

# Genetisk modifikation möjliggör resistens mot mastit orsakad av *Staphylococcus Aureus*

*Ann Eriksson*





Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för husdjursgenetik

## **Genetisk modifikation möjliggör resistens mot mastit orsakad av *Staphylococcus Aureus***

*Genetic modification provides resistance against bovine mastitis caused by Staphylococcus aureus*

*Ann Eriksson*

**Handledare:**

Flavio Forabosco, SLU, Institutionen för husdjursgenetik

**Examinator:**

Lotta Rydhmer, SLU, Institutionen för husdjursgenetik

**Omfattning:** 15 hp

**Kurstitel:** Kandidatarbete i husdjursvetenskap

**Kurskod:** EX0553

**Program:** Agronomprogrammet–Husdjur

**Nivå:** Grund, G2E

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2013

**Omslagsbild:** Ann Eriksson

**Serienamn, delnr:** Examensarbete / SLU, Institutionen för husdjursgenetik, 414

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

**Nyckelord:** Mastit, Lysostafin, Genetisk modifiering, *S. aureus*, Resistens

**Key words:** Mastitis, Lysostaphin, Genetically modified animals, *S. aureus*, *Resisten*

## Sammanfattning

Mastit är en av de vanligaste sjukdomarna som drabbar mjölkbesättningar världen över. I Sverige drabbas årligen omkring 60 % av mjölkorna och av dessa är *Staphylococcus Aureus* orsaken till ungefär 30 %. Detta får mycket stora ekonomiska kosekvenser för mjölkproducenterna. I Sverige beräknas kostnaderna uppgå till 192 miljoner kr per år exklusive kostnader för mastitprevention. Aveln för mastitresistens går långsamt och något vaccin mot sjukdomen är ännu inte fullt utvärderat. Mastiter som orsakas av *S. aureus* är svåra att bota till följd av bakteriernas förmåga att i viss mån efterlikna virus samt vissa stammars penicillinresistens. Framsteg inom gentekniken ger möjlighet att i framtiden använda sig av genetiskt modifierade (GM) produktionsdjur som är resistenta mot angrepp från denna patogen. *S. aureus* har i försök visat sig vara mycket känslig mot enzymet lysostafin som har en bevisad förmåga att döda bakterien genom att angripa kemiska bindningar i cellväggarna och därmed orsaka lysering. Enzymet har potential att i framtiden användas så väl preventivt som direkt behandlande mot angrepp av *S. aureus*. Ett försök har gjorts in vivo hos transgena kloner av rasen Jersey som efter modifieringen uttryckte enzymet lysostafin i sin mjölk. Vid upprepade intramammära injektioner med livskraftiga *S. aureus* uppvisade samtliga transgena individer högre motståndskraft och individen med högst koncentration av lysostafin uppvisade resistens. I försöket ingick även en kontrollgrupp med obesläktade icke klonade djur som samtliga uppvisade sjukdomssymptom efter injektionerna. Jämförelser gjordes även i avseende på mjölksammansättning och avkastning.

Gentekniken är dyr och svår att arbeta med och kräver mycket förfining innan den är redo att användas på marknaden. Regelverken som innefattar GM-djuren på EUs livsmedelsmarknad är utformade för att ge hög säkerhet för den biologiska mångfalden, upprätthålla konsumentssäkerhet och undvika att vara ett handelshinder. Ännu finns inga godkända GM-djur på EUs livsmedelsmarknad. Det finns potential att i framtiden skapa GM-produktionsdjur. Dessa tekniker skulle kunna utgöra bra verktyg för att i framtiden kunna höja avkastning, minska antibiotikaanvändning samt främja djurvälstånd.

## Abstract

Mastitis is one of the most common diseases affecting dairy cows worldwide. In Sweden annually about 60% of the dairy cows get infected and *Staphylococcus aureus* cause approximately 30% of these infections. Mastitis causes enormous economic losses. In Sweden, the costs to cure mastitis are estimated to be 192 million SEK per year, excluding the costs for mastitis prevention. Genetic progress against mastitis is small and there is no vaccine against this disease. Mastitis caused by *S. aureus* is difficult to cure. Advances in genetic engineering can allow the use of genetically modified (GM) production animals to create animals resistant to the pathogen *S. aureus* in the near future. Research has shown *S. aureus* to be very sensitive to the enzyme Lysostaphin. This enzyme has a proven ability to kill the bacteria by attacking chemical bonds in the cell walls causing lyses of the bacteria. One in vivo study with repeated intramammary injections of viable *S. aureus* showed transgenic clones of Jersey breed expressing the enzyme Lysostaphin in their milk to be more resistant against *S. aureus*. Comparisons were also made in relation to milk composition and yield.

Genetic engineering is expensive and the techniques are difficult to work with and require much refinement before they are ready to be use on the market. Regulations governing the GM animals on the EU food market are designed to provide high security for the biodiversity, maintain

consumer safety and avoid being a trade barrier. There are no approved GM production animals on the market. However, there is potential for usage of genetic engineering as a tool to create resistant animals in the future. This could also be used to increase production, reduce the use of antibiotics and promote animal welfare.

## Inledning

Möjligheten att modifiera produktionsdjuren har diskuterats ända sedan år 1982 när Palmiter et al (1982) visade att det var möjligt att förändra fenotyptrycket hos möss med hjälp av genetisk modifiering. Ett mycket stort steg togs 1996 när den första lyckade kloningen av ett produktionsdjur genomfördes - fåret Dolly (Wilmut et al, 1997). Forskningsframstegen på genetiskt modifierade (GM) djur har i jämförelse med forskning inom GM på växtsidan gått långsamt. Mycket av fokus har legat på medicinsk forskning, att skapa djurmodeller till forskning på humansjukdomar samt för att skapa potentiella donatorer till xenotransplantationer (Maga, 2005). Stora delar av forskningen kring GM på de vanligaste produktionsdjuren har gjorts från en produktionsynpunkt, antingen för ett förbättrat foderutnyttjande eller för ökad muskelansättning. Endast ett fåtal försök har inriktats på att förbättra djurens hälsa och motståndskraft mot patogener (Wall et al, 2005). Dagens gentekniker och forskning ger möjligheter att i framtiden använda sig av GM-djur för att öka intäkterna för lantbrukarna, påverka djurvälståndet samt att eventuellt, helt eller delvis utesluta risker för att specifika patogener sprids inom besättningar. En sjukdom som idag utgör en betydande kostnad för svenska mjölkproducenter är mastit. I svenska besättningar sänks det årliga täckningsbidraget i snitt med 550 kronor per ko och år till följd av kostnader för mastit. Detta motsvarar på nationell nivå förluster omkring 192 miljoner kronor exklusive kostnader för mastitprevention (Nielsen, 2009). Forskning pågår kring genetisk modifiering som kan göra nötkreatur resistent mot mastit orsakad av *S. aureus*. Syftet med denna litteraturstudie är att ge en övergripande bild av mastit, den pågående forskningen kring resistens mot mastit orsakad av *S. aureus* och de vanligaste metoderna som används för detta. Syftet är dessutom att sammanfatta vilka faktorer som tas i beaktande i riskanalyser och regelverk kring GM-djur, samt slutligen ge en grund till en diskussion kring vad denna teknik skulle kunna komma att betyda för djur, producenter samt konsumenter i framtidens livsmedelsförsörjning.

