



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Potentiella alternativ till antibiotika vid behandling av *Staphylococcus aureus*-mastit

Jon Samuelsson



Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2011: 22

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2011



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Potentiella alternativ till antibiotika vid behandling av *Staphylococcus aureus*-mastit

Potential alternatives to antibiotic treatment of *Staphylococcus aureus* mastitis

Jon Samuelsson

Handledare:

Ulf Emanuelson, SLU, Institutionen för kliniska vetenskaper

Cecilia Wolff, SLU, Institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator:

Mona Fredriksson, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program: Veterinärprogrammet

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: SLU Uppsala

Utgivningsår: 2011

Omslagsbild: Jon Samuelsson.

Serienamn, delnr: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2011:22
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: *Staphylococcus aureus*, mastit, behandling, vaccin, laktoferrin, bakteriofag, IgY

Key words: *Staphylococcus aureus*, mastitis, treatment, vaccine, lactoferrin, phage, IgY

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	3
Material och metoder	3
Litteraturstudie	3
<i>S. aureus</i> -mastit och konventionell antibiotikabehandling	3
Vaccin.....	4
Tidiga försök	4
Lovande studier	4
Laktoferrin i kombination med penicillin	6
Bakgrund	6
In vitro	6
In vivo	7
Immunoglobulin Y – antikroppar från äggula.....	7
Fagterapi.....	8
Bakgrund	8
In vitro-försök och musmodell.....	8
Mastitförsök	8
Diskussion	9
Vaccin.....	9
Laktoferrin i kombination med penicillin	9
Immunoglobulin Y	10
Fagterapi.....	11
Slutsatser	11
Referenser.....	13

SAMMANFATTNING

Mastit orsakat av *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) är en vanlig och allvarlig produktionssjukdom inom mjölkindustrin. Antibiotikaresistens och *S. aureus* förmåga att undgå antibiotika genom invasion av juverepitel har gjort att alternativa behandlingar efterfrågas. En metod som det forskats mycket på är vaccinerings. Där har goda resultat erhållits mot de enskilda *S. aureus*-stammar som ingått i vaccinet, men det har visat sig svårt att få ett skydd som fungerar i praktiken, då en ko normalt exponeras för många olika stammar. Fagterapi, en metod där man infekterar bakterierna med ett *S. aureus*-specifikt virus, har än så länge inte visat sig effektiv som behandling av mastit, men har uppnått goda resultat på musmodell. Laktoferrin, som förekommer naturligt i mjölk, har i kombination med penicillin visat bättre resultat än konventionell penicillinbehandling enligt en studie. Även β -laktamasproducerande stammar fanns vara känsliga, både *in vivo* och *in vitro*. En studie har jämfört behandling med specifika antikroppar från ägg, IgY, med konventionell antibiotikabehandling. Där visade sig IgY ge en bättre läkningsgrad än antibiotika, men studien var liten och flera oklarheter angående studieupplägget förelåg.

En hel del forskning har gjorts kring alternativ till antibiotikabehandling utan att man har funnit en lösning. På senare år har det dock skett framsteg inom ett flertal områden. Mer forskning krävs men jag tror att chansen är stor att man i framtiden kommer ha alternativ till antibiotika vid behandling av *S. aureus*-mastit.

SUMMARY

Mastitis caused by *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is a common and serious production disease in the dairy industry. Resistance to antibiotic treatment and *S. aureus* ability to evade antibiotics by invading udder epithelium has led to an increased interest in research on alternative treatment methods. A lot of research has been made on the subject of a *S. aureus* vaccine. It has proved relatively easy to achieve protection against the bacterial strain represented in the vaccine. The big concern has been how to induce sufficient protection against the variety of strains a cow will normally encounter during its lifetime. Phage therapy, a method where a *S. aureus* specific virus is used to infect and kill bacteria, has not proved effective in *S. aureus* mastitis treatment although promising results were achieved in a mouse model. Lactoferrin, a protein normally present in milk, has in combination with penicillin proved more effective than penicillin alone, according to one study. Both *in vivo* and *in vitro* studies suggest that the combination treatment has an effect on β -lactamase producing strains as well. One study compared treatment with specific egg yolk antibodies (IgY) to conventional antibiotic treatment with promising results. However, the study was small and there were several obscurities regarding the study setup.

A lot of research and effort has been put into creating an alternative treatment for *S. aureus* mastitis, hitherto without success. However, in recent years there have been improvements made in several fields of study. More research is certainly required but I believe the chance is good that in the future, there will be presented an alternative to antibiotic treatment of *S. aureus* mastitis.

INLEDNING

Mastit (juverinflammation) ses globalt som en av de absolut viktigaste produktionssjukdomarna inom mjölkproduktion (Gill et al., 2006). Ett stort antal agens har potential att orsaka detta tillstånd som präglas av inflammation i juvret med djurlidande och produktionsnedsättningar som följd. Enligt Svensk Mjök (2010) behandlades 17,5% av Sveriges mjölkkor för klinisk mastit 2009, samtidigt som man menar att det egentliga antalet är mycket större än så. Den vanligaste mastitbakterien i Sverige är *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), som står för ungefär en tredjedel av de kliniska fallen. Gill et al. (2006) menar att *S. aureus* genom sin förmåga att motstå antibiotikabehandling och persistera som subklinisk mastit är att anse som en av de allvarligaste mastitpatogenerna. I Sverige är rekommendationen att inte behandla kroniska fall utan att i stället slakta ut dessa individer (Bengtsson et al., 2008), vilket gör *S. aureus*-mastit till en vanlig orsak till utslagning bland mjölkkor.

