



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för kliniska vetenskaper

Risker vid kalvutfodring med mjölk från *Staphylococcus aureus*-infekterade kor

Madeleine Lodin Järvinen

*Uppsala
2015*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2015:2*

Risker vid kalvutfodring med mjölk från *Staphylococcus aureus*-infekterade kor

Risks of feeding calves with milk from *Staphylococcus aureus*-infected cows

Madeleine Lodin Järvinen

Handledare: Camilla Björkman, Institutionen för kliniska vetenskaper

Biträdande handledare: Karin Artursson, FoU, Avdelningen för Bakteriologi, SVA

Examinator: Catarina Svensson, Institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0736

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2015

Delnummer i serie: Examensarbete 2015:2

ISSN: 1652-8697

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

Nyckelord: kalv, diarré, *Staphylococcus aureus*, utfodring, överskottsmjolk, mastit, juverinflammation, enterotoxiner

Key words: calf, diarrhea, *Staphylococcus aureus*, feeding, waste milk, mastitis, enterotoxins

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Staphylococcus aureus är både den vanligaste mastitersakande bakterien hos svenska mjölkkor och den bakterie som orsakar flest matförgiftningsutbrott hos människa världen över. Utveckling av tekniker som möjliggör subtypning och genkaraktärisering av *S. aureus*-isolat har möjliggjort stora framsteg inom *S. aureus*-epidemiologin på senare år. I Sverige är det mycket vanligt att kalvar utfodras med mjölk som kan innehålla *S. aureus*, och hos unga kalvar är diarré den vanligaste sjukdomen och dödsorsaken. Kunskapen om *S. aureus* och dess enterotoxiners potentiella påverkan på unga kalvars tarmhälsa är idag mycket liten.

I detta arbete genomfördes en fältstudie i tre svenska mjölkbesättningar med över 100 mjölkkor som utfodrar sina kalvar med helmjölk, antingen överskottsmjölk eller tankmjölk, som innehåller *S. aureus*. Prover har tagits som mjölkprov från individuella kor i besättningarna, från utfodringsmjölken till kalvar samt som träckprov från unga (<5 veckor gamla) kalvar. Isolat av *S. aureus* har genkaraktäriserats med DNA microarray och stamtypats via pulsfält gelelektrofores.

I en besättning återfanns samma pulstyp av *S. aureus* i mjölk från individuella kor, i överskottsmjölken som kalvarna utfodrades med samt i träck från kalvarna. Pulstypen kodade även för ett antal klassiska och nya enterotoxiner samt för toxic shock syndrome toxin-1. Resultaten styrker hypotesen om att *S. aureus* kan passera mag-tarmkanalen på unga kalvar. *S. aureus* förmåga att kolonisera tarmen på kalvar samt enterotoxinernas effekter behöver studeras vidare för att klargöra riskerna med oralt intag.

SUMMARY

Staphylococcus aureus is a common cause of bovine mastitis and human food poisoning worldwide. Technical advances in subspecies typing and gene characterization in recent years have enabled great progress in the field of *S. aureus* epidemiology. Swedish calves are often fed milk that might contain *S. aureus*. Enteritis is the most common disease and cause of death in young calves. Today it is not known if *S. aureus* has a potential to affect the gastrointestinal health of young calves.

A field study was performed in three Swedish dairy herds with more than 100 cows, which fed their calves with whole milk containing *S. aureus*. In each herd, samples were taken from individual cows, from milk fed to calves and from feces of young (<5 weeks old) calves. Isolates of *S. aureus* were analyzed by DNA microarray to identify genes coding for enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1. Isolates were also typed using pulsed-field gel electrophoresis for comparison of isolates from different origin.

In one herd the same *S. aureus* pulstyp was found in samples from individual cows and the milk that was fed to calves. Three out of six bacterial isolates retrieved through bacterial culturing from rectum samples of different calves in this herd were of this same pulstyp. The results indicate that *S. aureus* can pass the gastrointestinal tract of young calves. *S. aureus* potential to colonize the GI tract of young calves and the effects of enterotoxins need further research.

