morgon och eftermiddag. Två burkar med mjölk fylldes vid varje provtillfälle; en burk på totalt 50 ml innehållande 50 µl (20 % w/v) bronopol (Boots Mircocheck, The Boots Company/ PLC, England) och en burk på totalt 60 ml utan tillsats av bronopol. Bronopol tillsattes för att förhindra mikrobiell tillväxt i mjölken. Mjölken rördes om innan den hölls upp i de två burkarna och förvarades i kyl (+ 8°C) tills de blev analyserade. Under behandling och karenstid togs proverna från mjölkspannet. Efter karenstidens slut togs prover från provkoppen på mjölkkningsorganet. Mjölken innehållande bronopol analyserades med IR (infraröd) analys på Kungsängens forskningscenter (HUV) med avseende på fett, protein, laktos och celltal.

Mjölken utan tillsats av bronopol användes till att mäta mjölkens kaseininnehåll enligt kalcium och löpemetoden. Ett urval av de infrysade mjölkproverna analyserades för kontroll av antibiotikarester med Betastar[®]. Ett kompletterande Delvotest[®] gjordes för att påvisa eventuell

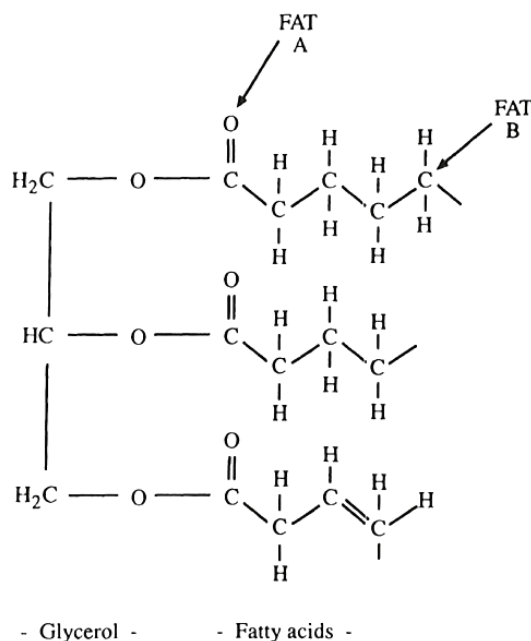
förekomst av antibiotika och andra syrningshämmande ämnen samt om mjölken hade en kraftigt avvikande sammansättning. Dubbletter togs av varje insamlat mjölkprov och frystes in i -70°C för att kunna användas i framtida forskningsförsök. Provbearbetningarna utfördes vid Institutionen för livsmedelsvetenskap, Uppsala och vasslefraktionen skickades för IR analys till Kungsängens forskningscenter (HUV), Uppsala.

Analysmetoder

Protein, laktos och fett

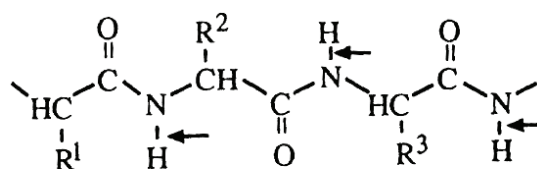
Den totala mängden protein, laktos och fett i mjölken samt protein i vasslefraktionen analyserades med IR spektroskopi (Fourier Transform Instrument (FTIR), MilkoScan™ FT 120, type 71200 Foss Electric A/S, 3400 Hillerød, Denmark).

FTIR är en mätteknik för att analysera IR ljus. Mjölkanalyser med IR ljus baseras på absorption av IR energi vid specifika våglängder för karbonylgrupper ($\text{C}=\text{O}$) i esterbindningar hos fettmolekyler (se figur 3), peptidbindningar (CONH) mellan aminosyror hos proteinmolekyler (figur 4) och hydroxyl-(OH)-grupper i laktosmolekyler (figur 5). Torrsubstansen kan bestämmas genom att lägga till en experimentellt bestämd faktor till procenthalten av protein, laktos och fett (Marshall, 1992).

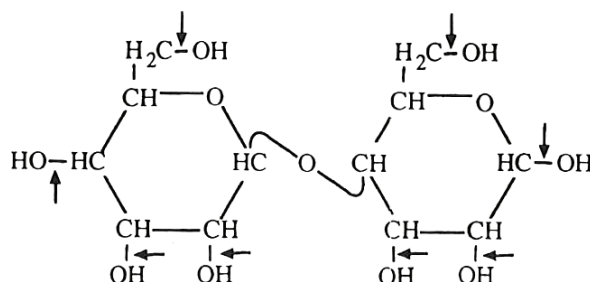


Figur 3. Fettmolekylen mäts med IR ljus. Fett A mäts genom karbonylbindningen och fett B genom esterbindningen, se pil (Harding, 1999).

Två olika våglängder används för att mäta fett med IR- teknik, fett A och fett B. Fett A mäts genom vibrationer i $\text{C}=\text{O}$ bindningen på fettmolekylen, se figur 3. Antalet fettmolekyler bestäms oavsett längd och vikt av de enskilda fettsyrorerna. Det kan vara en nackdel om längden förändras hos fettsyrorerna. Fett B mäts genom vibrationer i $\text{C}-\text{H}$ bindningarna i fettsyrekedjorna. Mätningen tar således hänsyn till både storlek och antalet fettmolekyler i provet (Foss, 2009). Fett A mäts vid våglängd $5,7\text{ }\mu\text{m}$ och fett B vid $3,5\text{ }\mu\text{m}$, laktos och protein mäts vid $9,6\text{ }\mu\text{m}$ respektive $6,5\text{ }\mu\text{m}$ (Harding, 1999).

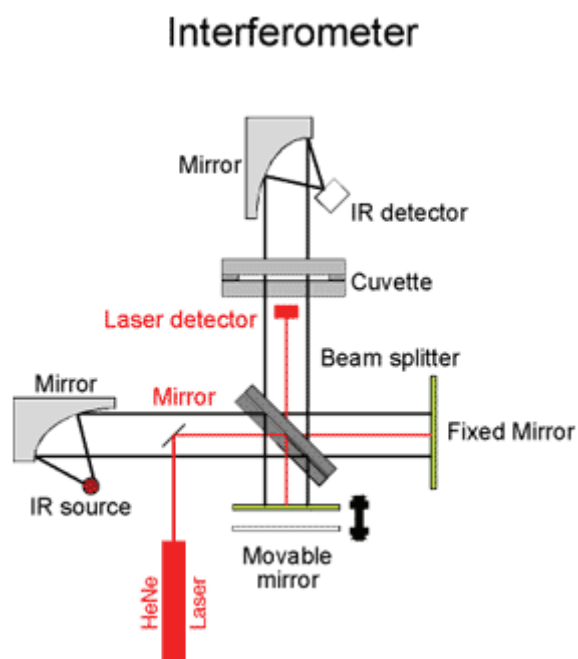


Figur 4. Protein med pil på peptidbindningar (Harding, 1999).



Figur 5. Laktos med pil på bindningar till hydroxylgrupper (Harding, 1999).

MilkoScan FT 120 arbetar i MIR (mid IR) regionen vilket motsvarar 3-10 μm . Principen går ut på att infrarött ljus splittras upp med hjälp av en "ljus splittrare" (beam splitter). Det gör så att hälften av ljuset går till en fast spegel (fixed mirror) och hälften till en rörlig spegel (movable mirror). Från speglarna reflekteras och rekombineras det infraröda ljuset innan de går till en IR- detektor. Alla IR- frekvenser går igenom enheten samtidigt vilket möjliggör att hela IR- spektrat kan framställas på en gång, se figur 6. Fourier Transform består av en matematisk procedur vilket räknar ut frekvensen och amplituden från interferogramet (rådatan). Det krävs endast några sekunder så har ett interferogram bildats med spektrometern, omvandlats matematiskt med Fourier Transform principen och slutligen förvandlats till ett fullständigt spektra över provet (MilkoScan FT 120 Operator's manual, 2000).



Figur 6. Det infraröda spektrat går igenom en interferometer (Foss, 2009).