En utpräglad resistensutveckling hos *S. aureus* och det faktum att även mastiter orsakade av icke-resistenta stammar är svåra att få bukt med har resulterat i flera försök att hitta alternativa behandlingsmetoder (Yu-Hong et al., 2008). Det är sådana alternativa metoder som kommer att tas upp och jämföras i denna litteraturstudie. Jag har exkluderat homeopati som enligt en sammanställning av fem reviewartiklar inte har bättre effekt än placebo (Goldacre, B, 2007) och metoder jag inte kunnat finna tillräckligt omfattande studier på. Jag har också exkluderat de metoder som endast testats *in vitro*. Det finns utan tvekan fler intressanta uppslag som jag inte har tagit upp, men förhoppningen är att jag här ska belysa några av de metoder som i framtiden kommer visa sig användbara mot mastiter orsakade av *Staphylococcus aureus*.

MATERIAL OCH METODER

Min litteratursökning gjordes på PubMed och Web of Knowledge med sökorden "(mastitis) AND (aureus) AND alternative treatment" och "(mastitis) AND (aureus) AND (vaccine)". När jag sedan fick mer kunskap om vilka alternativa metoder som det fanns forskning på kunde jag förfina min sökning och söka mer selektivt på de olika metoderna. Flera av källorna är funna via hänvisningar i reviews och via andra artiklar.

LITTERATURÖVERSIKT

***S. aureus*-mastit och konventionell antibiotikabehandling**

Mastit orsakad av *S. aureus* tenderar att vara svårbehandlad. En av anledningarna är *S. aureus* förmåga att invadera och replikera sig inuti juverepitelceller (Almeida et al., 1996) och därigenom undgå effekterna av antibiotika och andra läkemedel. En finländsk studie visar att vid en femdagars parenteral behandling med β -laktamantibiotika, vilket är praxis i Sverige (Ekman et al., 1994), läker mastiten ut i 56 % av fallen. Detta förutsatt att den aktuella stammen är känslig mot β -laktamantibiotika. Om stammen är penicillinresistent är motsvarande siffra 8,3 %, trots samtidig administrering av β -laktamashämmare. Vid

användning av spiramycin, ett antibiotikum som ej påverkas av penicillinresistens, var utläkningen 33 %. Kriterierna för utläkning baserades på bakterieodling, celltal och klinisk undersökning. (Taponen et al., 2003).

Det finns en utbredd resistens mot β -laktamantibiotika på många håll i världen (Tabell 1). Resistensläget för *S.aureus* i samband med mastit på nöt i Sverige är gynnsamt jämfört med många andra länder, men det är inte ovanligt att finna β -laktamasproducerande isolat även i Sverige (Bengtsson et al., 2009). Andelen utläkta mastiter orsakade av β -laktamasproducerande *S. aureus* beror givetvis på resistensprofilen hos isolatet, behandlingstyp, och vilket antibiotikum som används, men är enligt Taponen et al. (2003) signifikant lägre än hos icke resistent stammar. Kroniskt infekterade djur kan utskilja stora mängder bakterier vilket medför en risk för spridning inom besättningen och högre celltal i mjölken (Taponen et al., 2003).

Tabell 1. Andelen β -laktamasproducerande isolat av *S. aureus*

Land	Andel	Källa
Sverige	7-12 %	Bengtsson et al., 2009; Svensk Mjök, 2010
Estland	61 %	Kalmus et al., 2011
Frankrike	41 %	Haenni et al., 2011
Kina	87 %	Shi et al., 2010

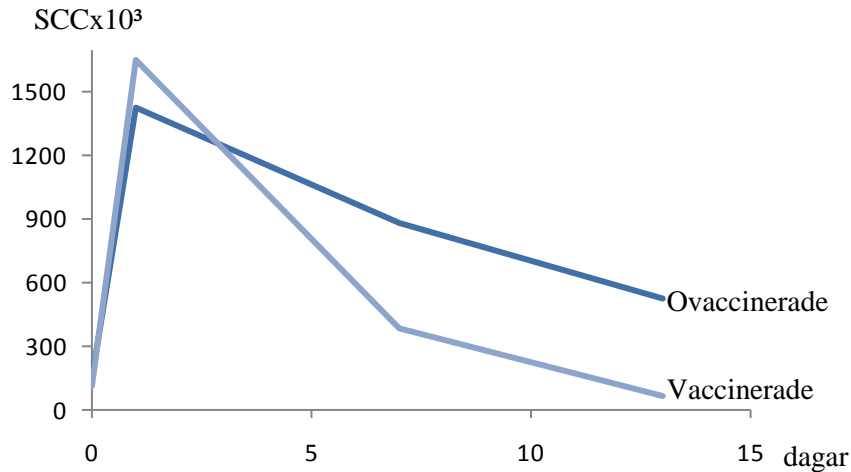
Vaccin

Tidiga försök

Idén om ett vaccin mot *S. aureus*-mastit har funnits länge, men än så länge finns ingen fulländad lösning (Leitner et al., 2003b). Redan 1984 (Watson) gjordes ett mindre försök där fyra kvigor vaccinerades med attenuerade stammar av *S. aureus*. Därefter utsattes de och tre kontrolldjur för en mycket hög dos av samma stam. Signifikant positiva resultat av behandlingen kunde ses både på antikroppstitrarna och på ökad opsoniseringsförmåga hos blodserum. Efter exponering utskilde två av tre kontrolldjur bakterier, i motsats till den vaccinerade gruppen, där inget djur utskilde bakterier. Klinisk mastit kunde ej påvisas på något djur, troligen på grund av bakteriestammens låga patogenicitet (Watson, 1984).