INNEHÅLL

FÖRKORTNINGAR.....	1
INLEDNING.....	2
LITTERATURSTUDIE.....	3
KALVUPPFÖDNING I SVENSKA MJÖLKBESÄTTNINGAR.....	3
<i>Inhysningssystem</i>	3
<i>Utfodring</i>	4
Den livsviktiga råmjölken	4
Den mjölkdrickande kalven.....	5
Mjölkutfodringssystem.....	5
Överskottsmjolk	6
<i>Diarré hos unga kalvar</i>	7
<i>Staphylococcus aureus i mjölk till kalvar</i>	8
STAPHYLOCOCCUS AUREUS	9
<i>Mastitpatogen</i>	10
Kliniska och subkliniska mastiter	10
<i>Humanpatogen</i>	11
Matförgiftning hos människa.....	11
<i>Enterotoxiner och toxic shock syndrome toxin-1</i>	12
Enterocolit	13
<i>Metoder för att påvisa och karaktärisera Staphylococcus aureus</i>	14
Bakteriologi.....	14
Vogel-Johnson medium.....	14
Baird-Parker agar	15
DNA microarray	15
Pulsfält gelelektrofores (PFGE).....	16
MATERIAL OCH METODER.....	17
STUDIEDESIGN.....	17
<i>Förstudie</i>	17
Besättning II.....	18
Besättning IV.....	19

Besättning VI.....	19
<i>Slutliga inklusionskriterier</i>	19
<i>Kalvutfodringsstudie</i>	19
PROVTAGNING.....	20
BAKTERIOLOGI.....	20
GENKARAKTÄRISERING OCH STAMTYPNING	21
<i>DNA microarray</i>	21
<i>Pulsfält gelelektrofores</i>	21
RESULTAT	23
FÖRSTUDIE – UTFALL AV PROVTAGNINGAR I URVALSSKEDET	23
<i>Genkaraktärisering av S. aureus från individuella kor</i>	23
<i>S. aureus i kalvutfodringsmjölken</i>	23
KALVUTFODRINGSSTUDIEN	23
<i>Besättning II</i>	23
<i>Besättning IV</i>	23
<i>Besättning VI</i>	23
<i>Stamtypning</i>	24
DISKUSSION	27
ENTEROTOXINGENER HOS <i>S. AUREUS</i>	27
<i>S. AUREUS</i> I KALVUTFODRINGSMJÖLKEN.....	28
<i>S. AUREUS</i> I TRÄCKPROVER.....	29
STAMTYPNING.....	30
SLUTSATS	31
TACK	31
REFERENSER	32
BILAGA 1	40
BILAGA 2	41
BILAGA 3	42

FÖRKORTNINGAR

BT – Bakteriofagtypning

FPT – Failure of passive transfer, bristande passiv överföring

HCl – saltsyra

Ig – Immunglobulin

MALDI-TOF – Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight

MHC – Major histocompatibility complex

MS – Masspektrometri

NSAID – Non-steroidal antiinflammatory drug

PFGE – Pulsfält gelelektrofores

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

SAg – Superantigen

SE – Stafylokock Enterotoxin

SEI – Stafylokock Enterotoxin-liknande

Se – gen som kodar för stafylokock enterotoxin, skrivs med små kursiverade bokstäver

SRB – svensk rödbrokig boskap

TCR – T-cellreceptor

TSS – Toxic Shock Syndrome

TSST-1 – Toxic Shock Syndrome Toxin 1, genen som kodar för detta protein skrivs på samma sätt men med små kursiverade bokstäver

INLEDNING

Diarré är den vanligaste sjukdomen hos unga kalvar i mjölk- och köttproducerande besättningar både i Sverige och utomlands (Svensson *et al.*, 2003). Det är ett symptom på en störning av tarmens funktion som kan ha olika orsaker såsom infektioner, låg immunitet, stress och brister i skötsel, miljö och utfodring. Dessa faktorer kan också samverka och göra att symptomen förvärras. Anledningen till diarrén kan idag fastställas i mindre än hälften av undersökta fall (de Verdier, 2006).