Kasein och vassleprotein

För att kunna beräkna andelen kasein av det totala proteininnehållet denaturerades kaseinet så att det bildades ett fast koagel med hjälp av tillsatt löpe. Mängden kasein beräknades genom att den återstående vasslefraktionen subtraherades från den totala mängden protein.

Mjölken (40 ml) mättes upp i ett mätglas och hälldes över i en burk med snäpplock. Därefter tillsattes 60 µl (48 % w/v) kalciumklorid (Merck Eurolab AB, 163 94 Stockholm, Sverige). Kalciumklorid bidrar till att ge ett fastare koagel och en förbättrad vassleavskiljning. För att uppnå en längre hållbarhet tillsattes 40 µl (18 % w/v) bronopol (Boots Mircocheck, The Boots Company/ PLC, England). Proverna ställdes i ett 40°C vattenbad under 15 till 20 minuter för att underlätta utfällningen av kasein. Därefter tillsattes 200 µl standardlöpe (Kemikalia, 223 63 Lund, Sverige) för koagulering av kaseinerna. Proverna blandades och ställdes tillbaka i vattenbadet under cirka 7 minuter. Enzymet kymosin i löpe gör så att de polära kedjorna på micellen spjälkas av och de förlorar därmed sina hydrofila egenskaper och kan då inte repelleras varandra, ett nätverk (koagel) bildas med fettkulorna inneslutna i koaglet. (Andersen, 1993). Det bildade koaglet skars sönder i små bitar för att öka ytan och underlätta vassleavskiljningen (syneresen). Proverna ställdes därefter i samma vattenbad (40°C) i ytterligare 5 minuter för att påskynda syneresen. Därefter filtrerades proverna genom ett stålfilter (porstorlek 30 µm) ned i ett rör under cirka 7 minuter för att avskilja vasslen. Sist tillsattes en droppe Triton[®] X-100 (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Tyskland) till röret med vasslefraktionen som ”smörjmedel” till den maskin (MilkoScan[™] FT 120) som skulle analysera proteininnehållet i vasslen.

Celltal

Celltalet analyserades på färsk mjölk innehållande bronopol med elektronisk fluorescensbaserad cellräkning (Fossomatic 5000, Type 71300, Foss Electric A/S, 3400 Hillerød, Denmark). Fossomatic är ett automatiskt mikroskop som räknar celler i en vätska. Precisionen för detta instrument är förhållandevis hög jämfört med andra metoder att räkna celler och många länder använder sig rutinmässigt av denna metod (Andrews *et al.*, 2004). Flödescytometri baseras på att de somatiska cellerna i mjölken färgas in med en fluorescerande färg och sedan räknas elektroniskt. Mjölksprovet förs med en bärarvätska som hjälper till att skapa en mycket fin och väldefinierad stråle. Provet passerar sedan en räknande enhet. Med hjälp av att provet förs med ett högt tryck och genom en kyvett där diametern minskar så möjliggör det att endast en somatisk cell kan passera varje gång. Den fluorescerande färgen binder främst till DNA molekylerna och därmed specifikt de somatiska cellerna. När provet exponeras för blått ljus genom flödeskyvetten så exciterar det blå ljuset den fluorescerande infärgningen och får de somatiska cellerna att emittera rött ljus. Det röda ljuset kan därefter räknas som ljusimpulser av en fotomultiplikator (Fossomatic Operator's manual, 1997).

Antibiotika och andra syrningshämmande ämnen

Delvotest[®] är en mikrobiologisk metod för att kontrollera om det finns antibiotika eller andra syrningshämmande ämnen i mjölk. Testet är känsligt för vissa antibiotika och kemoterapeutika vid halter under MRL-värdet. Det ger även utslag vid en kraftigt avvikande sammansättning av mjölken. Metoden är baserad på en mikrotiterplatta med brunnar som innehåller näringsagar med en pH-indikator samt sporer från *Bacillus Stearothermophilus var. caldiolactis*. Mjölk tillsätts (100 µl) och plattorna inkuberas vid 64°C under närmare tre timmar. Under inkuberingen utvecklas sporer till vegetativa bakterieceller varvid syra produceras och pH-indikatorn ändrar färg från blått till gult (negativt resultat). Om testet är positivt och mjölken

innehåller antibakteriella ämnen inhiberas emellertid syraproduktionen och färgen förblir blå (DSM, 2009).

Betastar[®] är ett snabbtest för att kontrollera om det finns antimikrobiella substanser tillhörande gruppen betalaktamantibiotika i mjölk. Testet upptäcker penicillin G och andra betalaktamantibiotika vid halter under MRL-värdet och utförandet sker i två steg. Under den första inkuberingen (3 minuter, 47,5°C) tillsätts 200 µl mjölk till ett glasrör som innehåller ett specifikt receptorprotein för betalaktamantibiotika. Eventuell betalaktamantibiotika som finns i provet bildar då ett komplex med receptorproteinet. Under den andra inkuberingen (2 minuter, 47,5°C) placeras en teststicka i glasröret varvid mjölken och receptorproteinet suggs upp på stickan. Denna fungerar som ett immunokromatografiskt medium och innehåller två band. Det första bandet fångar upp receptorprotein som inte har interagerat med något betalaktamantibiotika under första inkubationen. Det andra bandet på stickan fungerar som ett kontrollband. Receptorproteinet är kopplat till guldpartiklar som ger bandet på teststickan dess röda färg. Ett negativt resultat innehåller således två band, ett kontrollband och ett band där stickan ”fångat upp” det receptorprotein som inte bundit till något antibiotikum. Ett positivt resultat indikeras av att endast kontrollbandet syns på stickan då betalaktamantibiotika i mjölken reagerat med receptorproteinet i testlösningen och därför inte bundit till teststickan (Neogen, 2006).

Bearbetning av data

Totalt samlades 224 stycken mjölkprover in. På grund av ofullständig data utgick 18 mjölkprover av det totala antalet prover. De dagar då prov fattades togs ett medelvärde dagen före och dagen efter för att få ett representativt resultat i diagrammen. Det var inte alltid möjligt att erhålla samma intervall mellan provdagarna vilket kan ha påverkat resultatet.

Då mjölkningen utfördes med olika intervall på de båda gårdarna räknades dygnskoncentrationen ut för protein, laktos, fett och celltal för att minimera de skillnader som kunnat uppstå på grund av detta. Varje parameter multiplicerades med avkastningen morgon och kväll och delades sedan med den totala avkastningen per dygn. Den totala avkastningen per dygn gavs av summan av morgon och eftermiddagsmjölkningen. Se exempel 1 för uträkning av dygnskoncentrationen av protein.

Exempel 1. Uträkning av dygnskoncentrationen för protein

Parameter	Enhet	Morgon	Eftermiddag	Summa
Protein	[%]	3,79 *	3,88 *	
Avkastning	[kg]	12 +	7	19 kg
Summa	[kg]	0,45 +	0,27	0,73 kg

Dygnskoncentrationen av protein blir då $0,73 \text{ kg} / 19 \text{ kg} = 3,82 \%$

Försöket var uppdelat på tre perioder: behandlingsperiod då kon gavs antibiotika och ej fick leverera mjölk till mejeriet, karenstid då kon var färdigbehandlad men fortfarande inte fick leverera mjölk till mejeriet och leveransperiod då mjölken fick levereras till mejeriet.