Lovande studier

År 2003 publicerade Leitner et al. två studier av ett och samma vaccin som forskargruppen själv utvecklat. En mindre studie där 19 djur exponerades för *S. aureus* efter vaccination (Leitner et al., 2003a) och ett större fältförsök där djuren endast vaccinerades och därefter studerades på respektive gårdar under en hel laktation (Leitner et al., 2003b). Vaccinet som användes bestod av komponenter från tre *S. aureus*-stammar, varav en icke-hemolyserande, en α -hemolyserande och en α - + β -hemolyserande samt Friends inkompleta adjuvans.



Figur 1. Celltal (SCC) under två veckor efter exponering för agens (Leitner et al, 2003a).

Resultaten som erhöles från den mindre studien var positiva, samtliga vaccinerade kor utvecklade signifikant högre antikroppstitrar än kontrollerna. Även skillnaderna i SCC 13 dagar efter exponering (Figur 1) och andelen bakterieutskiljande juverdelar (Tabell 2) var signifikanta. Sammantaget sågs ett signifikant skydd mot mastit orsakad av den aktuella *S. aureus*-stammen. *S. aureus*-stammen som användes för att infektera försöksdjuren ingick även i vaccinet (Leitner et al., 2003a).

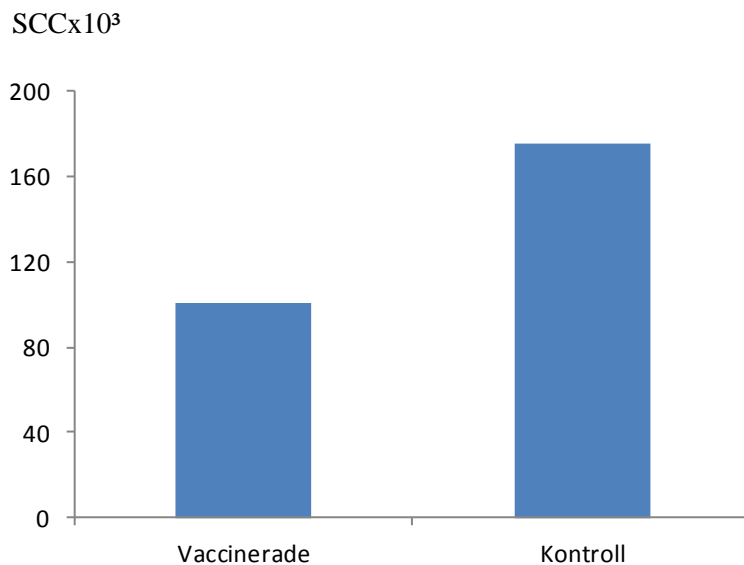
Tabell 2. Andelen juverdelar som utskilde bakterier 1 respektive 13 dagar efter exponering för agens (Leitner et al., 2003a)

Dag	Bakterieutskiljning	
	1	13
Vaccinerade (n=17)	53 %	35,3 %
Ovaccinerade (n=21)	90,5 %	90,5 %

Det efterföljande randomiserade fältförsöket gjordes på 452 kor från sju olika gårdar under en hel laktation. Djuren på de olika gårdarna delades i två grupper, där hälften vaccinerades och den andra hälften var kontroll. Blod- och mjölkprov togs med avseende på serologi och odling från båda grupperna vid 2-4 veckor, 2-3 månader respektive 5-6 månader efter kalvning. Information om SCC och mjölmängd för hela laktationsperioderna analyserades också (Leitner et al., 2003b).

Resultaten visade att vaccinationen inte gav något komplett skydd mot *S. aureus*-mastit. Incidensen av *S. aureus*-mastit bland de vaccinerade (1,3 %) var något lägre än inom kontrollgruppen (2,7 %) men skillnaden var inte signifikant. En signifikant skillnad ($P<0,01$) kunde dock ses på mjölkavkastningen, där den vaccinerade gruppen mjölkade i genomsnitt 0,5 liter (1,4 %) mer per dygn än kontrollgruppen. Även skillnaderna i SCC (Figur 2) var signifikanta ($P<0,001$). I genomsnitt var de 42,2 % högre hos kontrollgruppen (Leitner et al.,

2003b). Inga skadliga biverkningar av vaccineringen kunde ses i något av försöken. Inte heller kunde någon skillnad mellan vaccinerade och kontroll avseende antal dödfödda eller sjuka kalvar (Leitner et al., 2003a, b).



Figur 2. Genomsnittligt celltal (SCC) under hela laktationen för vaccinerade och kontrollgruppen (Leitner et al., 2003b).

Laktoferrin i kombination med penicillin

Bakgrund

Laktoferrin är ett järnbindande protein som finns naturligt i bland annat mjölk och blod hos däggdjur (Pan et al., 2006). Dess primära funktion sker genom att proteinet sluter sig omkring järn vilket hindrar bakterier från att absorbera och använda det för sin tillväxt. Detta trodde man länge var laktoferrinets enda fysiologiska funktion, men på senare år har man funnit en rad andra fysiologiska egenskaper hos proteinet (Baker & Baker, 2005).