Inom mjölkproduktionen är det vanligt att mjölk som inte kan levereras till mejeriet används till kalvutfodring under kalvens första levnadsmånader. Denna s.k. överskottsmjölk består av mjölk med avvikande egenskaper t.ex. flockor, förändrad färg, höga celltal eller mjölk som kommer från djur som står på läkemedelsbehandling eller med karens efter läkemedelsbehandling (Danielsson, 2012; Duse *et al.*, 2013). I besättningar med juverhälsoproblem är *Staphylococcus aureus* den i Sverige vanligaste orsaken till mastit (juverinflammation) (Ericsson Unnerstad *et al.*, 2009). Det är vanligt att bakterier återfinns i mjölken även i de fall inga kliniska förändringar av mjölkens utseende förekommer, så kallad subklinisk mastit. I besättningar som har juverhälsoproblem orsakade av *S. aureus* kan mer än hälften av korna vara positiva för *S. aureus* i mjölken utan att producenten upplever några större problem med kliniska *S. aureus*-mastiter, annat än i sporadiska fall (Capurro *et al.*, 2010b).

Vanligen är det i huvudsak en stam av *S. aureus* som orsakar problem i respektive besättning. Både humana och bovina stammar av *S. aureus* kan producera enterotoxiner. I ett examensarbete vid Lunds Universitet 2012 visades att flera av de stammar av *S. aureus* som isoleras från mjölk hos svenska kor med mastit hade gener som kodar för enterotoxiner. Bland 61 isolat från olika besättningar förekom enterotoxingener hos 77 % av isolaten, och majoriteten av dessa kunde även induceras att producera enterotoxiner under experimentella förhållanden (Blom, 2012). Förekomst av enterotoxiner i mjölk och mjölkprodukter kan ge upphov till matförgiftning med kräkningar och diarréer hos människa (Argudín *et al.*, 2010).

Det finns mycket lite om enterotoxiners effekter hos kalv att återfinna i litteraturen. Däremot finns det experimentella studier som visar att bland annat get, gris och gnagare kan drabbas av diarré när de tillförs enterotoxiner (Van Miert *et al.*, 1984; Van Gessel *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2005). Det finns också studier som tyder på att *S. aureus* kan kolonisera tarmen och producera enterotoxiner hos unga individer (Highet & Goldwater, 2009). Direkt mätning av enterotoxiner i avföring är svårt, däremot går det att genom bakteriologisk odling påvisa eventuell förekomst av *S. aureus* och därefter analysera bakterieisolaten för enterotoxingener.

Hypotesen för det här arbetet är att mastitorsakande *Staphylococcus aureus* i mjölk som används till kalvutfodring kan producera enterotoxiner, vilket i sin tur kan påverka kalvarnas hälsa negativt.

Frågeställning: kan enterotoxinproducerande *Staphylococcus aureus* passera genom mag-tarmkanalen hos kalvar som utfodras med mjölk innehållande *S. aureus*?

LITTERATURSTUDIE

Kalvuppfödning i svenska mjölkbesättningar

Inhysningssystem

I Sverige är 55 % av alla mjölkkor inhysta i lösdrift, medan 45 % hålls uppbundna (Lantbrukarnas riksförbund, 2014). Denna statistik är baserad på data från Kokontrollen, som 84 % av alla Sveriges mjölkkor är anslutna till (Växa Sverige, 2014a). Trenden går mot en ökning av lösdriftssystemet, och andelen svenska mjölkkor som inhyses i lösdrift är idag sannolikt något större än siffran som anges ovan (Växa Sverige, 2014b). Detta är till stor del en följd av att det sedan 2007 inte längre är tillåtet att ta i drift nya ladugårdar för uppbundna kor (2 kap. 1§ Statens jordbruksverks föreskrifter och allmänna råd [SJVFS 2010:15] om djurhållning inom lantbruket m.m., saknr L 100).

Enligt samma föreskrifter, 2 kap 15 §, måste det i alla besättningar finnas särskilda utrymmen för kor som ska kalva. Det kan vara boxar för en eller flera kor, och syftet är att ge korna möjlighet att kalva i enskildhet en bit från flocken så som är deras naturliga beteende. Hur många platser i kalvningsbox djurhållaren ska tillhandahålla beror på hur kalvningarna är fördelade över året, och varierar från en plats i kalvningsbox per 10 kor till en plats per 50 kor. Om alla kalvar föds under en kort tidsperiod under stallperioden (vinterhalvåret) krävs fler kalvningsplatser i förhållande till antalet kor än om kalvningarna sker jämnt utspritt över hela året eller till stor del under betesperioden.