## Mastit

Mastit, eller juverinflammation som är en annan benämning på samma tillstånd, är en inflammatorisk reaktion i mjölkkörteln (International Dairy Federation, 1987) som uppkommer när patogena mikroorganismer tar sig in i juvret via spenkanalen. Det finns två typer av mastit, klinisk mastit samt subklinisk mastit. Gemensamt för dem båda är att de ger förhöjda celltal och förändringar i mjölksammansättningen. Den subkliniska typen är ofullständigt utvecklad och ger därför inte upphov till några symptom hos kon eller några synbara förändringar i mjölken. Till skillnad från den kliniska varianten som är fullt utvecklad och ger symptom hos kon så som förhöjd kroppstemperatur, ett ökat antal somatiska celler i mjölken samt inducerade akutproteiner i mjölken. Dessutom orsakar klinisk mastit synliga förändringar i mjölken (Forsbäck, 2011). Det ökade antalet celler i mjölken vid en infektion härrör från de makrofager och neutrofiler, vita blodkroppar, som induceras av kons immunförsvar vid en infektion. De smittsamma patogenerna sprids i huvudsak mellan djuren vid mjölkning och tenderar att ge subkliniska mastiter som senare kan bryta ut och orsaka fullt utvecklade kliniska mastiter (Harmon, 1994). Om patogenerna undkommer kons immunförsvar förökar de sig och kan börja producera toxiner som är skadliga för mjölkkörtlarna. Detta kan i sin tur leda till en ökning av den vaskulära permeabiliteten vilket medför en risk att blod tränger ut i mjölken (Østerås, 2000; Harmon,

1994). Vid en infektion sker till följd av immunoresponsen en drastisk ökning av antalet somatiska celler och mjölkens sammansättning förändras, vilket även påverkar mjölkens egenskaper som slutlig råvaruprodukt. I och med att infektionerna ökar celltalen kan metoder som utnyttjar celltalsräkning - somatic cell count (SCC), användas som en indikator för kontinuerlig kontroll av juverhälsan både på individ- och besättningsnivå. Speciellt effektiv är metoden när mjölkning sker på juverfjärdedelnivå eftersom infektionerna då kan detekteras i ett tidigt stadium. Detta ger möjlighet att tidigt kunna vidta åtgärder mot infektionen vilket har positiva effekter både på djurvälstånd och produktion. SCC ger även möjlighet att kassera mjölk från smittade kor som annars skulle höja det totala celltalet i mjölktanken.

Arlas kvalitetsprogram använder celltalet som en parameter när avräkningspriset sätts. Detta ska främja god hygien, god djurvälstånd samt förbättra utbytet av mjölken eftersom ostutbytet sänks när celltalet ökar. I dagens system kasseras all mjölk från den smittade kon men enligt Delaval (2013) finns teknik för att enbart utesluta mjölk från den infekterade juverdelen vilket skulle ge ett minskat produktionsbortfall. Denna metod är dock inte godkänd då det diskuteras huruvida detta skulle påverka djurvälstånd och mastitprevention. SCC gör det även möjligt att dela in djuren i grupper med avseende på juverstatus och därefter anpassa mjölkningsordningen. Genom att först mjölka de friska korna och därefter de med ett högre celltal kan smittspridningen i besättningen minskas. Dagens avelsarbete för mastitresistens går långsamt eftersom arvarheten för egenskapen är låg och för att det finns starka genetiska korrelationer mellan hög avkastning och mastitförekomst. Eftersom mycket av fokus ligger på att få högvastande djur så följer mastiterna med (Lund et al, 1996). Enligt statistik från Jordbruksverket (2008) stod behandlingarna av mastit år 2007 för den största andelen av det svenska lantbrukets totala antibiotikaanvändning. Det pågår utveckling av vaccin mot mastit orsakad av *S. aureus* men de är ännu inte utvärderade (Larsson, 2011).

### **Ekonomiska aspekter på mastit**

Enligt statistik från Svensk Mjolk (2008) var dålig juverhälsa och höga celltal huvudorsaken till utslagning i svenska mjölkbesättningar. År 2007 var snittet på förekomsten av kliniska mastiter 16 % av det totala antalet laktationer på de gårdar som var anslutna till kontrollsystemet Kokontrollen i Svensk mjölk (Svensk mjölk, 2008). De ekonomiska konsekvenserna av mastit i besättningar kan delas in i två grupper: direkta och indirekta. De direkta kostnaderna är exempelvis veterinärbehandling, produktionsbortfall under karenstiden och sänkt total kvalitet på mjölken från besättningen. De kostnader som kanske inte är lika uppenbara är de så kallade dolda eller indirekta kostnaderna. Dit räknas bland annat risken för smittspridning, subkliniska mastiter samt de förlängda kalvningsintervallen som orsakas av försämrad fertilitet (Kossaibati och Esslemont, 1997). Anledningen till utslagning av mjölkkor anges i ca 25 % av fallen vara relaterade till juversjukdomar vilket innebär att omkring 10 % av det svenska mjölkbeståndet årligen slås ut till följd av undermålig juverhälsa (Nielsen, 2009). Nielsen (2009) visade även att beräknat på den genomsnittliga mastitförekomsten i svenska besättningar skulle den ekonomiska vinningen av att halvera förekomsten av mastit i en besättning med 150 kor kunna ge 5 % ökning av det totala täckningsbidraget. Detta motsvarar möjlighet till extra avlöning för 1,2 timmar per dag eller 438 timmar per år för producenten.