In vitro

I en *in vitro*-studie från 2002 undersöktes hur MIC-värdet (minimum inhibitory concentration) för penicillin förändrades vid tillsats av laktoferrin. Försöket gjordes med 15 olika stammar av *S. aureus*, varav två isolerade vid klinisk mastit. Man fann att MIC-värdet för penicillin minskade vid tillsats av laktoferrin. Detta även då extra järn tillsattes, vilket indikerade att laktoferrin hade positiva egenskaper utöver de järnbindande. Resultaten tydde också på en kraftig synergisk effekt, en penicillinkoncentration på 1/16 av MIC tillsammans med en laktoferrinkoncentration motsvarande 1/8 av MIC inhiberade helt tillväxten hos bakterierna, även hos en β -laktamasproducerande stam av *S. aureus* (Diarra et al., 2002). Den synergiska effekten visade sig även i ett annat *in vitro*-försök, som gjordes på *S. aureus* i närvaro av neutrofiler från nöt. Även där visade sig låga penicillinnivåer tillsammans med laktoferrin ha bra effekt, trots att laktoferrinet ensamt inte gav någon effekt alls och penicillin i låg dos till och med gav negativa resultat gentemot kontrollen. Kontrollen utgjordes av enbart neutrofiler och bakterier. Den negativa effekten berodde på att penicillin i låg dos verkade inhiberande på neutrofilernas fagocytos. (Diarra et al., 2003).

In vivo

Petitclerc et al. gjorde 2007 en studie där man infekterade 11 kor med samma β -laktamasproducerande *S. aureus*-stam som Diarra et al. (2002) använde i sin *in vitro* studie. Alla 11 kor hade före behandling infektion i samtliga fyra juverdelar (10^3 - 10^4 CFU/ml) vilket fastställdes med hjälp av upprepade mjölkprov. Därefter fick varje ko fyra separata behandlingar utförda, en i varje juverdel. Penicillin, laktoferrin, en kombination av båda eller koksaltlösning gavs intramammärt två gånger dagligen, i samband med mjölkning, i fem dagar. Andelen juverdelar med utläkt mastit var signifikant högre ($P = 0,04$) i gruppen som gavs kombinationsbehandlingen (Tabell 3). Kriterierna för utläkning baserades på negativa bakterieodlingsprov tre respektive fyra veckor efter behandling samt $SCC > 200\ 000$ vid samma tillfällen (Petitclerc et al., 2007).

Tabell 3. Andelen utläkta mastiter i de olika behandlingsgrupperna (Petitclerc et al., 2007)

Behandling	Andel utläkta
Penicillin (n=11)	9,1 %
Laktoferrin (n=9)	11,1 %
Kombination (n=11)	45,5 %
Koksaltlösning (n=11)	0 %

Under behandling sjönk bakterieutskiljning för samtliga behandlingsalternativ utom kontrollgruppen ($P < 0,01$), men återkom snabbare vid penicillin- eller laktoferrinbehandling jämfört med kombinationsbehandlingen. Under behandlingen och två dagar efter behandlingens slut var SCC signifikant högre ($P < 0,04$) i de grupper som givits laktoferrin i någon form (Petitclerc et al., 2007).

Immunoglobulin Y – antikroppar från äggula

Genom att exponera en höna för ett antigen, bildas antikroppar av typen IgY. Dessa utsöndras via äggen och går att rena fram. På så vis får man fram specifika antikroppar mot den bakterie man har immuniserat emot (Kita & Nakai, 1992).

I en randomiserad studie undersöktes effekten av IgY-antikroppar riktade specifikt mot en *S. aureus*-stam, vid klinisk experimentell mastit respektive klinisk *S. aureus*-mastit erhållen genom naturlig infektion. Isolatet som användes för att inducera experimentell mastit kom från getjuver. Behandlingen med IgY jämfördes med penicillinbehandling och en kontrollgrupp. De tre behandlingsgrupperna bestod vardera av sex naturligt infekterade och sex experimentellt infekterade djur. Korna behandlades med intramammär infusion, två gånger dagligen i sex dagar. Kornas status med avseende på mjölkutseende, SCC, bakterieutskiljning och utläkning övervakades kontinuerligt under behandlingen. Forskargruppen fann signifikanta skillnader ($P < 0,05$) för samtliga parametrar, där effekten av IgY-behandling genomgående översteg den av penicillinbehandling, som i sin tur var signifikant bättre än kontrollgruppen. Andelen utläkta mastiter, där kriterierna för en utläkt

mastit dock inte definierades, var sammantaget för både klinisk och experimentell mastit 0 % hos kontrollgruppen, 50 % hos penicillingruppen och 67 % hos IgY-gruppen, med en generell lägre läkningsgrad bland de med naturligt orsakad mastit (Yo-Huong et al., 2008)

Fagterapi

Bakgrund

Fagterapi bygger på användandet av bakteriofager, vilka är viruspartiklar som specifikt infekterar bakterier. De första försöken med bakteriofager som behandlingsform gjordes redan på första halvan av 1900-talet men metoden hamnade i skymundan för antibiotika när detta introducerades. På senare år har forskningen återigen tagit fart (Barrow & Soothill, 1997).