I takt med att besättningsstorleken på svenska mjölkgårdar successivt har ökat, från i genomsnitt 15 kor per besättning år 1980 till 74 kor per besättning år 2013 (Jordbruksverket, 2014), har även kalvhållningen förändrats. Under 1980-talet och början på 1990-talet inhystes 9 av 10 kalvar i ensambox (Bernes *et al.*, 1986; Norrman, 1990; Stenebo, 1995). Därefter ökade användningen av gruppboxar, och 2001 rapporterades att 28 % av de i studien 877 ingående besättningarna inhyste kalvarna i gruppbox under mjölkperioden (Pettersson *et al.*, 2001). Om den ökade användningen av gruppboxar till viss del beror på att svenska besättningar har ökat i storlek kan man anta att en ännu större andel av svenska mjölkgårdar idag använder gruppboxar för inhysning av kalvar under mjölkperioden.

I dagens stora besättningar är det en fördel att inhysa kalvar i grupp eftersom det där finns ökade möjligheter att ersätta mankraft med maskiner och teknik vid bland annat utfodring och rengöring. Dessutom utnyttjas utrymmet i ladugården bättre då det går åt mindre yta per kalv vid inhysning i gruppbox. Ytterligare en fördel är att kalvarna tillåts utföra naturliga beteenden så som interaktion med andra kalvar och lekbetaende. Inhysning i grupp har visats underlätta utvecklingen av normala sociala beteenden hos kalvar (Jensen *et al.*, 1999; Babu *et al.*, 2004). Det finns också en studie som visat att kalvar har ett behov av att röra sig mer än vad inhysning i ensambox tillåter (Jensen, 1999).

Ur välfärds- och djurskyddssynpunkt är det av dessa anledningar bättre att kalvar får leva i grupp än i ensamboxar. Bland beteenden som ökar vid grupphållning finns dock även sådana som är mindre önskvärda, framför allt att kalvarna har möjlighet att utöva sugbetaende på varandra vilket kan medföra spridning av patogena mikroorganismer. Grupphållna kalvar spenderar mer tid med att utföra sugbetaende på andra kalvar eller inredningen än individuellt hållna kalvar (Babu *et al.*, 2004).

Livet i grupp kan också utgöra en större hälsorisk för kalvarna. Detta gäller framför allt respiratorisk sjukdom som både internationellt och i svenska studier visats vara vanligare hos grupphållna kalvar än hos individuellt hållna (Curtis *et al.*, 1988; Svensson *et al.*, 2003). För diarré är det inte lika uppenbart att grupphållning utgör en riskfaktor. Det finns flera studier som tyder på en ökad risk för diarré vid grupphållning (Goodger & Theodore, 1986; Perez *et al.*, 1990; Olsson *et al.*, 1993), men i andra studier har man inte kunnat påvisa ett sådant samband (Svensson *et al.*, 2003; Hanninen *et al.*, 2003).

Utfodring

Den livsviktiga råmjölken

Två avgörande faktorer skiljer den nyfödda kalven från den vuxna kon. För det första föds kalven med ett naivt immunförsvar, dvs. dess blodcirkulation innehåller inga antikroppar vilket gör den mycket känslig för infektioner. För det andra är förmagarna outvecklade, istället är löpmagen välutvecklad och kalven är helt beroende av en mjölkdiät under sina första två levnadsveckor och dess metabolism är inställd på laktos som huvudsaklig energikälla (Guilloteau *et al.*, 2009b).

Råmjölk är den mjölk som kon producerar i samband med och under det första dygnet efter kalvningen (Weaver *et al.*, 2000). Denna innehåller förutom höga nivåer av viktiga näringsämnen (fett, laktos, protein, vitaminer, mineraler, spårämnen) även stora mängder antikroppar från kon (Blum, 2006). Antikropparna överförs till mjölken via juvret i en receptorberoende process som nedregleras så snart den första urmjölkningen har skett (Baintner, 2007). Därefter börjar antikropparna resorberas tillbaka till kons blodcirkulation och efterkommande mjölkningar innehåller således successivt kraftigt minskande nivåer av de för kalven livsnödvändiga immunglobulinerna (Ig) (Moran, 2002).