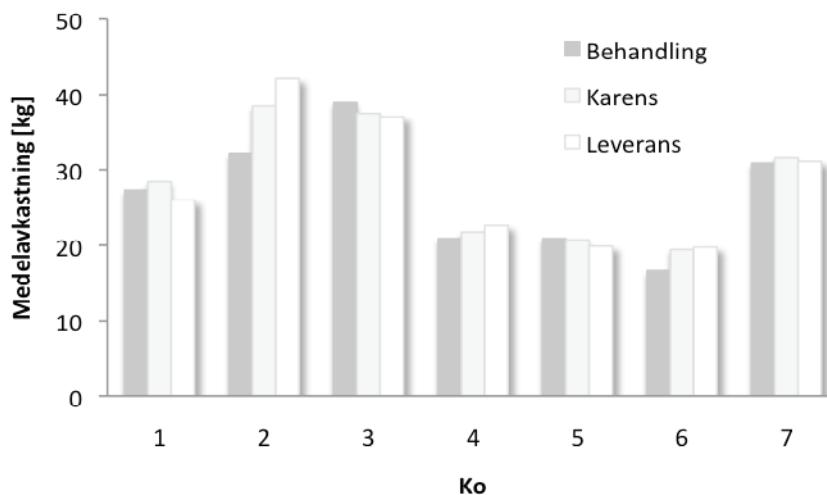
Alla beräkningar har utförts i Excel (Microsoft Office 2007).

RESULTAT

Medelvärde och standardavvikelse för dygnskoncentrationerna för de parametrar som ingått i studien redovisas i bilaga 1.

Avkastning

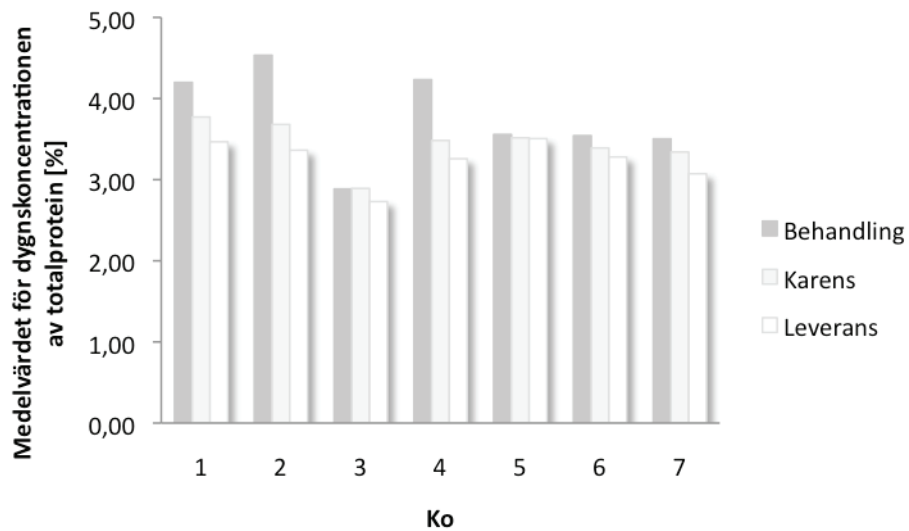
Medelavkastningen beräknades för respektive ko och för de tre olika perioderna i försöket, behandling, karens och leverans. Resultatet visade en avkastningsökning för tre kor och en avkastningsminskning för tre kor från försökets början till slut, se figur 7. Ko nummer (7) fick varken en ökning eller minskning av avkastningen. Tre kor (4, 5 & 6) visade en lägre avkastning jämfört med övriga kor.



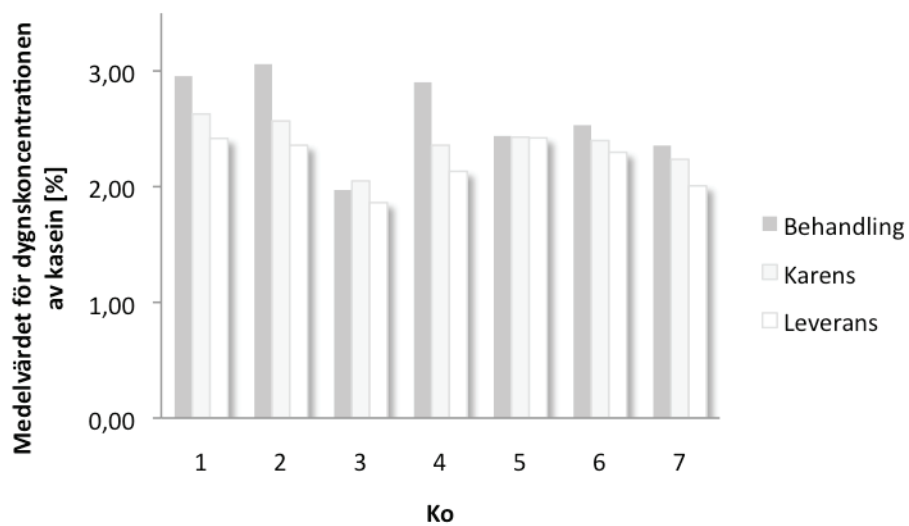
Figur 7. Medelavkastning för respektive ko och för de tre olika perioderna i försöket.

Totalprotein, kasein och vassleprotein

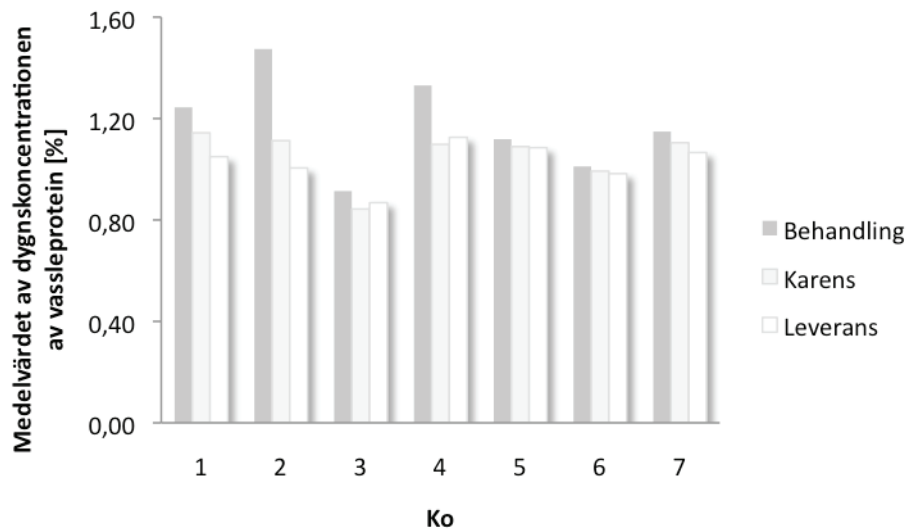
Medelvärdet för dygnskoncentrationerna av totalprotein, kasein och vassleprotein minskade för alla kor från försökets början till slut, se figur 8-10.



Figur 8. Medelvärde för dygnskoncentrationen av totalprotein för respektive ko och för de tre olika perioderna i försöket.



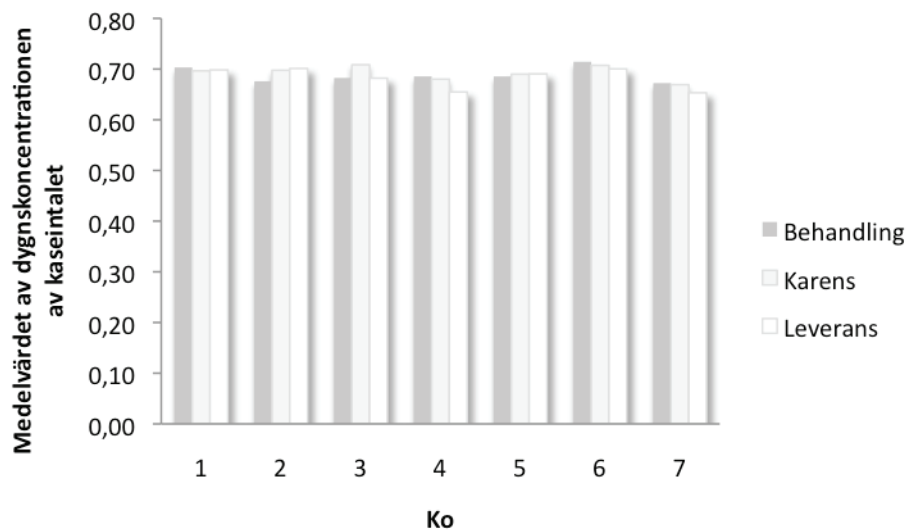
Figur 9. Medelvärde för dygnskoncentrationen av kasein för respektive ko och för de tre olika perioderna i försöket.