In vitro-försök och musmodell

Matsuzaki et al. publicerade år 2007 en studie där en bakteriofag kallad ϕ MR11 injicerades intraperitonealt på möss i olika doser. I samband med detta gavs även en konstant mängd av en virulent stam av *S. aureus* intraperitonealt. Kontrolltester utan bakteriofag visade att vid enbart *S. aureus*-injektion var mortaliteten bland mössen 100 %. Bakteriofagerna gavs i doser som varierade mellan 0,01-200 fager/bakterie (MOI 0,01-200). Bland de djur som behandlades med ϕ MR11 var mortaliteten signifikant lägre än kontroll vid MOI=0,1 (P=0,012). Vid samtliga testade doser där MOI \geq 1 var den sammanräknade mortaliteten 1,7 % (n=60). Man fann ingen toxicitetspåverkan eller immunsvär vid administration av endast bakteriofag ϕ MR11, även vid mycket höga doser.

Ett liknande försök gjordes även med fyra meticillinresistenta stammar av *S. aureus* (MRSA). Vid den testade fagdosen (MOI=50) var mortaliteten 0 % (n=40) hos de behandlade grupperna, vilket kan jämföras med kontrollgrupperna, där mortaliteten var 92,5% (n=40). Skillnaden i mortalitet fanns vara signifikant (P \leq 0,0002) (Matsuzaki et al., 2003). *In vitro*-försök i samband med detta visade att denna fagtyp hade bred specificitet och var effektiv mot 30 av 75 testade *S. aureus*-stammar (Matsuzaki et al., 2003).

Mastitförsök

Gill et al. publicerade 2006 en randomiserad blindad studie där effekten av bakteriofagbehandling på kor med kronisk, subklinisk *S. aureus*-mastit testades. Genom provtagning och bakterieodling fann forskarna att samtliga infekterade djur (n=24, totalt 38 juverdelar) hade *S. aureus*-stammar som var känsliga mot den testade bakteriofagen *in vitro*. Korna gavs en intramammär infusion per dag i fem dagar, av antingen bakteriofaglösning eller placebo i form av koksalt. Av de 18 juverdelar som behandlades med bakteriofager läkte mastiten ut i tre fall (16,7 %). I kontrollgruppen var den siffran noll. Kriterierna för utläkningen baserades på ett flertal bakterieodlingar. Skillnaden i utläkning mellan de två grupperna var ej signifikant (P>0,19). En signifikant ökning av celltalen (P \leq 0,002) kunde ses hos behandlingsgruppen mellan 12-36 timmar efter administrering av bakteriofager, men hade återgått till normala nivåer efter sju dagar hos alla djur utom ett. Bakteriofager kunde hittas i mjölken upp till 36h efter administrering.

DISKUSSION

Vaccin

En väsentlig skillnad mellan vaccin och övriga metoder som tagits upp är att vaccin endast är en förebyggande åtgärd, som inte kan användas för att bota mastit. Trots att man har forskat på området i åtminstone 30 år är det ingen som har lyckats få fram ett välfungerande vaccin (Watson 1981, Leitner et al., 2003b).

Studien som Watson gjorde 1984 var mycket liten och enkelt gjord, men visar ändå att man redan tidigt kunde bygga upp en motståndskraft mot en viss *S. aureus*-stam genom att immunisera med just den stammen. Problemet man har haft sedan dess är att immunisera på sådant sätt att man får ett skydd mot många olika stammar, ett heterologt skydd. I en undersökning av Leitner et al. (2003b) analyserades mjölk från de kor som drabbats av *S. aureus*-mastit under försökstiden och där fann man att infektionerna orsakats av ett 20-tal olika stammar. De båda studierna av Leitner et al. (2003a,b) som tas upp här visar på problematiken kring heterologt skydd. Förmågan att motstå *S. aureus*-mastit var signifikant bättre än kontrollen när korna utsattes för en stam som fanns representerad i vaccinet (Leitner et al., 2003a), medan i fältstudien när korna naturligt utsattes för en rad olika *S. aureus*-stammar var skyddet mot *S. aureus*-mastit ej signifikant bättre än kontrollen. I den senare studien fanns det dock en tendens till bättre skydd än hos kontroldjuren. Författarna menar att man fått ett ospecifikt skydd gentemot mastit, vilket alltså yttrar sig genom lägre celltal och större mjölmängd (Leitner et al., 2003b). Båda studierna av Leitner et al (2003a, b) är mycket välgjorda och tydligt presenterade, man har korrigerat för olika förhållanden på olika gårdar genom att ha båda grupperna representerade inom gårdarna och varit noggranna vid valet av försöksdjur med avseende på ålder, sjukdomshistoria och var i laktationen de befunnit sig.

Även om man inte uppnådde signifikant bättre skydd än kontroll mot *S. aureus*-mastit kan ett mer ospecifikt skydd mot mastit också vara värdefullt. Man kan tänka sig att om resultaten i dessa studier speglar verkligheten, vilket endast fler försök kan visa, skulle ett vaccin redan idag skulle kunna fungera som profylax och därmed kanske kunna minska den traditionella antibiotikabehandlingen. Här krävs det dock en analys av de ekonomiska aspekterna. Kostnaden för vaccinering får inte vara högre än den ekonomiska vinning man får av ett ospecifikt *S. aureus*-skydd, om detta ska vara användbart.