## **S. Aureus-orsakad mastit**

*S. aureus* är en mycket smittsam patogen som sprids främst via mjölkningsorgan men även smittar via stallmiljön. Bakterierna kan spridas till nya värddjur på många olika sätt, bland annat genom juverläckage, öppna sår eller hasskador som kommer i kontakt med båsollar och liggytor (SVA, 2013). Omkring 30 % av de kliniska mastiterna antas vara orsakade av *S. aureus*. Infektionerna kan behandlas med antibiotika men effekten av antibiotika på de *S. aureus*-orsakade mastiterna är låg, ungefär 15 %. Detta beror på att antibiotikan har svårt att penetrera cellväggarna i mjölkkörtlarna och därför inte lyckas döda alla bakterierna. Detta leder i sin tur till att infektionen ofta återkommer när antibiotikabehandlingen avslutas och leder därför ofta till utslagning av smittade individer (Wall et al, 2005). *S. aureus* penicillinresistens härrör även till vissa stammars förmåga att producera enzymet betalaktamas som har förmåga att bryta ner penicillin. Dessutom har bakterien en förmåga att efterlikna virus och till exempel bilda slemkapslar för att undkomma immunförsvaret och antibakteriella preparat (SVA, 2013).

## **Genetisk modifikation**

En genetisk modifikation är när en förändring skapas i DNA som inte skulle kunna inträffa naturligt genom naturligt förekommande rekombinationer (EFSA, 2013a). Detta kan exempelvis ske genom att DNA tillsätts - antingen samma typ av DNA som redan finns i djuret, vilket leder till en dubbel uppsättning, eller tillsats av önskade DNA-fragment från en annan art vilket resulterar i en transgen individ. Eller så kan valda gener i djurets befintliga DNA stängas av. Dagens tekniker för att skapa genetiskt modifierade produktionsdjur är både ineffektiva och kostsamma vilket är en mycket begränsande faktor för användningen av dem (Clark & Whitelaw, 2003). Kostnaden för kloning av ett nötdjur uppgår till omkring 100.000 USD (forskning.se, 2013). De olika tekniker som används är spermamedierad DNA-överföring (Chang et al, 2002), intracytoplasmisk injektion av spermahuvuden (Perry et al, 1999; 2001), infektion eller injektion av oocyter och/eller embryon med hjälp av retro- eller lentivirusvektorer (Chan et al, 1998; Hoffman et al, 2003; 2004) eller genom överföring av somatiska cellkärnor (SCNT) eller kloning som metoden omnämns som i dagligt tal (Schnieke et al, 1997; Cibelli et al, 1998; Baguisi et al, 1999; Dai et al, 2002; Lai et al, 2002). SCNT är den idag mest lovande tekniken för att utveckla framtidens GM-djur. Effektiviteten grundas på andel levande födda och trots att denna teknik är den mest effektiva i det avseendet så är andelen ändå låg, bara 1-3% (Petersen et al, 2008; Mendicino et al, 2010). Effektivitetsgraden är dock betydligt högre när tekniken tillämpas på nötkreatur där en effektivitetsgrad på 15-20% kan uppnås (Kues & Niemann, 2004).

SCNT innebär att en cellkärna tas från en cell hos individen som ska klonas. Denna cellkärna innehåller en komplett uppsättning av gener identisk med djuret som den hämtades ifrån. Cellkärnan förs sedan in i en äggcell vars cellkärna har avlägsnats. Äggcellen och cellkärnan sammanförs och aktiveras sedan med hjälp av elektricitet och startar på så vis celledning. Blastocysten injiceras sedan i en surrogatmoder. Möjligheter finns att föra in fler gener utöver de från den klonade individens när äggcellen och cellkärnan sammanförs. Om generna som förs in kommer från en annan art ger detta upphov till en transgen individ. I påföljande generationer nedärvs modifieringen mendelskt vilket betyder att avkomman till två föräldradjur som är bärare med mycket hög sannolikhet kommer att uttrycka genen (Forabosco, 2013). En studie har gjorts på generation två (G2) av SCNT-djur där kor av rasen holstein användes för att mäta den fysiologiska djurhälsan, tillväxt och reproduktion. Kalvar från G2 visade sig ha en högre

födelsevikt men hade sedan samma tillväxthastighet som kontrollgrupperna. Dock vägde G2 mera än kontrollgrupperna vid vuxen ålder. Kvigor från G2 visade sig uppnå könsmognad 45 dagar senare än kontrollgrupperna med G1 klonade djur och ickeklonade A1-djur. Alla kor från G2 blev dräktiga och fick livskraftiga kalvar vilket bevisade att de var fertila, vilket var en av frågeställningarna som försöket syftade till att utröna (Wang et al, 2011).

## **Regler kring genetisk modifikation**

Riktlinjerna kring de genetiskt modifierade djuren sammanställs av ett arbetslag bestående av representanter från GMO-sektorn i European Food Safety Authority (EFSA) samt från Panel on Animal Health and Welfare, AHAW. Ett utkast med riktlinjer färdigställdes i slutet av 2011 och sändes ut för allmän påsyn under 2012 och den senaste uppdateringen av riktlinjerna skedde i juni samma år (EFSA, 2013b). För närvarande finns inga godkända GM-produktionsdjur på EUs marknad. Men eftersom utvecklingen går fort och inställningen till GM-djur skiftar runt om i världen så har EU valt att sätta upp grundläggande riktlinjer. Dessa riktlinjer ska vara applicerbara på framtida ansökningar om inträde av GMO på EUs livsmedelsmarknad Innan en GMO godkänns på den europeiska marknaden måste den genomgå en grundlig riskanalys, en så kallad Environmental Risk Assessment (ERA). Följande sex punkter rekommenderas att ingå för GM-djur och produkter framställda från dessa. (EFSA, 2013b).