Hos kalven är den absorptiva förmågan av Ig som störst vid födseln och minskar därefter med i snitt 5 % för varje halvtimme, vilket innebär en förlust av 30 % av absorptionsförmågan 6 timmar efter födseln (Moran, 2002). När kalven föds är pH cirka 5,5 - 6,5 längs med hela mag-tarmkanalen (Guilloteau *et al.*, 2009b). Produktionen av saltsyra i löpmagen och bikarbonat i duodenum är låg under det första levnadsdygnet vilket bidrar till att hålla pH på en sådan nivå att enzymaktiviteten i löpmage och duodenum är minimal. Detta leder till en försumbar nedbrytning av de viktiga Ig-molekylerna (Baintner, 2007; Guilloteau *et al.*, 2009b). Dessutom innehåller råmjölken en syrabeständig trypsin-hämmare som ger ytterligare ett visst skydd mot proteaser från bukspottkörteln (Baintner, 2007).

När immunglobulinerna når tunntarmen kommer de i kontakt med omogna enterocyter (tarmväggsceller). I dessa finns under de första 24-48 timmarna efter födseln en typ av transportvakuoler som kan transportera stora mängder proteiner över tarmepitelet och frisätta dessa i intakt form till den systemiska cirkulationen (Baintner, 2007). Allteftersom tar dock en annan typ av vakuol över som innehåller lysozomala enzymer som bryter ner proteinerna innan de når cirkulationen. De förändringar som sker i mag-tarmkanalen under kalvens första två levnadsdygn leder inte bara till oförmåga att absorbera immunglobuliner utan innebär också ett ökat skydd mot patogena mikroorganismer (Moran, 2002). Förändringarna medieras till stor del av ämnen som finns i råmjölken, såsom tillväxtfaktorer (IGF) och hormoner (Blum, 2006). Dessa ämnen utövar en lokal effekt i tarmen som bland annat leder till epitelcellsproliferation, differentiering och apoptos samt utveckling av det lokala immunförsvaret, matsmältningen och absorptionen i tarmen. Till viss del har de även en systemisk effekt på metabolism, endokrina system, hemostas samt beteende och tillväxt hos kalven.

För att förvärva en god passiv immunitet behöver kalven absorbera minst 100 g Ig (Moran, 2002; McGuirk & Collins, 2004). Uppnås inte en serumkoncentration över 10 g/L har kalven råkat ut för vad som i engelskspråkig litteratur kallas Failure of Passive Transfer (FPT), dvs. ”bristande passiv överföring”, som är ett tillstånd som associeras med ökad mortalitet och morbiditet hos både kött- och mjölkkraskalvar (Filteau *et al.*, 2003; Dewell *et al.*, 2006). Bland mjölkkraskalvar är FPT idag mycket vanligt (Moran, 2002; McGuirk & Collins, 2004). Man vet dock inte helt vad detta beror på. En orsak skulle kunna vara att de stora mängder mjölk som dagens kor avlats för att producera innebär en utspädning av Ig i råmjölken. Ig-nivåerna kan variera mellan 40 och 90 g/L vilket ger en

volymvariation på 1,5-3,5 L råmjölk som behöver intas före 6 timmars ålder för att kalven ska få i sig tillräckligt med antikroppar (Moran, 2002).

Kalvens löpmage rymmer ca 2 L vid födseln och det första målet överstiger sällan denna volym om kalven får dia själv. Har kon en god råmjölkskvalitet räcker detta för att kalven ska förvärva en god passiv immunitet, men det har visat sig vara relativt vanligt att kvaliteten på råmjölken hos dagens mjölkkor är sämre än så (Moran, 2002; McGuirk & Collins, 2004). För att vara på den säkra sidan bör alltså alla kalvar få ett första mål på 3-4 L råmjölk inom 6 timmar från födseln. Tid, mängd och kvalitet är de tre avgörande faktorerna, det första målet är viktigast eftersom det stimulerar förändringar i löpmage och duodenum som försämrar absorptionen av Ig. Enligt Moran (2002) är det inte ett problem att det första mjölkmalet överstiger löpmagens volymkapacitet, överskottet hamnar i våmmen och portioneras därefter ut i löpmagen. Data från drygt 15 år gamla studier i svenska mjölkbesättningar antydde att en majoritet av svenska mjölkproducenter gav kalven ett första råmjölksmål om 2-3 L inom 4 timmar från födseln (Liberg & Carlsson, 1998; Petterson *et al.*, 2001). Närmare två tredjedelar av svenska besättningar rapporteras ge råmjölken i hink eller nappflaska medan omkring en tredjedel lät kalven dia själv från modern (Svensson *et al.*, 2003). Det går inte att uttala sig om hur detta har förändrats fram till idag då senare studier inom området saknas.