Laktoferrin i kombination med penicillin

Laktoferrin tillsammans med penicillin har uppnått mycket goda resultat både *in vitro* och *in vivo*, om man betänker att man i *in vivo*-studien använde en β -laktamasproducerande stam. Andelen utläkta mastiter (45,5 %) var fyra gånger högre än vid ren penicillinbehandling och även högre än vid behandling med spiramycin, ett bredspektrumantibiotikum som är inducerat vid penicillinresistenta *S. aureus* (Taponen et al., 2003). Spiramycin hade enligt Taponen et al. (2003) en läkningsgrad på 33,3 % vid parenteral behandling av mastit orsakad av β -laktamasproducerande *S. aureus*.

Det är inte alltid en resistensbestämning sker innan mastitbehandling inleds. Detta medför att även penicillinresistenta stammar många gånger behandlas med penicillin, ofta med dåliga resultat. Vidare behandling, i de fall kon inte slaktas ut, ska då enligt de nordiska rekommendationerna ske med exempelvis spiramycin (Landin et al., 2010). Detta förfarande innebär att kon och bonden får utstå två antibiotikabehandlingar, varav den ena med bredspektrumantibiotika. Ändå är sannolikheten att kon ska tillfriskna inte särskilt hög. Detta är givetvis dåligt ur såväl ekonomisk som djurhälsomässig synvinkel. Om resultaten från studien av Petitclerc et al. (2007) visar sig hållbara även i större skala skulle detta medföra att ett förhållandevis bra resultat skulle kunna erhållas med endast en behandling med penicillin.

In vitro-studierna jag har tittat på var tydligt presenterade, både när det gäller utförandet och resultaten. Försöken gjordes på ett relativt stort antal stammar där även isolat från mastit och β -laktamasproducerande stammar fanns representerade. Det är viktigt för den kliniska relevansen att försök av denna typ görs på ett stort antal stammar, då väldigt många stammar har potential att orsaka mastit. *In vivo*-studien som gjordes var väldigt liten, men tydligt presenterad och med genomtänkt upplägg, där relevanta parametrar kontrollerades upprepade gånger med korta intervall under försökets gång och efter avslutad behandling. Upplägget med fyra olika behandlingar på samma ko gjorde de olika behandlingsformerna mycket lätta att jämföra utan stor risk för bias. Dock var antalet försöksdjur ändå i minsta laget för att man ska kunna dra några långtgående slutsatser av försöket. Fler och större försök krävs för att verifiera resultaten.

Immunoglobulin Y

När det gäller IgY fann jag endast en artikel som avhandlade effekten *in vivo* på mastit. Försöket var relativt litet med 12 djur per grupp. Resultaten var svårtolkade då man inte angav kriterierna för utläkt mastit. Man har även bedömt graden av mastit subjektivt genom utseende på mjölken, vilket jag anser vara en osäker metod. Det är långt ifrån säkert att diagnostiskt viktiga förändringar i mjölk, såsom högt celltal eller bakterieförekomst, kan observeras med blotta ögat. Man har inte heller redovisat vilka stammar som orsakat infektion i den naturligt infekterade gruppen, vilket hade varit intressant att veta ur exempelvis resistenssynpunkt. Resultaten som erhöles från studien var goda när det gäller utläkningen för IgY (67 %), men det kan ses som något förvånande att andelen utläkta för penicillingruppen var så hög som 50 %. En studie från 2010 (Shi et al.) visade att penicillinresistens är mycket utbredd i Kina (87 %). Tidigare erfarenheter har visat att β -laktamantibiotika har mycket dålig effekt mot resistenta stammar, 8,3 % enligt Taponen et al. (2003). Med denna bakgrundsinformation är 50 % utläkning i penicillingruppen högre än vad man kunnat förvänta sig, men då information om de aktuella stammarnas resistensegenskaper saknas är det svårt att närmare identifiera anledningen. Det kan indikera otillräcklig diagnostisering eller att infektionerna av någon anledning inte fått fäste ordentligt. Det framgår inte varför man använt en stam från get eller huruvida denna stam även kan orsaka mastit hos nöt. Kanske hade man fått andra resultat med stam som isolerats från fall av mastit hos nöt.

Det finns svårigheter när det gäller att jämföra resultaten från denna studie med andra, beroende på skälen ovan. Jag efterfrågar mer forskning på ämnet för att man ska kunna bedöma metodens potential.

Fagterapi

Fagterapi visade sig enligt studien på en musmodell vara väldigt effektivt mot *S. aureus*-infektion medan mastitförsöket på kor inte gav någon signifikant högre utläkningsgrad än placebo (Matsuzaki et al., 2003; Gill et al., 2006). Skillnaden kan kanske härledas till *S. aureus* förmåga att gömma sig inuti juvarepitelceller. Möjligen skulle fagterapi ha bättre effekt i det akuta skedet av infektionen, innan bakterierna fått fäste ordentligt i juvarepitelet. Det är möjligt att bakteriofagerna inte kunde verka lika effektivt som de kunde när både fager och bakterier injicerades intraperitonealt. Mastitförsöket utfördes på kroniskt, subkliniskt infekterade djur, ett sjukdomstillstånd som är mycket svårbehandlat även med konventionella metoder (Byong et al., 2008). Resultaten hade möjligtvis varit annorlunda om försöket utförts på nyinfekterade, kliniskt sjuka djur.