1. Problemformulering inklusive identifierade risker
2. Specificering av riskerna
3. Tydliggörande av riskerna
4. Riskprioritering
5. Strategier för riskhantering
6. En övergripande riskutvärdering

En annan mycket viktig punkt som tas i beaktande är huruvida det finns risk att organismen kan reproducera sig och spridas i naturen. Återigen sker en stegvis analys hur stora riskerna är att en GM-individ kan rymma, om den då kan reproducera sig i det vilda, vilka individer den kan få livskraftig avkomma med, hur detta skulle kunna påverka urtypen samt hur detta skulle kunna påverka miljön och i slutändan den biologiska mångfalden. Den fullständiga rapporten "Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified animals" där alla punkterna beskrivs ingående finns att tillgå hos EFSA. Förutom detta hänvisar EFSA i sin rapport från Europakommissionen nr 1829/2003 till de kriterier som måste uppfyllas inom andra områden som spårbarhet, konsumentssäkerhet och djurvälstånd. Noggrann märkning ska enligt EFSA (2013c) och Jordbruksverket (2013) tillämpas på all föda som helt eller delvis består av, eller som har producerats av GMO. Varorna får inte släppas på marknaden innan dessa punkter i reglementet är säkerställda, men bör samtidigt inte inskränka handelsmöjligheterna med den övriga världen (EFSA, 2013a). För närvarande finns enligt Livsmedelsverket (2013a) ett hundratal godkända livsmedel innehållande GMO på den europeiska marknaden, varav alla kommer från växtriket. Dock återfinns endast ett fåtal av dessa livsmedel i Sverige. Enligt Jordbruksverkets (2013) regler måste livsmedels- och foderprodukter som innehåller, framställs eller består av GMO märkas noggrant för att upprätthålla konsumentssäkerheten. Kravet på märkning gäller även de levande GMO som inte är livsmedel eller foder. Dit räknas exempelvis prydnadsväxter och utsäde. Animalieprodukter som mjölk och ägg från djur som utfodrats med genetiskt modifierat foder behöver således inte märkas. I USA saknas krav på märkning och där

tillämpas istället principen att det som inte bevisats ohälsosamt för människans hälsa inte behöver märkas (Livsmedelsverket, 2013).

Statistik från konsumentföreningen Stockholm (2012) visar att konsumenternas inställning till livsmedel med ursprung i GMO blir mer positiv. Fem undersökningar har gjorts mellan åren 1998 och 2012. År 2001 svarade 69 % att GMO var mycket negativt och att det inte var troligt att de skulle köpa varan jämfört med 60 % 2012. Samma undersökningar visade att konsumenternas oro kring effekterna av GMO ökade med 18 % mellan 2007 och 2012, från 54 % till 72 %. 62 % av konsumenterna önskade märkning av kött från djur som utfodrats med GM-foder. På frågan vilken instans som konsumenterna hyser mest tilltro till i GMO-frågor svarade 82 % forskare, universitet och högskolor, 25 % livsmedelsindustrin och 17 % politiker. Konsumenterna blir mer medvetna i sina val av livsmedel och efterfrågan på ekologiska livsmedel ökar årligen med cirka 5-10 % och den ekologiska mjölken utgör cirka 10 % av den totala försäljningen av dryckesmjölk på den svenska marknaden (Ekoweb, 2013).

### **Lysostafin**

Lysostafin är ett peptidoglukanhydrolas, ett enzym, som uttrycks naturligt hos *Staphylococcus simulans* men som genom genetisk modifiering även kan uttryckas som cytosoliskt lysostafin hos eukaryota celler (Kerr et al, 2000). Lysostafinets effekt på *S. aureus* bevisades av Shindler & Schuhardt (1964) på 60-talet. Lysostafinet klyver glycyglycinbindningarna som finns i cellmembranen hos staphylococcer. *S. aureus* har visat sig vara mest känslig för enzymet vilket leder till att bakterien lyseras. Zygmunt et al (1965) jämförde 1965 hur olika stammar av bakterien påverkades av lysostafin jämfört med åtta olika penicillin-preparat. Resultaten visade att lysostafinet hade en betydligt högre verkan i jämförelse med de övriga preparaten i avseende på dos-verkan. Effekterna har även uppmärksammats inom humanforskningen eftersom lysostafinet avdödar de methicillinresistenta *S. aureus* (MRSA). Forskare vid Rensselaer Polytechnic Institute i USA har använt sig av nanotuber av kol för att koncentrera lysostafinet. Sedan kan denna förening appliceras i önskade material. I studien visades god avdödande effekt när ämnet blandades i vanlig väggfärg. Förhoppningarna är att kunna använda ämnet i beröringsytor på sjukhus, exempelvis i dörrhandtag, tvålpumpar och sänggavlar. Forskarna bedömer att risken för att bakterien ska bli resistent mot lysostafin är liten eftersom det är ett naturligt förekommande enzym. En annan fördel som forskarna poängterar är att enzymet är helt ofarligt för människans hälsa (Renssealer, 2010).

### **Genetisk modifikation för resistens mot mastit orsakad av *S. aureus***

Kerr et al (2000) har gjort en in vivo-studie på transgena möss som uttryckte lysostafin i mjölkkörtlarna. De infekterades med *S. aureus*-kultur och resultaten visade att motståndskraften ökade mot angrepp och att resistens kunde uppnås mot bakterien. Studien visade även att mjölsammansättningen var den samma för de modifierade individerna jämfört med kontrollgruppen, att mjölkkörtlarnas fysiologi inte förändrades och att fertiliteten inte påverkades. Wall et al, (2005) utförde först försök in vitro där mjölk innehållande lysostafin påvisades ha förmåga att avdöda *S. aureus*. Den lytiska aktiviteten observerades på agarplattor innehållande *S. aureus* med hjälp av spädningsserier med olika lysostafinkoncentrationer. När den avdödande förmågan återigen bevisats gjordes studier in vivo. Fibroblaster togs från sex jerseykor. Dessa användes som cellkärnsdonatorer för att via SCNT-tekniken ge upphov till 927 blastocyster av god kvalitet. Vid sammanfogandet av cellkärna och äggcell fördes även gener från *S. simulans* in i cellen. För att säkerställa att de blastocyster som skulle föras in i surrogatmödrar uttryckte



lysostafin-genen märktes genen med green fluorescent protein (GFP). GM-djuren utsöndrar tack vare modifieringen lysostafin i mjölkkörtlarnas sekretoriska epitel. Lysostafinets lytiska inverkan på *S. aureus* leder då till att individens motståndskraft mot angrepp ökar och att resistens kan uppnås. Blastocysterna resulterade i åtta levandefödda kalvar varav fem överlevde till vuxen ålder. Laktation inducerades hos tre av individerna. Kontrollgruppen bestod av tio stycken obesläktade icke klonade individer i samma ålder och samma laktation. Upprepade intramammära injektioner gjordes med bakteriekultur bestående av livskraftiga *S. aureus* i 3 av 4 spenar hos samtliga individer. Sjukdomssymptom uppstod i 34 av 48 fall (71 %) i kontrollgruppen och i 3 av 21 fall (14 %) hos de transgena djuren. Symptomen som mättes var ökad kroppstemperatur, ökat celltal och inducerade akutproteiner.