Den mjölkdrickande kalven

I saliven finns redan från födseln pregastriskt lipas, ett enzym som påbörjar nedbrytningen av mjölkfettet redan i löpmagen (Guilloteau *et al.*, 2009b). När kalven suger stimuleras en reflex som får den så kallade esofageala rännan att slutas och leda mjölken förbi förmagarna rakt ner i löpmagen. Enzymet renin denaturerar proteinet kasein som förekommer i stora mängder i mjölk. Renin finns i löpmagen från födseln men aktiviteten är då något lägre på grund av det höga pH:t jämfört med senare (Moran, 2002; Baintner, 2007). Reninaktiviteten leder till att det bildas ett mjölkkoagel i löpmagen, i vilket även mjölkfettet och det pregastriska lipaset inkorporeras (Guilloteau *et al.*, 2009b). Protein nedbrytaren pepsin utsöndras och aktiveras i allt högre grad efter det första levnadsdygnet, i samband med att HCl-produktionen kommer igång och surgör miljön i löpmagen till ca pH 3. Vasslen fortsätter okoagulerad vidare till duodenum medan koaglet sakta bryts ner och portioneras ut under flera timmar efter ett mjölksmål, vilket ökar näringsupptaget ur mjölken. I duodenum höjs pH och pankreatiska enzymer tillsätts, denna produktion är också låg under det första levnadsdygnet men ökar därefter markant (Baintner, 2007; Guilloteau *et al.*, 2009b). Under de första två veckorna, innan kalven börjar idissla och förmagarna sakta utvecklas, är aktiviteten av laktas mycket hög i duodenum och proximala jejunum eftersom laktos är den primära energikällan (Guilloteau *et al.*, 2009b).

Viktiga faktorer som kan påverka matsmältningen negativt är mjölkens temperatur vid utfodring (optimalt 40 °C), stress i samband med utfodringen (t ex kalvar i gruppbox som konkurrerar med varandra eller utfodring på oregelbundna tider) och felaktig drickställning (Arnold-Larsen, 2011). Mjölk som passerar okoagulerad ut i tunntarmen kan medföra lös avföring och sämre näringsupptag, vilket i sin tur kan göra kalven känsligare för smitta.

Mjölktutfodringssystem

Manuell utfodring av mjölk i hink eller napphink är det dominerande systemet för mjölktutfodring av kalvar i svenska mjölkbesättningar. Bland 877 svenska mjölkbesättningar utfodrade år 1998 majoriteten av besättningarna sina kalvar manuellt två gånger per dag (Petterson *et al.*, 2001). Hur vanligt automatiska utfodringssystem är idag går inte att säga, men användningen har sannolikt ökat med tanke på att antalet större mjölkbesättningar har ökat och i dessa besättningar blir automatiska utfodringssystem mer lönsamma. Med ett automatiskt mjölktutfodringssystem är det också möjligt att låta kalvarna få flera mindre mål mjölk per dag, antingen individanpassat via transponder eller i fri

tillgång. Då kan mjölkutfodringen anpassas till för kalven mer naturliga förhållanden och dygnsvolymen kan ökas. Automatiska utfodringssystem ställer ökade krav på övervakning av kalvarna eftersom man inte naturligt ser till dem var 12:e timme som när man utfodrar manuellt, samt att rengöring av automaten bör ske ofta om den inte har automatisk diskning.

Transponderstyrd utfodring är en dyr investering men har i övrigt mest fördelar genom att vara bekvämt och ge bra kontroll över kalvutfodringen. Vid fri tillgång är det svårare att ha koll på hur mycket varje kalv dricker, både för litet och för stort mjölkintag kan skapa problem. Själva systemet är betydligt billigare än det transponderstyrda, men mjölkostnaderna kan bli större eftersom kalvarna dricker mer när de har fri tillgång (Hammon *et al.*, 2002). Mjölken kan dessutom inte hållas vid 40°C hela tiden utan är rumstempererad, vilket utgör ett problem för de kalvar som inte följer mönstret att dricka små volymer ofta. Vid intag av en större mängd mjölk på en gång klarar kalven inte av att värma upp mjölken och koagulering och pH-reglering påverkas negativt (Arnold-Larsen, 2011).