Figur 10. Medelvärdet för dygnskoncentrationen av vassleprotein för respektive ko och för de tre olika perioderna i försöket.

Kaseintal

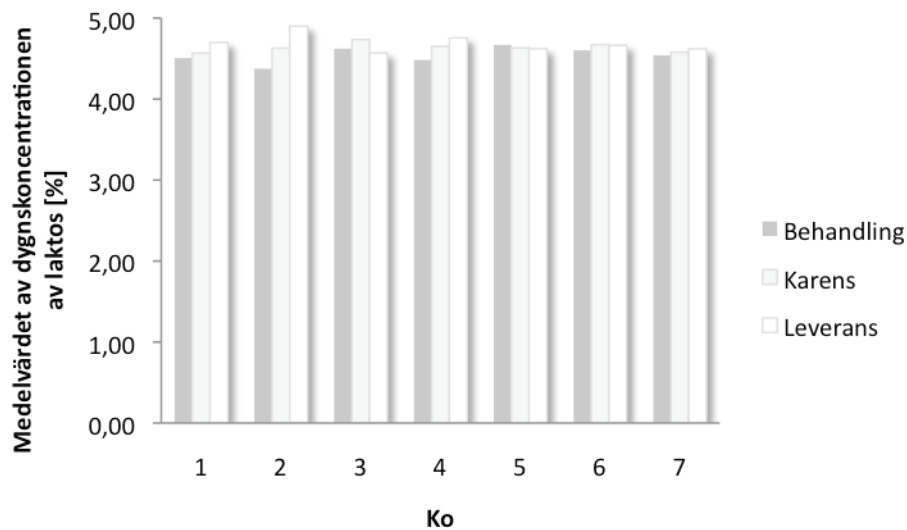
Medelvärdet för dygnskoncentrationerna av kaseintalet låg mycket jämt för alla kor från försökets början till slut, se figur 11.



Figur 11. Medelvärdet för dygnskoncentrationen av kaseintalet för respektive ko och för de tre olika perioderna i försöket.

Laktos

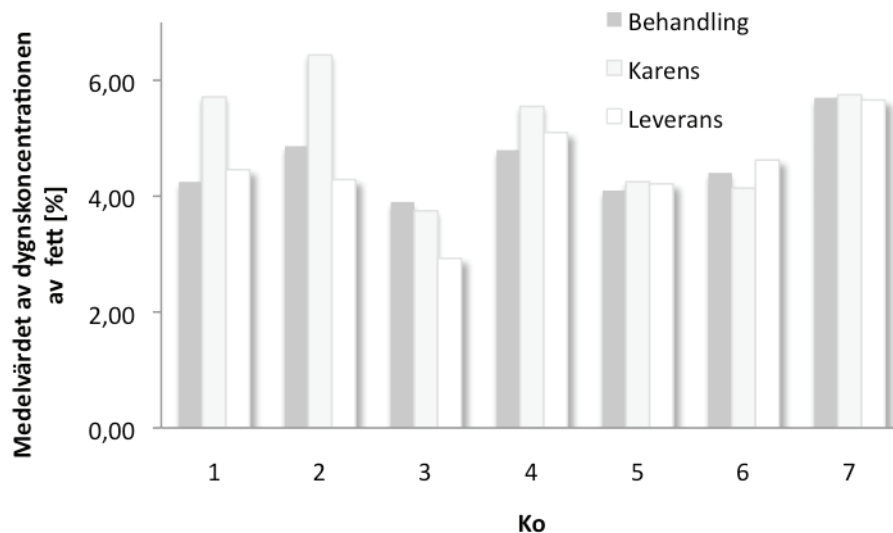
Medelvärdet för dygnskoncentrationen av laktos ökade för fem kor och minskade för två kor från försökets början till slut, se figur 12.



Figur 12. Medelvärdet för dygnskoncentrationen av laktos för respektive ko och för de tre olika perioderna i försöket.

Fett

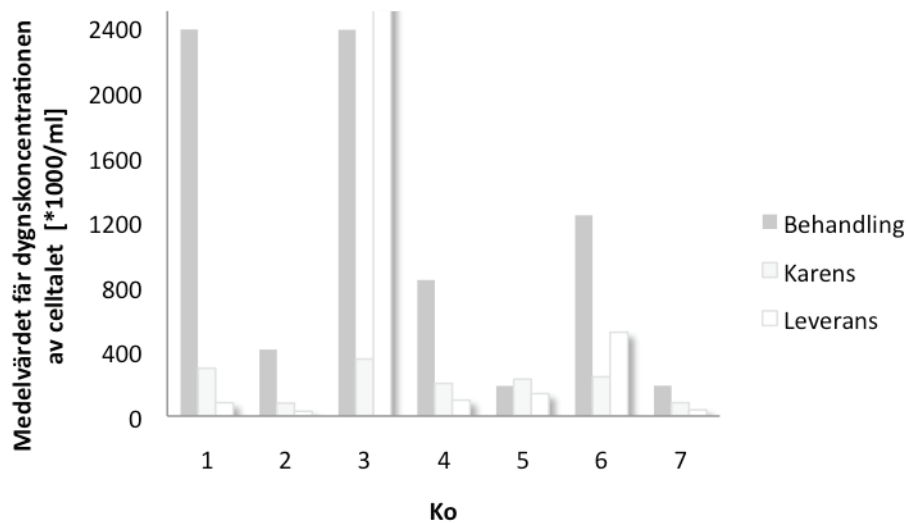
Medelvärdet för dygnskoncentrationen av fett varierade kraftigt för de flesta korna från försökets början till slut, se figur 13.



Figur 13. Medelvärdet för dygnskoncentrationen av fett för respektive ko och för de tre olika perioderna i försöket.

Celltal

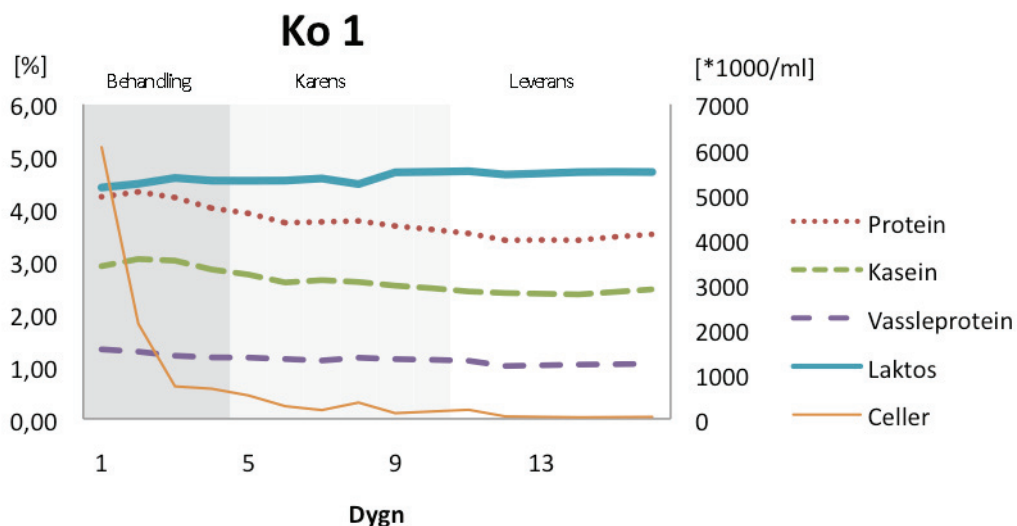
Medelvärde för dygnskoncentrationen för celltalet minskade för sex kor och ökade för en ko från försökets början till slut, se figur 14.