Analys med ELISA visades att lysostafinhalten höll en jämn nivå genom hela laktationen hos de modifierade individerna. För att avgöra om modifieringen påverkade mjölkproduktion eller mjölksammansättning jämfördes de transgena individernas mjölkavkastning och mjölksammansättning med kontrollgruppens. Dessutom jämfördes varje transgen individ med moderdjuret. Med moderdjur avsågs det djur som fibroblasten härstammade ifrån. I försöket upptäcktes inga signifikanta skillnader i producerad mjölmängd eller andel protein, dock fanns signifikanta skillnader i mängden fett. De genmodifierade individerna hade högre procentandel fett i mjölken, 6,7 % jämfört med kontrollgruppen samt de transgena djurens mödrar vars mjölk i snitt innehöll 5,1 % fett. I försöket var nivåerna av lysostafin 0,9-14 µg/ml mjölk. Alla transgena individer i försöket uppvisade förhöjd motståndskraft mot *S. aureus* och den individ med högst koncentration lysostafin visade sig vara resistent mot angrepp. Koncentrationen antas behöva ligga omkring 3 µg/ml för att uppnå resistens. Tidigare studier utförda av samma forskare har visat på en hämmad tillväxt av mjölkkörtlarna hos möss när koncentrationen av lysostafin överskrider 1400 µg/ml (Mitra et al, 2003a).

## Diskussion

Förekomsten av mastit är hög och påverkan är påtaglig på så väl djurvälstånd som produktion. Dagens avelsarbete för att uppnå mastitresistens hos mjölkkor går långsamt. Dels på grund av låg arvbarhet för mastitresistens men också eftersom det finns starka korrelationer mellan hög avkastning och mastitförekomst. Dagens svåra förutsättningar för mjölkproducenter innebär ett ständigt krav på att maximera avkastningen för att uppnå ekonomisk bärighet i verksamheten. Utifrån de analyser som gjorts på mastit ur ett ekonomiskt perspektiv finns möjligheter till stora besparingar. Som Nielsen (2009) rapporterat är förlusterna för svenska mjölkbönder årligen 192 miljoner kr exklusive kostnaderna för prevention. Om produktionskostnaderna skulle kunna sänkas till följd av minskad mastitförekomst så kvartstår dock frågan huruvida detta kommer att ge bönderna en vinst eller om det kommer utnyttjas av handeln för ytterligare sänkningar av priset för att kunna erbjuda en billigare produkt till konsumenten. Vilket i sin tur skulle leda till att avräkningspriset till mjölkproducenterna sänks. I takt med att Svenska konsumenter blir allt mer medvetna och selektiva i sina val av livsmedelsprodukter är en personlig reflektion att det kan bli svårt för genmodifierade varor att slå sig fram på den Svenska marknaden. Eftersom märkningen enligt EFSA (2013a), Livsmedelsverket (2013) och Jordbruksverket (2013) måste vara tydlig så kan det finnas en risk att produkten kommer väljas bort till fördel för närproducerade alternativ. Konsumentföreningen Stockholm (2012) visade i sina undersökningar att andelen konsumenter som skulle välja bort GMO-produkter har minskat men att oron för efterföljande effekter av konsumtionen har ökat, något som kan tyckas vara motsägelsefulla

resultat. Konsumenterna önskade även att de animalieprodukter som kommer från djur som utfodrats med GM-foder skulle märkas upp.

I frågan om att vinna konsumenterna ska det alltid tas i beaktande att lågprisalternativen är ständiga konkurrenter. Ett scenario är att produkter från GM-djuren genom potentiellt sänkta produktionskostnader skulle kunna resultera i ett lägre pris till konsument och på så vis bli valda. Dock ska vinsterna för uteblivna angrepp av *S. aureus* vägas mot den ökade kostnaden som det kommer innebära att köpa in den genmodifierade besättningen. Eftersom GM-djuren idag är mycket dyra så skulle det inte gå att få ekonomisk lönsamhet i en sådan besättning utan mycket stora insatser via stöd och bidrag. Eventuellet skulle ett godkännande av dessa livsmedel på marknaden kunna gynna dem som väljer att fortsätta med dagens konventionella eller ekologiska produktion eftersom dessa varor då kommer upplevas som mer genuina och därigenom generera ett mervärde.

Riskerna med GM-produktionsdjur är omdebatterade världen över och åsikterna är vitt skilda. Om de regler som EFSA (2013a) satt upp efterföljs så ska det inte finnas risk att godkända GM-djur kan påverka den genetiska mångfalden. Detta eftersom riskanalyserna är mycket grundliga och utvärderas i många steg. En potentiell risk är att de drivande krafterna inom området är mäktiga storföretag med siktet inställt på ekonomisk vinst. När en produkt, eller i det här fallet, ett djur blir GM så kommer det finnas möjlighet till patentering. Vilket skulle kunna leda till stora risker för djurvälrfärden. Storföretag med mycket resurser och inflytande skulle potentiellt kunna driva utvecklingen av rent ekonomiska skäl utan hänsyn till djuren. Det skulle även kunna leda till att storföretagen skulle få för mycket inflytande i aveln. Det är jämförbart med dagens avelsarbete inom fjäderfäsektorn där aveln sker bakom stängda dörrar med mycket begränsade möjligheter för omvärlden att påverka vad som sker. Eller som ett exempel från växtodlingen i USA där företaget Monsanto helt dominerar utsädesmarknaden med 93 % av sojaböns- och 80 % av majsodlingen. En annan risk med att vinstdrivande företag finansierar forskningen är att det gör att utredningar av nackdelar och bieffekter kan komma att eftersättas. Detta är tyvärr inte unikt för den här typen av forskning utan speglar troligtvis situationen för många av dagens forskningsområden.