Det signifikant förhöjda celltalet som kunde ses i mastitförsöket sågs som en indikation på någon form av immunsvaret gentemot bakteriofagerna. En motsvarande reaktion kunde inte observeras i musmodellen (Matsuzaki et al., 2003; Gill et al., 2006). Denna skillnad mellan de två studierna kunde inte förklaras. Gill et al. (2006) efterlyser mer forskning kring bakteriofagers farmakokinetik och juvrets immunsvaret mot bakteriofager för att detta skulle kunna klargöras. Det faktum att man fann mycket färre bakteriofager än man väntat skulle kunna tyda på att immunförsvaret inaktiverade dessa (Gill et al., 2006). Författarna poängterar att de djur som tillfrisknade efter behandling hade en väldigt låggradig mastit. Ingen av dem utskilde *S. aureus* dagen då försöket startade. Resultaten indikerar att det återstår en hel del forskning och utveckling innan denna metod skulle kunna användas kommersiellt. Det finns dock väldigt få studier på ämnet så mycket tyder på att metoden ännu inte nått sin fulla potential. Exempelvis vet man mycket lite om bakteriofagers reaktioner med värdjuret. Det vore intressant med en motsvarande studie på nyinfekterade djur, samt en *in vivo*-studie som jämförde olika bakteriofagers effekt vid mastitbehandling på nöt.

Slutsatser

Sammantaget finns mycket forskning gjort på att få fram ett alternativ till antibiotika vid behandling av *S. aureus*-mastit, men än så länge har detta inte lett till någonting som på allvar kan konkurrera med antibiotika som behandlingsmetod. I ett par av dessa studier ses resultat som överträffar antibiotika, men många gånger kan det vara svårt att dra några slutsatser då studierna exempelvis görs på exakt den stam som behandlingen riktar sig mot, eller att studierna är mycket små. Få av studierna är gjorda under fältmässiga förhållanden, och när sådana studier har genomförts har resultaten också generellt sett varit sämre. Fagterapiförsöket som gjordes under fältmässiga förhållanden av Gill et al. (2006) gav inte signifikant högre läkning än kontrollgruppen. Liknande resultat gällde även skyddet mot *S. aureus*-mastit vid det stora vaccinationsförsöket av Leitner et al. (2003b). Ett undantag är dock kombinationen antibiotika och laktoferrin, där studien av Petitclerc et al. (2007) visade en signifikant högre andel utläkta mastiter än vid ren antibiotikabehandling.

Av de metoder som presenteras här är laktoferrin i kombination med penicillin det alternativ som jag anser har kommit närmast en lösning, även om fler *in vivo*-studier behövs. Det bygger på en redan mycket använd metod som har modifierats för att öka effektiviteten, vilket

gör att den snabbt skulle kunna implementeras i klinisk verksamhet. De potentiella fördelarna skulle kanske framförallt vara ett minskat behov av bredspektrumantibiotika, då metoden tycks ha god effekt även mot β -laktamasproducerande stammar. Bredspektrumantibiotika används sedan årtionden tillbaka som förstahandsalternativ vid klinisk mastit i vissa länder (Kalmus et al, 2001). Immunoglobulin Y visade också goda resultat, men då flera oklarheter förelåg i studieupplägget är det svårt att bedöma hur effektiv metoden egentligen är. Övriga metoder behöver utvecklas ytterligare innan det kan vara aktuellt att ersätta antibiotika, även om resultaten från fältförsök antyder att ett vaccin i dagsläget skulle kunna fungera som ett profylaktiskt komplement till konventionell behandling.

En ytterligare faktor som man alltid måste ta hänsyn till när det gäller alla behandlingsmetoder är den ekonomiska. För att en metod ska användas i stor skala krävs det inte bara god effekt mot *S. aureus*-mastit, utan också att behandlingen är ekonomisk försvarbar. Behandlingskostnaderna är svåra att bedöma då ingen av dessa metoder används kommersiellt. Den eventuella kostnaden är heller inget som tagits upp i någon av studierna, men forskningen syftar i samtliga fall till att uppnå ett kommersiellt gångbart alternativ, där en ekonomisk kalkyl självklart måste ingå. Med tanke på de potentiella vinsterna med en effektiv behandlingsmetod i form av ökad mjölkavkastning, minskad utslagningsfrekvens, minskat djurlidande, minskat celltal osv. bör det finnas goda chanser att vinsten skulle överstiga kostnaden för samtliga föreslagna metoder.

Mycket arbete och forskning återstår för att man ska kunna hitta ett fullgott alternativ till antibiotika. Potentialen och intresset tycks dock finnas och förhoppningsvis kommer *S. aureus*-mastit i framtiden inte längre vara ett av mjölkindustrins stora bekymmer.