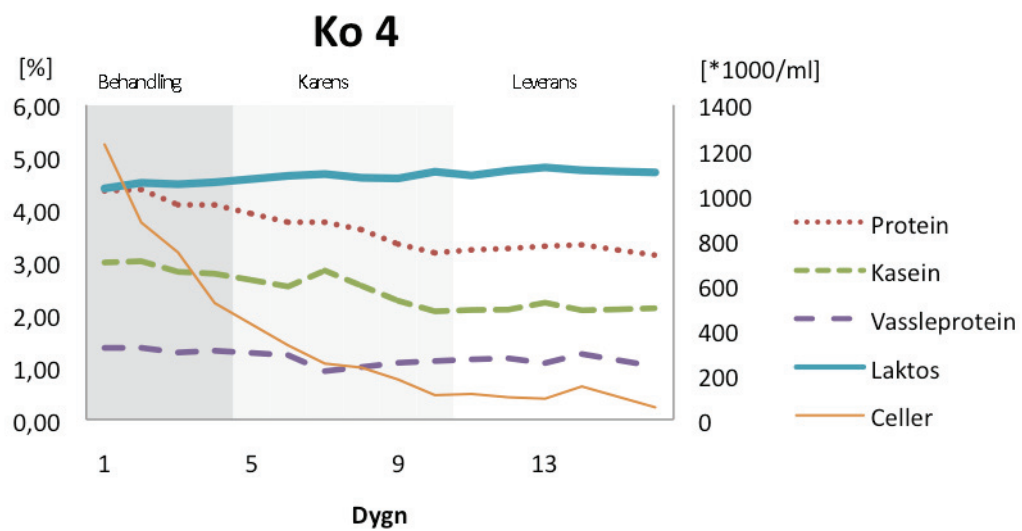
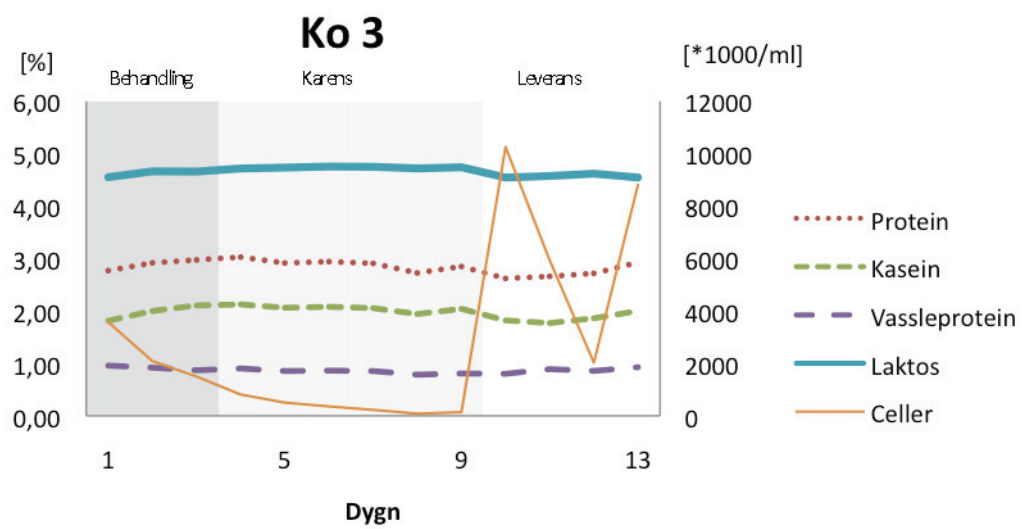
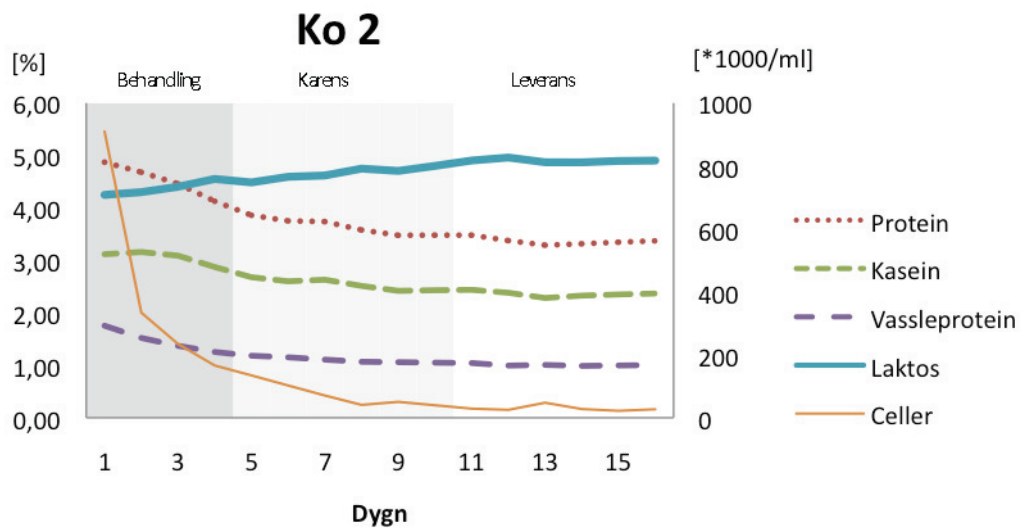


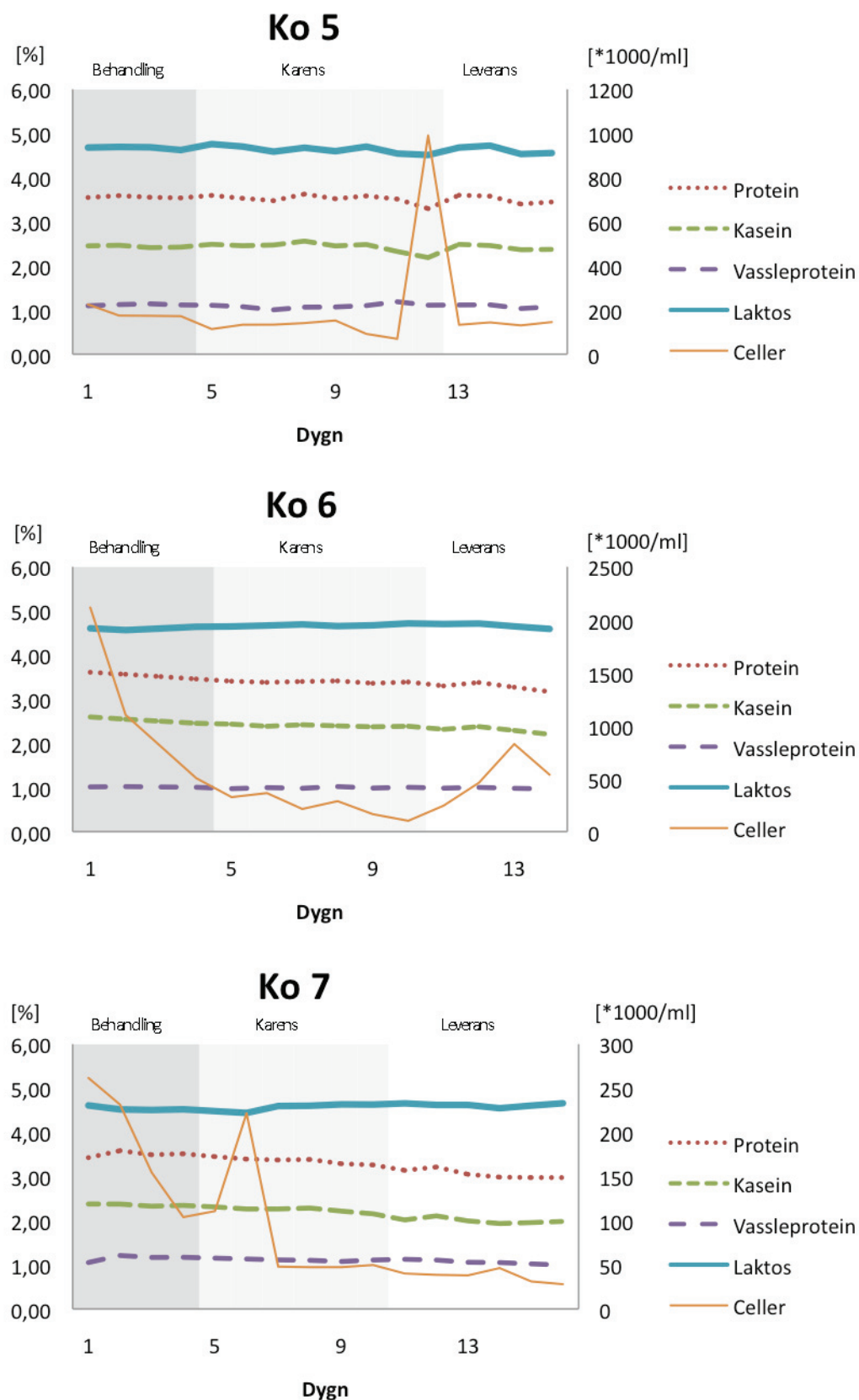
Figur 14. Medelvärde för dygnskoncentrationen av celltalet för respektive ko och för de tre olika perioderna i försöket. Skalan är kapad för ko (nummer 3) under leveransperioden (borde visat ca 7 miljoner i celltal) för att få ett representativt diagram för övriga kor.