Det är svårt att uttala sig om huruvida tekniken som används för att ta fram de mastitresistenta produktionsdjuren är optimal. Enligt Petersen et al (2008) och Mendicino et al (2010) så ska SCNT vara den mest effektiva metoden och ge högst andel levande födda. Trots detta är effektiviteten för metoden bara 1-3%. I försöket som Wall et al (2005) utförde så gav de 927 blastocysterna av god kvalitet endast åtta levandefödda kalvar varav fem uppnådde vuxen ålder. I rapporten omnämns inte hur många fibroblaster som användes för att få fram dessa blastocyster. De anger ej heller hur många surrogatmödrar som befruktades med blastocysterna för att få fram de åtta kalvarna. Detta gör det omöjligt att räkna ut den korrekta effektivitetsgraden för försöket. Dock kan det konstateras att de åtta kalvarna endast utgör 0,86 % av det totala antalet användbara blastocyster. Enligt Kues & Niemann (2004) kan en effektivitetsgrad på 15-20% uppnås. Dessa siffror är dock inte understödda med argument och bevis utan framstår som en framtidsvision mer än konkreta fakta. Om det skulle gå att uppnå högre effektivitetsgrad kan det få en positiv inverkan på allmänhetens inställning till GM-djuren. Detta då dagens låga effektivitetsgrad ofta tas upp som ett argument ur etisk synvinkel emot tillämpningar av tekniken.

Forskning kring GM pågår inom flera olika ämnesområden vilket kan leda till att forskningsframsteg uppnås snabbare och att dessa även kan utnyttjas till forskningen på GM-produktionsdjur. Eftersom tekniken är dyr och avancerad och marknaden ännu inte är öppen för den här typen av produktionsdjur så är det svårt att sja om framtiden. Resultaten från studien av Wall et al (2005) visade att den individ med högst koncentration av lysostafin i mjölken uppvisade resistens och de två andra lysostafinproducerande individerna uppvisade ökad motståndskraft. Det bör tas i beaktande att detta försök endast utförts en gång in vivo på nötkreatur och att det behövs många fler upprepningar för att statistiskt säkerställa resultaten. Resultaten överensstämmer dock med tidigare försök gjorda på möss av Kerr et al (2000). Det måste också tas i beaktande att när möss utsattes för höga halter av lysostafin så blev mjölkörteltillväxten hämmad (Mitra et al, 2003). Även om Wall et al, hänvisar till att nivåerna som behövs för att uppnå resistens hos kor ligger långt under de nivåer som mössen utsattes för så måste detta ändå utredas för att förutse tänkbara bieffekter på framtidens avelsmaterial.

Framstegen som gjorts inom humanforskningen visar på nya användningsområden där lysostafinet kan bindas in i olika material. Detta skulle potentiellt kunna utnyttjas i mjölkutrustning, kanske i framtidens spenkoppar för att minska spridningen av bakterien. Det har visat sig vara mycket svårt att hitta vetenskapliga källor på vad det kostar att köpa lysostafin. De företag som säljer ämnet gör det endast för användning inom forskning och laborativa miljöer och priset är omkring 400 kronor/ml (A&A Biotechnology, 2013). Därför är det i dagsläget inte ett alternativ för bonden att själv köpa in ämnet. Men för framtiden kanske det är enklare att tillhandahålla utrustning och produkter som innehåller ämnet än att genmodifiera djuren.

En teori för framtiden är att tekniken först kommer att tillämpas på slutna besättningar för att utveckla ett system som fungerar i praktiken. Därefter kan livdjur säljas till slutna besättningar som med strikt övervakning och dokumentation hålls utanför de vanliga produktionslinjerna. Det kan diskuteras huruvida detta verkligen kommer att efterlevas. Eftersom livdjuren med stor sannolikhet kommer att vara dyra och att dessa typer av besättningar troligen kommer drivas av entusiaster med specialintressen inom ämnet så är chanserna större att reglerna kommer att efterföljas. Det ska även tas i beaktande att djurmaterialet måste vara konkurrenskraftigt, ge funktionella djur som har lätta kalvningar. Eftersom födelsevikten för klonade djur är högre kan det komma att ge svåra kalvningar, något som kan få producenter att välja bort den typen av djur. Svåra kalvningar där kon eller kalven skadas eller dör är kostsamt och kanske framför allt, inte bra ur djurvälståndssynpunkt. Stor vikt måste också läggas vid kontroll av inavel inom besättningarna eftersom populationen troligtvis kommer vara mycket begränsad i storlek. Utöver detta behöver flera andra frågor kring avelsstrategierna för GM-djuren utredas, t ex om och hur individer ska tillåtas korsas med icke-klonade individer och i de fallen hur länge släktingar till dessa ska klassas som GM. Utöver detta behövs även strategier för hur avelsmaterial ska utvärderas samt hur det ska vara möjligt att kontrollera att genuttrycket av modifieringen bibehålls.

En annan praktisk aspekt är hur mejeriet ska ta hand om mjölken, exempelvis hur transporter av mjölk från gårdarna ska utföras. Eftersom det finns krav på att mjölken måste märkas som genmodifierad så kommer det vara nödvändigt att köra mjölken i separata mjölkbilar. Vilket kan få mejerier att avstå från hantering av den. Mejeriet måste även planera för rengöring mellan processerna med avseende på om råvaran har GM-ursprung eller inte. Ett annat alternativ kan

vara att sektionera mejeriet och ha separata avdelningar. Detta skulle innebära stora investeringskostnader och antalet intresserade mejerier kommer bero på hur omfattande produktionen med GM-ursprung blir. I dessa frågor kan många paralleller dras till den ekologiska mjölkproduktionen där mjölken måste hanteras skild från den konventionellt producerade.