REFERENSER

- Akita, E.M. & Nakai, S. (1992). Immunoglobulins from egg yolk. Isolation and purification. *Journal of Food Science*, 57, 629-634
- Almeida, R. A., Matthews, K. R, Cifrian, E., Guidry, A. J. & Oliver, S. P. (1996). *Staphylococcus aureus* Invasion of Bovine Mammary Epithelial Cells. *Journal of Dairy Science*, 79, 1021-1026.
- Baker, E. N., & Baker, H. M., (2005). Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 2531–2539.
- Barrow, P. A. & Soothill, J. S. (1997). Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends in microbiology*, 5, 268-271.
- Bengtsson, B., Ericsson Unnerstad, H., Ekman T., Artursson K., Nilsson-Öst M., Persson Waller K. (2008). Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. *Veterinary Microbiology*, 136, 142-149
- Byoung, S. C., Jin, S. M., Hyun-Mi, K., Young-In, K., Hong-Kyun, L., Jong-Duk, K., Byung-Saeng, L., Hye, C. K., Yong H. P. (2008). Protective effects of recombinant staphylococcal enterotoxin type C mutant vaccine against experimental bovine infection by a strain of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical mastitis in dairy cattle. *Vaccine*, 26, 2081-2091.
- Diarra, M. S., Petitclerc, D., Deschênes, E., Lessard, N., Grondin, G., Talbot, B. G. & Lacasse, P. (2003). Lactoferrin against *Staphylococcus aureus* Mastitis. Lactoferrin alone or in combination with penicillin G on bovine polymorphonuclear function and mammary epithelial cells colonisation by *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 95, 33-42.
- Diarra, M. S., Petitclerc, D. & Lacasse, P. (2002). Effect of Lactoferrin in Combination with Penicillin on the Morphology and the Physiology of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis. *Journal of Dairy Science*, 85, 1141-1149
- Ekman, T., Åström, G. & Funke, H. (1994). Measures taken by veterinarians in Sweden in cases of bovine mastitis. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 35, 329-335.
- Gill, J. J., Pacan, J. C., Carson, M. E., Leslie, K. E., Griffiths, M. W. & Sabour M. P. (2006). Efficacy and Pharmacokinetics of Bacteriophage Therapy in Treatment of Subclinical *Staphylococcus aureus* Mastitis in Lactating Dairy Cattle. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50, 2912-2918.
- Goldacre, B. (2007). Benefits and Risks of homoeopathy. *The Lancet*, 370, 1672-1673.
- Haenni, M., Galofaro, L., Ponsin, C., Bes, M., Laurent, F. & Madec, J-Y. (2010). Staphylococcal bovine mastitis in France: enterotoxins, resistance and the human Geraldine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 216-218.
- Kalmus P., Aasmäe B., Kärssin A., Orro T., & Kask K. (2011). Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. *Acta Veterinaria Scendinavica*, 53:4.
- Landin, H., Nordiske meieriorganisasjoners samarbeidsutvalg for Molkekvalitetsarbeid, Svensk Mjölk. 2010. Nordiska riktlinjer för mastitbehandling. Lund.
- Leitner, G., Lubashevsky E., Glickman A., Winkler M., Saran A. & Trainin Z. (2003a). Development of a *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows. I. Challenge trials. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 93, 31-38.

- Leitner, G., Yadlin N., Lubashevsky E., Ezra E., Glickman A., Chaffer M., Winkler M., Saran A. & Trainin Z. (2003b). Development of a *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows. II. Field trial. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 93, 153–158.
- Matsuzaki, S., Yasuda, M., Nishikawa, H., Kuroda, M., Ujihara, Y., Shuin, T., Shen, Y., Jin, Z., Fujimoto, S., Nasimuzzaman, M.D., Wakiguchi, H., Sugihara, S., Sugiura, T., Koda, S., Muraoka, A. & Imai, S. (2003). Experimental Protection of Mice against Lethal *Staphylococcus aureus* Infection by Novel Bacteriophage fMR11. *The Journal of Infectious Diseases*, 187, 613-624.
- Pan, Y., Wan, J., Roginski, H., Lee, A., Shiell, B., Michalski, W. P. & Coventry, M. J. (2007). Comparison of the effects of acylation and amidation on the antimicrobial and antiviral properties of lactoferrin. *Letters in Applied Microbiology*. 44, 229–234.
- Petiteclerc, D., Lauzon, K., Cochu, A., Ster, C., Diarra, M. S. & Lacasse, P. (2007). Efficacy of a Lactoferrin-Penicillin Combination to Treat β -Lactam-Resistant *Staphylococcus aureus* Mastitis. *Journal of Dairy Science*, 90, 2778-2787.
- Shi, D., Hao, Y., Zhang, A., Wulan, B. & Fan., X. (2010). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 57, 221-224.
- Svensk Mjök. Redogörelse för husdjursorganisationens Djurhälsovård 2009/2010. [online] (2010) Tillgänglig: http://www.svenskmjolk.se/Global/Dokument/Dokumentarkiv/Statistik/Redog%20c3%b6relse%20f%20c3%b6r%20husdjursorganisationens%20djurh%c3%a4lsov%c3%a5rd%202009_2010.pdf. [2011-03-14]
- Taponen S., Jantunen A., Pyörälä E., & Pyörälä S. (2003). Efficacy of Targeted 5-day Combined Parenteral and Intramammary Treatment of Clinical Mastitis Caused by Penicillin-Susceptible or Penicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 44, 53-62.
- Yu-Hong Z., Li-Ji J., Xiao-Yu L., Jie G., Zhi L., Bao-Jing Z., Rui F. & Yong-Ping X.. (2008). Efficacy of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) to bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Microbiology*, 133, 317–322.
- Watson, D. L (1984). Evaluation of Attenuated, Live *Staphylococcus* Mastitis Vaccine in Lactating Heifers. *Journal of Dairy Science*, 67, 2608-2613
- Watson, D. L (1981). Immunologically specific resistance to infection with particular reference to staphylococcal mastitis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 137, 579.