Totalprotein, kasein, vassleprotein, laktos och celltal per dygn

I nedanstående linjediagram (figur 15) illustreras dygnskoncentrationerna av totalprotein, kasein, vassleprotein, laktos, och celltal per ko och per dygn. Diagrammen är uppdelade på de tre perioderna i försöket: behandling, karens och leverans.







Figur 15. Dygnskoncentrationerna av protein, kasein, vassleprotein, laktos och celltal för respektive ko och för de tre olika perioderna i försöket. Celltal anges som [*1000/ml] och övriga parametrar i [%].

Antibiotika och andra syrningshämmande ämnen

Ett urval av mjölkproverna analyserades med Delvotest[®] och Betastar[®] morgon och eftermiddag den sista karensdagen samt morgon och eftermiddag under den första leveransdagen till mejeriet. Totalt testades fyra mjölkprover för varje ko. Alla proverna visade ett negativt resultat med undantag för mjölken från ko (nummer tre) som visade positiva tester morgon och eftermiddag den sista karensdagen och på eftermiddagen under första leveransdagen. Nya tester utfördes med Betastar[®] på morgon och eftermiddag under den andra leveransdagen med negativa resultat. Denna ko fick återkommande höga cellhalter i mjölken och påbörjade en ny behandlingsperiod två dagar efter avslutad karenstid.

DISKUSSION

Hypotesen var att karenstiderna vid antibiotikabehandlad mastit inte var tillräckliga för att mjölkens sammansättning skulle hinna återgå till det normala. Resultatet tyder på att sammansättningen och celltalet låg inom normala nivåer vid karenstidens utgång. Det är dock svårt att helt besvara denna frågeställning då det inte finns ett givet referensvärde att utgå ifrån. Mjölkens sammansättning och avkastning varierar beroende på ras, laktation, utfodring och klimat. Sammansättningen varierar även inom- och mellan individer av samma ras. Hade studien utförts på juverfjärdedelsnivå med de friska juverdelarna som referens till de sjuka juverdelarna hade resultatet kanske sett annorlunda ut.

Den totala avkastningen ökade för tre kor och minskade för tre kor medan ko (nummer 7) låg oförändrad från försökets början till slut. En frisk ko ökar normalt sin avkastning under två till åtta veckor efter kalvning för att sedan minska successivt. Detta resultat stämmer väl med de tre kor som ökade sin avkastning då det var i början av de första veckorna på laktationsperioden. Resultatet skulle kunna förklaras med att de tillfrisknat av den antibiotikabehandling som gavs och att de därmed kunnat återhämta sig till en normal laktationskurva. Två av de tre kor som minskade i avkastning hade passerat de första veckorna av laktationsperioden och resultatet skulle därför kunna förklaras med en naturlig nedgång i avkastningen. Den tredje ko som minskade i avkastning var i början av de första veckorna på laktationsperioden. Hennes resultat skulle kunna förklaras med ett mycket högt celltal i början på laktationen och att avkastningen därför påverkats negativt av mastiten. Tre av korna (nummer 4, 5 och 6) hade en lägre avkastning jämfört med övriga kor. Det beror antagligen på att de var förstagångskalvar och därmed inte kommit upp i samma nivå som de äldre korna. En ko når normalt sin maximala avkastning först vid femte laktationen (Harding, 1999). En studie av Auldist *et al.* (1995) visade att såväl friska som sjuka kor (mastit) tenderade att följa samma mönster över laktationsperioden. Skillnaden låg i att de kor som var sjuka i mastit gav en lägre avkastning jämfört med de kor som var friska. Att avkastningen ökade fast korna hade mastit skulle kunna förklaras av en kompensatorisk effekt i de juverdelar som inte var påverkade av mastit. I vilken grad avkastningen kompenseras beror på antalet sekretoriska celler och deras aktivitet (Hamann & Reichmuth, 1990).

Koncentrationen av totalprotein, kasein och vassleprotein minskade för alla kor från försökets början till dess slut. Hos en ko med mastit behöver inte det totala proteinet minska, däremot förändras sammansättningen av proteinet där det för livsmedelsindustrin värdefulla kaseinet (osttillverkning) minskar på grund av en försämrad, eller helt nedsatt funktion hos de sekretoriska cellerna vilket bekräftas i en studie av Auldist *et al.* (1995) som påvisade att kor med mastit tenderar att följa samma laktationskurva som en frisk ko men, att värdena för kasein var lägre för de sjuka korna. Vassleprotein kan istället öka som en respons på att mängden antikroppar ökar för att bekämpa inflammationen i juvret i kombination med att andra blodproteiner läcker över membranet och in i mjölken (Harding, 1999). I mjölken hos en frisk ko minskar totalprotein under de tolv första veckorna på laktationen då ko mobiliserar kroppsvävnad för att bibehålla mjölkproduktionen. Därefter ökar mängden totalprotein igen för att i slutet av laktationsperioden återgå till samma nivå som vid början av laktationsperioden (Phillips, 2006). I denna studie minskade koncentrationerna av totalprotein, kasein och vassleprotein lika mycket och en förändring i proteinsammansättningen kunde därmed inte ses. Koncentrationerna av totalprotein, kasein och vassleprotein verkar därmed följa kurvan för en frisk ko. Det låga kaseintalet (~ 0.7) i mitt försök gav en antydning om att en del kasein skulle kunna gått förlorat till vasslefraktionen på grund av ett dåligt koagel.

Kaseintalet som är kvoten mellan kasein och den totala mängden protein låg mycket jämt för alla kor under hela försöksperioden. Två kor tenderade till en svag ökning medan två kor tenderade till en svag minskning och tre kor verkade varken öka eller sänka sitt kaseintal. Det tyder på att kaseinmängden var proportionerlig mot den totala proteinmängden under hela försöksperioden. Kaseinmängden i mitt försök verkade därmed inte ha påverkats nämnvärt av att korna hade mastit och höga celltal i motsats till en studie på heljuvernivå av Åkerstedt *et al.* (2008) som visade att kaseintalet var lägre hos kor med höga celltal jämfört med de kor som hade låga celltal. Lägre kaseinvärden vid mastit visades även i en studie på juverfjärdelsnivå av Ogola *et al.* (2007).

Laktoshalten ökade för fem kor och minskade för två kor från försökets början till slut. Hos en ko med mastit tenderar laktoshalten att vara lägre på grund av reducerad syntes i de sekretoriska cellerna. Laktos kan även läcka från mjölken till blodet (Harding, 1999). I en studie på heljuvernivå av Auld *et al.* (1995) tenderade laktos att öka i början på laktationen samt minska i slutet av laktationsperioden oavsett om korna var friska eller sjuka i mastit. Ökningen var dock högre för de friska korna jämfört med de som hade mastit. Enligt Phillips (2006) ökar laktoshalten i mjölken hos friska kor under den första laktationsperioden för att sedan hålla sig relativt konstant under stora delar av laktationen och sedan minska igen i slutet av laktationsperioden. Den konstanta kurvan kan förklaras av att laktos fungerar som en osmotisk regulator i mjölken. De fem kor som fick en laktosökning skulle därmed kunna förklaras av en naturlig laktationskurva då de var i början av laktationsperioden. En av de två kor som minskade sin laktationskurva var i slutet av laktationsperioden och resultatet kan även där förklaras med en naturlig nedgång. Den andra kon som minskade koncentrationen av laktos fick återkommande höga celltal och resultatet skulle kunna förklaras med en studie utförd på fjärdedelsnivå av Lindmark-Månsson *et al.* (2005) som visade att laktos hade en negativ korrelation med höga celltal.