En annan risk som diskuteras är huruvida arbetet med mastitprevention skulle påverkas av att ha en resistent besättning och hur detta då skulle påverka djurvälferden. Djurvälferden skulle kunna påverkas positivt med tanke på att antalet sjuka kor skulle kunna minska drastiskt. Det skulle medföra att många individer skulle undkomma onödigt lidande eftersom de *S. aureus*-orsakade infektionerna skulle utebli. Dessutom skulle antalet utslagskor kunna minskas vilket även skulle vara positivt ur etisk synvinkel. Eftersom *S. aureus* bland annat sprids via mjölkutrustning och liggytor (SVA, 2013) finns en tänkbar risk att skötsel och rengöring av dessa skulle komma att eftersättas. Men eftersom det finns fler bakterier än *S. aureus* som trivs i undermåligt skötta miljöer så kommer behovet av rengöring ändå att kvarstå. Det preventiva arbetet har fler fördelar än bara förebyggandet av *S. aureus*-orsakad mastit. Detta skulle troligen leda till att de flesta mjölkproducenterna skulle välja att fortsätta att upprätthålla preventionen trots resistens i besättningen. Mycket viktigt att tänka på är att det i den här studien enbart är resistensen mot *S. aureus* som behandlats. Vilket betyder att djuren fortfarande kan drabbas av mastit orsakad av andra patogener. Neds kärningen i antalet utslagsdjur är som sagt ett mycket starkt argument för tekniken. I dagens samhälle där etiska så väl som miljöpåverkande frågor väger tungt. Detta skulle spara mycket djurmaterial och minska behovet av rekrytering i förtid.

En annan faktor som kan diskuteras är risken att *S. aureus* kommer utveckla resistens mot lysostafin. Det är svårt att förutspå hur lång tid det potentiellt skulle ta för bakterien att mutera och byta struktur i cellmembranet, men risken finns. Vilket då skulle innebära ett behov av nya modifieringar och nya tekniker. Därför är det viktigt att löpande utvärdera effektivitet och verkan och ständigt söka nya lösningar.

Flera försök har påvisat enzymet lysostafins avdödande effekt på *S. aureus* vilket styrker resultaten som Wall et al (2005) kom fram till i sin studie. Lysostafinet har stor potential inom flera användningsområden i framtiden, inte minst för prevention och behandling av mastit. Innan det kan bli verklighet att använda GM-produktionsdjur som är mastitresistenta måste teknikerna för att ta fram funktionella och kostnadseffektiva GM-djur förfinas. Teknikerna måste ge högre effektivitetsnivåer med fler levande födda och resultera i avkommor med bättre fysiologiska förutsättningar jämfört med dagens. För att det ska bli möjligt att använda detta i framtiden krävs även att individerna klarar att passera igenom alla olika steg i riskanalyserna och att anpassade produktionsformer kan utnyttjas. När tekniken är ekonomiskt, etiskt och djurvälferdsmässigt försvarbar kan det ge framtidens mjölkproducenter och mjölk kreatur helt nya förutsättningar.

## Referenser

- A&A Biotechnology. 2013. [http://www.shop-aabiot.home.pl/en\\_GB/c/Lysostaphin/79](http://www.shop-aabiot.home.pl/en_GB/c/Lysostaphin/79).  
Maj 2013.
- Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D., Pollock, J.S., Destrepes, M.M., Cammuso, C., Williams, J.L., Nims, S.D., Porter, C.A., Midura, P., Palacios, M.J., Ayres, S.L., Denniston, R.S., Hayes, M.L., Ziomec, C.A., Meade, H.M., Godke, R.A., Gavin, W.G., Overstöm, E.W., Echerald, Y. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *National biotechnology* 17, 456-461.
- Chan, A.W., Homan, E.J., Ballou, L.U., Burns, J.C., Bremel, R.D. 1998. Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *Proceedings of the national academy of sciences U.S.A* 95, 14028-14033
- Chang, A.W., Qian, J., Jiang, M., Liu, Y.H., Wu, M.C., Chen, C.D., Lai, C.K., Lo, H.L., Hsiao, C.T., Brown, L., Bolen Jr., Huang, H.I., Ho, P.Y., Shih, P.Y., Yao, C.W., Lin, W.J., Chen, C.H., Wu, F.Y., Lin, Y.J., Xu, J., Wang, K. 2002. Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer. *BMC Biotechnology* 2, 5.
- Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.L., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F.A., Robl, J.M. 1998. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem like cells. *National Biotechnology* 16, 642-646.
- Clark, J., Whitelaw, B. 2003. A future for transgenic livestock. *Nature reviews* 4, 825
- Dai, Y., Vaught, T.D., Boone, J., Chen, S.H., Phelps, C.J., Jobst, P.M., McCreath, K.J., Lamborn, A.E., Cowell-Lucero, J.L., Wells, K.D., Colman, A., Polejeva, I.A., Ayares, D.L. 2002. Targeted disruption of the  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *National biotechnology* 20, 251-255.
- Delaval. 2013. Föreläsning under kursen Djurmiljö och Byggnadsfunktion. Februari 2013.
- EFSA. 2013a. Genetically modified animals.  
<http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/gmanimals.htm?wtr=01>. April, 2013.
- EFSA. 2013b. Public consultation on the draft Guidance Document on the Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Animals.  
<http://www.efsa.europa.eu/en/consultationsclosed/call/120621.htm>. April 2013.
- EFSA. 2013c. Regulation (EC) Nr 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. [http://eur-lex.europa.eu/Result.do?T1=V2&T2=2003&T3=1829&RechType=RECH\\_consolidated&Submit=Search](http://eur-lex.europa.eu/Result.do?T1=V2&T2=2003&T3=1829&RechType=RECH_consolidated&Submit=Search) April 2013.
- Ekoweb. 2013. Ekologisk livsmedelsmarknad - Rapport om den ekologiska branschen. Ekoweb.nu 1, 13.

Forsbäck, L. 2011. Mjölksammansättning på juver fjärde dels nivå i relation till juverhälsa Svensk mjölk -Forskning Special 5.

Forskning.se. 2012. Varför vill man klona vuxna djur?

<http://www.forskning.se/nyheterfakta/teman/kloning/tiofragorochsvar/varforvillmanklonavuxnadjur.5.303f5325112d7337692800014901.html>. April 2013.

Forabosco, F. 2013. Personligt meddelande. Inst f husdjursgenetik, SLU. Mars 2013.

Harmon, R.J. 1994. Symposium-Mastitis and genetic evaluation for somatic cell count-physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *Journal of dairy science* 77, 2103-2112.

Hoffman, A. Kessler, B., Ewerling, S., Weppert, M., Vogg, B., Ludwig, H., Stojkovic, M., Bolhauve, M., Brem, G., Wolf, E., Pfeifer, A. 2003. Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO* 4, 1054-1060.

Hoffman, A., Zakhartchenko, V., Weppert, M., Sebalt, H., Wenigerkind, H., Brem, G., Wolf, E., Pfeifer, A. 2004. Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. *Biology of reproduction journal* 71, 405-409.