Halten av fett varierade kraftigt för alla kor i denna studie. Enligt Sandholm *et al.* (1995) varierar fetthalten i mjölken beroende på ras, laktationsstadium, utfodring samt under mjölkning. En förklaring till variationen i denna studie skulle kunna förklaras av att det var olika personal som tog prover och att det är den mänskliga faktorn som spelat in.

Celltalet minskade för alla kor med ett undantag (ko nummer 3). Det visar att inflammationen gick ned och att antibiotikabehandlingen gav resultat. Sex av totalt sju kor fick diagnosen klinisk mastit i samband med att de var nykalvade och just påbörjat sin laktationsperiod. Enligt Nielsen (2009) utvecklar kor oftare mastit i samband med kalvning. I samtliga fall orsakades mastiten av bakterier som infekterade juvret, vilket gav upphov till en inflammation och höga celltal. Mjolk med ett högt celltal kan ge prisavdrag och enligt EU:s direktiv skall celltalet understiga 400 000 celler/ml (EC, 2004). I Sverige varierar gränsvärdena för pristillägg respektive avdrag hos de olika mejerierna. För att nämna ett av de större mejerierna så ger Arla Foods ett pristillägg om celltalet i tankmjölken understiger 300 000 celler/ml medan ett celltal över 401 000 celler/ml ger prisavdrag. En allmän rekommendation är att celltalet inte skall överstiga 100 000 celler/ml för att upprätthålla en god juverhälsa och mjölkkvalitet (Sjaastad *et al.*, 2003). I denna studie hade tre kor ett högre celltal än det rekommenderade vid försökets slut. Två av korna hade lägre celltal än 300 000 celler/ml och riskerar därför inte prisavdrag enligt Arla Foods regler. En ko (nummer 3) hade ett markant högre celltal på grund av återkommande mastit. En observation som inte redovisats i resultatdelen är att celltalet var lägre i morgonmjölken jämfört med eftermiddagsmjölken vilket styrks i en tidigare studie på juverfjärdedelsnivå av Lakic *et al.* (2009).

De analyser som utfördes för att utvärdera om mjölken vid leverans till mejeriet innehöll antibiotika eller andra syrningshämmande ämnen visade negativa resultat. Ko (nummer 3) påvisade positiva resultat för både Delvotest och Betastar under hela den sista karensdagen samt på eftermiddagen under den första leveransdagen till mejeriet. Att resultatet var positivt på eftermiddagen men inte på morgonen under första leveransdagen skulle kunna förklaras med att proverna blandats ihop. Delvotest påvisar antibiotika och en kraftigt avvikande sammansättning av mjölken och det skulle kunna ge en förklaring till varför testet var positivt. Ett varningstecken är dock att även Betastar som enbart påvisar antibiotika var positivt. En förklaring till det skulle kunna vara att hon fick återkommande mastit och att utsöndringen av rests substanser inte följde de mönster som gäller för en tillfrisknande ko. Ko (nummer 3) fick påbörja en ny behandlingsperiod två dagar efter att karenstiden gått ut och hennes mjölk skickade aldrig till mejeriet. Att testerna för övriga kor visade negativa resultat var positivt ur alla perspektiv och visar att karenstiderna för de antimikrobiella läkemedel som användes i denna studie är korrekt satta ur rests substanssynpunkt. Lantbrukaren riskerar därmed inte prisavdrag eller böter för dålig mjölk. Företaget som tillverkar mejeriprodukter riskerar inte att antibiotika hämmar de bakteriella processer (startkulturer) som krävs vid exempelvis syring av fil och yoghurt. Den enskilda konsumenten riskerar heller inte att få antibiotikarester i konsumtionsmjölken.

Då antalet djur var få och tiden som försöket pågick var begränsad kan det ha påverkat slutresultatet. Något som inte utvärderades i denna studie, men som testas på mejerierna är den sensoriska kontrollen. Då testas mjölken för lukt, smak och utseende. Det kanske inte hade varit möjligt i denna studie på grund av att det krävs utbildning för detta, men det hade varit intressant att se om det gav något resultat.

SLUTSATS

Hypotesen var att karenstiderna vid antibiotikabehandlad mastit inte var tillräckliga för att mjölkens sammansättning skulle hinna återgå till det normala. Resultatet tyder på att sammansättningen och celltalet låg inom normala nivåer vid karenstidens utgång. Möjligtvis skulle värdena för mjölkens sammansättning varit högre om korna inte insjuknat i mastit, men det är svårt att bevisa utan ett referensvärde.

REFERENSER

- Andersen, P-E. (1993). *Livsmedelsteknologi, animaliska livsmedel*. Studentlitteratur, Lund, Sverige.
- Andersson, L. Vice VD, Svensk Mjölk AB. Uppsala. Svensk mjölk AB:s framtidsspaning. Åhörarpresentation, 2009-10-16.
- Andrews, A.H., Blowey, R.H., Boyd, H., Eddy, R.G. (2004). *Bovine medicine: Diseases and husbandry of cattle*. 2. ed. Blackwell Science, United Kingdom.
- Alfa Laval (1995). *Efficient milking*. Alfa Laval Agri AB i Tumba, Östertälje tryckeri AB, Sverige.
- Anon. (1986). *Något om mastit och traumatiska spenskador hos ko*. Kompendiesamling. Inst. för Obstetrik och Gynekologi. SLU, Uppsala, Sverige. Sid 26-34.
- Auldist, M.J., Coats, S., Rogers, G.L & McDowell, G.H. (1995). Changes in the composition of milk from healthy and mastitic dairy cows during the lactation cycle. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 35: 427-36.
- Björnhag, G. (2004). *En introduktion till studier av anatomi och fysiologi hos våra vanligaste husdjur*. Institutionen för anatomi och fysiologi, SLU, Uppsala, Sverige.
- Boden, E. (2005). *Black's veterinary dictionary*. 21. ed. A&C Black publishers limited, London, United Kingdom.
- DSM. Hemsida. [online] (2008-04-04). Tillgänglig: <http://www.dsm.com> [2009-10-14]
- EC. Regulation no 853/2004. Of the European parliament and of the council of 29 April 2004. Laying down specific hygiene rules for food of animal origin. Official Journal of the European Union L 139 of 30 April 2004.
- EEG nr 2377/90. MRL förordningen bilaga 1-3. Utfärdat av Europeiska gemenskapernas råd.
- Fass[®] vet. (2007).
- Forsbäck, L., Lindmark-Månsson, H., Andrén, A., Åkerstedt, M., Svennersten-Sjaunja, K. (2009). Udder quarter milk composition at different levels of somatic cell count in cow composite milk. *Animal*, 3: 710-717.
- Foss. Hemsida. [online] (2004-09-01). Tillgänglig: <http://www.foss.dk> [2009-10-21]
- Fossomatic 5000 Operator's manual. (1997). Type 71300, Foss Electric A/S, 69, Slangerupgade, 3400 Hillerød, Denmark.
- Franzén, G. (2009). Personligt meddelande. Jälla Gård, Institutionen för husdjursgenetik. Uppsala, Sverige.
- Hamann, J & Reichmuth, J. (1990). Compensatory milk production within the bovine udder: effects of short-term non-milking of single quarters. *Journal of Dairy Research*, 57: 17-22.
- Harding, F. (1999). *Milk quality*. Aspen publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, United Kingdom.
- Heringstad, B. Klemetsdal, G & Ruane, J. (2000). Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Elsevier Science B.V*, Norway.
- Hortet, P & Seegers, H. (1998). Loss in milk yield and related composition changes resulting from clinical mastitis in dairy cows. *Preventive veterinary medicine*, 37:1-20.
- Jonsson, L., Marklinder, I., Nydal, M., Nylander, A. (2007). *Livsmedelsvetenskap*. Studentlitteratur, Lund (Ungern).