International Dairy Federation. 1987. Bovine Mastitis: Definition and Guidelines for diagnosis. *Bulletin of international Dairy Federation* 211, 24pp.

Jordbruksverket 2008. Djurhälsa år 2007. Maj 2013.

Jordbruksverket, 2013. Genetiskt modifierade produkter ska vara märkta.

<http://www.jordbruksverket.se/amnesomraden/odling/genteknikgmo/kommersiellanvandning/markning.4.300b18bd13d103e79ef80002539.html>. April 2013.

Kerr, E.D., Plaut, K., Bramley, A.J., Williamson, M.C., Lax, A.J., Moore, K., Wells, D.K., Wall, R.J. 2000. Lysostaphin expression in mammary glands confers protection against staphylococcal infection in transgenic mice. *Nature biotechnology* 19, 66-70.

Kossaibati, M.A., Esslemont, R.J. 1997. The cost of production diseases in dairy herds in England. *Veterinary Journal* 154, 45-51.

Konsumentföreningen Stockholm. 2012. Rapport Medlemmarnas attityder till genmodifierade livsmedel. Juli 2012.

Kues, W.A., Niemann, H. 2004. The contribution of farm animals to human health. *Trends in biotechnology* 22, 286-294.

Lai, L., Kolber-Simonds, D., Park, K.W., Cheong, H.T., Greenstein, J.L., Im, G.S., Samuel, M., Bonk, A., Rieke, A., Day, B.N., Murphy, C.N., Carter, D.B., Hawley, R.J., Prather, R.S. 2002. Production of  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295, 1089-1092.

- Larsson, M. 2011. Vaccination mot mastit orsakad av *Stafylococcus Aureus*. Sveriges lantbruksuniversitet, Veterinärmedicinska fakulteten, Veterinärprogrammet. Examensarbete.
- Livsmedelsverket. 2013. Märkning av mat, GMO- genmodifierad mat. April 2013. <http://www.slv.se/grupp1/Markning-av-mat/Genmodifierad-mat-GMO/#finnsd>
- Lund, T., Miglior, F., Dekkers, J.C.M., Burnside, E.B 1996. Genetic relationship between clinical mastitis, somatic cell count, and udder conformation in Danish Holsteins. *Livestock production science* 39, 243-251.
- Maga, E. A. 2005. Genetically engineered livestock: closer than we think? *TRENDS in Biotechnology* 23, 11.
- Mendicino, M., Ramsoondar, J., Phelps, C., Vaught, T., Ball, S., LeLoith, T., Monahan, J., Chen, S., Dandro, A., Boone, J., Jobst, P., Vance, A., Wertz, N., Bergman, Z., Sun, X-Z., Polejeva, I., Butler, J., Dai, Y., Ayares, D., Wells, K. 2010. Generation of antibody- and B cell-deficient pigs by targeted disruption of the J-region gene segment of the heavy chain locus. *Transgenic research. Advances in genetics* 80, 89.
- Mitra, A., Hruska, K.S., Wellnitz, O., Kerr, D.E., Capuco, A.V., Wall, R.J. 2003. Expression of *Lysostaphin* in milk of transgenic mice affects the growth of neonates. *Gene Evaluation and Mapping Laboratory, Department of Agriculture, Agricultural Research Service* 5, 597-605.
- Nielsen, C. 2009, Economic impact of mastitis in dairy cows. Doctoral thesis. Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap. Department of animal breeding and genetics. SLU.
- Palmiter, R. D., Brinster, R.L., Hammer, R.E., Trumbauer, E.M., Rosenfeld, M.G., Birnberg, N.C., Evans, M.R. 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300, 611-615.
- Perry, A.C.F., Wakayama, T., Kishikawa, H., Kasai, T., Okabe, M., Toyoda, Y., Yanagimachi, R. 1999. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science* 284, 1180-1183.
- Perry, A.C., Rothman, A., de las Heras, J.I., Feinstein, P., Mombaerts, P., Cooke, H.J., Wakayama, T. 2001. Efficient metaphase II transgenesis with different transgene archetypes. *National biotechnology* 19, 1071-1073.
- Petersen, B., Lucas-Hahn, A., Oropeza, M., Hornen, N., Lemme, E., Hassel, P., Queisser, A.L., Niemann, H. 2008. Development and validation of a highly efficient protocol of porcine somatic cloning using preovulatory embryo transfer in peripubertal gilts. *Cloning stem cells* 10, 355-362.
- Renssealer. 2010. Rensselaer Polytechnic Institute Researchers Develop Coating That Safely Kills MRSA on Contact. <http://news.rpi.edu/update.do?artcenterkey=2759>. Maj 2013.

- Schnieke, A.E., Kind, A.J., Ritchie, W.A., Mycock, K., Scott, A.R., Ritchie, M., Wilmut, I., Colman, A., Campbell, K.H. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 278, 2130-2133.
- Shindler, C & Schuhardt, V.T. 1964. Lysostaphin: a new bacteriolytic agent for the staphylococcus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 51, 414-421.
- SVA. 2013. Endemiska sjukdomar-Mastit orsakad av *Staphylococcus aureus*. <http://www.sva.se/sv/Djurhalsa1/Notkreatur/Endemiska-sjukdomar/Mastit/Mastit-orsakad-av-Staphylococcus-aureus/>. April 2013.
- Svensk Mjök 2008. Husdjursstatistik, 2008. Svensk Mjök, Stockholm, Sweden.
- Wall, R., Powell, A, M., Paape, M, J., Kerr, D, E., Bannerman, D, D., Pursel, V, G., Wells, K, D., Talbot, N., Hawk, H, W. 2005 Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infektion. *Nature Biotechnology* 23, 4.
- Wang, H., Zhang, J.X., Zhao, M.B., Zhang, X.L., Sun, Q.Y., Chen, D.Y. 2011. Production and health of second generation cloned Holstein cows derived by somatic cell nuclear transfer. *Animal reproduction science* 126, 11-18.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., Campbell, K.H.S. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813.
- Zygmunt, W.A., Harrison, F.E., Browder, P.H. 1965. Microbiological activities of Lysostaphin and penicillins against bacteriophage 80/81 strains of *Staphylococcus aureus*. *Applied microbiology* 3, 491-493.
- Østerås, O. 2000 The cost of mastitis – an opportunity to gain more money. *Proceedings of the British Mastitis conference-2000, Shepton Mallet, U.K.* pp 67-77.