Lakic, B., Wredle, E., Svennersten-Sjaunja, K., Östensson, K. (2009). Is there a special mechanism behind the changes in somatic cell and polymorphonuclear leukocyte counts, and composition of milk after a single prolonged milking interval in cows? *Acta Veterinaria Scandinavica*. 51:4.

Lindmark-Månsson, H., Bränning, C., Aldén, G., Paulsson, M. (2005) Relationship between somatic cell count, individual leukocyte populations and milk components in bovine udder quarter milk. *International Dairy Journal*, 16:717-727.

Marshall, R. T. (1993). *Standard methods for the examination of dairy products*. 16. ed. American Public Health Association, Washington, D.C, United States of America.

MilkoScan™ FT 120 Operator's manual. (2000). type 71200, Foss Electric A/S, 69, Slangerupgade, 3400 Hillerød, Denmark.

Neogen Corporation. (2006). Betastar® product information. 620 Lesher Place Lansing, MI 48912 United States of America.

Nielsen, C. (2009). *Economic impact of mastitis in dairy cows*. Acta universitatis agriculturae sueciae, 2009:29. Diss. Uppsala: Sveriges Lantbruksuniversitet.

Nilsson, M. (2009). *Mjölkkor*. Fälth & Hassler, Värnamo, Sverige.

Ogola, H., Shitandi, A., Nanua, J. (2007). Effect of mastitis on raw milk compositional quality. *Journal of Veterinary Science*, 8:237- 242.

Patel, M. (2009). Personligt meddelande. Kungsängens forskningscenter, Institutionen för husdjurens utfodring och vård. Uppsala, Sverige.

Phillips, C.J.C. (2006). *Principles of cattle production*. Wallingford, CABI, United Kingdom.

Sandholm, M., Honkanen-Buzalski, T., Kaartinen, L., Pyörälä, S. (1995). *The bovine udder and mastitis*. University of Helsinki, Faculty of veterinary medicine, Finland.

Sjaastad, Ø, V. Hove, K & Sand, O. (2003). *Physiology of domestic animals*. Scandinavian Veterinary Press, Oslo.

Svensk mjölk. Hemsida. [online] (2008-2009). Tillgänglig: <http://www.svenskmjolk.se> [2010-03-01]

Walstra, P. (1999). *Dairy technology: principles of milk properties and processes*. Marcel Dekker, New York, United States of America.

Åkerstedt, M., Persson Waller, K., Larsen Bach, L., Forsbäck, L., Sternesjö, Å. (2008). Relationship between haptoglobin and serum amyloid A in milk and milk quality. *International Dairy Journal*. 18: 669-674.

Bilaga 1.

Medelvärden (medel) och standardavvikelse (std avv) beräknat på den genomsnittliga koncentrationen över dygnet för total avkastning (tot avk), protein, fett, laktos, celltal, vassleprotein (v-prot), kasein och kaseintal (kasein/protein) för de sju kor som ingick i studien. Första raden (mörkgrå) visar behandlingsperiod, andra raden (ljusgrå) visar karensperiod och sista raden (vit) visar leveransperiod.

Ko [nr]	Tot avk [kg]	Protein [%]	Fett [%]	Laktos [%]	Celltal [*1000/ml]	V-prot [%]	Kasein [%]	Kaseintalet [kas/prot]
1								
Medel	27,30	4,20	4,25	4,51	2387	1,24	2,95	0,70
std avv	1,16	0,13	0,32	0,08	2527	0,07	0,09	0,01
Medel	28,38	3,77	5,71	4,57	296	1,14	2,63	0,70
std avv	1,61	0,09	1,36	0,08	154	0,03	0,08	0,01
Medel	26,00	3,47	4,46	4,70	82	1,05	2,42	0,70
std avv	9,18	0,07	0,86	0,03	79	0,04	0,04	0,01
2								
Medel	32,20	4,53	4,86	4,38	411	1,44	3,06	0,68
std avv	4,40	0,32	0,49	0,13	339	0,22	0,13	0,03
Medel	38,48	3,68	6,44	4,63	80	1,11	2,57	0,70
std avv	2,50	0,15	0,99	0,10	39	0,07	0,10	0,00
Medel	42,06	3,36	4,29	4,90	30	1,01	2,36	0,70
std avv	6,98	0,07	0,53	0,03	9	0,03	0,05	0,00
3								
Medel	38,90	2,89	3,90	4,62	2385	0,91	1,97	0,68
std avv	2,27	0,11	0,20	0,06	1070	0,04	0,15	0,03
Medel	37,49	2,89	3,75	4,73	352	0,84	2,05	0,71
std avv	2,03	0,10	0,41	0,02	271	0,04	0,06	0,01
Medel	37,06	2,73	2,93	4,57	6754	0,87	1,86	0,68
std avv	5,38	0,14	0,46	0,03	3629	0,05	0,10	0,01

Ko [nr]	Tot avk [kg]	Protein [%]	Fett [%]	Laktos [%]	Celltal [*1000/ml]	V-prot [%]	Kasein [%]	Kaseintalet [kas/prot]
4								
Medel	20,49	4,23	4,80	4,48	840	1,33	2,90	0,69
std avv	2,56	0,16	0,57	0,05	295	0,04	0,12	0,00
Medel	21,78	3,48	5,55	4,65	202	1,01	2,36	0,68
std avv	1,21	0,26	0,43	0,05	86	0,11	0,33	0,04
Medel	22,59	3,26	5,10	4,75	98	1,13	2,13	0,65
std avv	1,44	0,09	0,73	0,04	38	0,10	0,07	0,03
5								
Medel	20,90	3,56	4,10	4,67	187	1,12	2,44	0,69
std avv	1,18	0,02	0,20	0,03	26	0,02	0,02	0,00
Medel	20,73	3,52	4,25	4,63	228	1,09	2,43	0,69
std avv	1,86	0,10	0,22	0,09	309	0,05	0,12	0,02
Medel	19,88	3,51	4,21	4,62	138	1,08	2,42	0,69
std avv	0,80	0,10	0,16	0,09	8	0,04	0,06	0,00
6								
Medel	16,63	3,54	4,40	4,60	1240	1,01	2,53	0,71
std avv	0,55	0,08	0,58	0,04	814	0,01	0,07	0,00
Medel	19,43	3,39	4,14	4,67	242	0,99	2,40	0,71
std avv	1,80	0,02	0,45	0,03	100	0,02	0,02	0,00
Medel	19,75	3,28	4,63	4,66	517	0,98	2,30	0,70
std avv	1,42	0,09	0,60	0,06	240	0,01	0,07	0,00
7								
Medel	30,83	3,50	5,70	4,54	188	1,15	2,36	0,67
std avv	1,27	0,07	0,21	0,05	72	0,07	0,02	0,01
Medel	31,68	3,34	5,75	4,58	83	1,10	2,24	0,67
std avv	0,99	0,06	0,97	0,08	78	0,02	0,05	0,01
Medel	31,06	3,07	5,66	4,62	38	1,07	2,01	0,65
std avv	2,58	0,10	0,88	0,05	7	0,05	0,06	0,01

I denna serie publiceras examensarbeten (motsvarande 15-30 hp i agronomexamen) samt större enskilda arbeten (7,5-15 hp) vid Institutionen för Livsmedelsvetenskap, Sveriges lantbruksuniversitet.

DISTRIBUTION:

Sveriges lantbruksuniversitet
Institutionen för Livsmedelsvetenskap
Box 7051
750 07 Uppsala
Tel. 018-67 20 06