Fördelningen mellan utfodring med helmjölk och mjölkersättning var år 1998 jämn bland svenska besättningar, ungefär hälften av varje med undantag för en mindre andel besättningar som kombinerade de två alternativen (Pettersson *et al.*, 2001). Det finns inga exakta data över hur fördelningen ser ut i Sverige idag, men av en studie kan slutsatsen dras att över hälften av svenska besättningar utfodrar kalvarna med helmjölk (Duse *et al.*, 2013). Det finns i huvudsak tre källor till helmjölk som en mjölkproducent har att välja bland. Ett alternativ är tankmjölk, dvs. mjölk som får levereras till mejeri. Denna mjölk får såklart även användas till utfodring av kalvarna, men innebär en stor kostnad för mjölkproducenten. Ett annat alternativ är att låta kalven gå hela diperioden med modern eller använda sig av amkor i kalvuppfödningen. Detta är också kostsamt då kor som ger di levererar betydligt mindre mjölk till mejeriet under digivningsperioden samt att det kan vara logistiskt svårt i dagens relativt stora lösdriftbesättningar. Det tredje och mest ekonomiska helmjölksalternativet är att utfodra kalvarna med mjölk som inte får levereras till mejeri. Denna mjölk kallas överskottsmjölk och får användas till utfodring av kalvar, men har nackdelen att den kan innehålla både patogena mikroorganismer och läkemedelsrester.

Överskottsmjölk

Överskottsmjölk består av mjölk med avvikande egenskaper som inte får levereras till mejeri. Det är i huvudsak mjölk från kor som behandlas med ett karensbelagt läkemedel, eller under karenstiden efter en sådan behandling. Mjölkproducenten kan även sortera bort mjölk från tanken för att den har mycket höga celltal, innehåller mycket flockor eller har en förändrad färg. Sådan mjölk kan ge ekonomiska avdrag från mejeriet på grund av att kvaliteten på mjölken sänks. Dock finns inga krav på att sådan mjölk måste sorteras bort, och för de flesta svenska mjölkproducenter är det mer ekonomiskt att låta sådan mjölk gå till mejeri trots att det ger avdrag. Detta beror på att mjölkkvantiteten spelar en större roll för ekonomin än mjölk kvaliteten (Nielsen, 2009).

I Storbritannien genomfördes år 2010-2011 en enkätstudie bland 557 mjölkproducenter där 83 % avgav att de utfodrade kalvarna med överskottsmjölk, och av dessa var det 87 % som utfodrade med överskottsmjölk från kor med mastit (Brunton *et al.*, 2012). I en svensk studie genomförd 2011 svarade 457 av 1567 svenska mjölkproducenter på en webbaserad enkät om kalvutfodring (Duse *et al.*, 2013). Studien var framför allt inriktad på antimikrobiella rester i mjölk till kalvar och definierade därför överskottsmjölk som mjölk från kor under antimikrobiell läkemedelsbehandling, vilket är en aning snävare definition än den angiven i början av detta avsnitt. Majoriteten av besättningarna som ingick i studien var konventionellt drivna besättningar, en femtedel var KRAV-anslutna besättningar. Femtiosex procent svarade att de utfodrade kalvarna med mjölk från kor under antimikrobiell läkemedelsbehandling. Närmare 80 % av besättningarna utfodrade kalvarna med mjölk från kor med karens efter antimikrobiell läkemedelsbehandling. Karenstiden är perioden från avslutad

läkemedelsbehandling till dess att mjölken åter får levereras till mejeri. Den varierar mellan olika läkemedel och sätts av Läkemedelsverket och European Medicines Agency (Läkemedelsverket; European Medicines Agency).

För en mjölkproducent ansluten till KRAV gäller att karensbelagd mjölk endast får utfodras till kalvar under den förlängda karensperiod som dessa besättningar måste följa (KRAV, 2014a). Regeln innebär att karenstiden blir dubbelt så lång. Ett exempel på detta är att om man behandlar en ko med penicillin i 5 dagar som sedan har en ordinarie karens på 6 dagar så har KRAV-producenten en karens på 12 dagar efter behandlingen och endast under de sista 6 dagarna får mjölken användas som överskottsmjölk till KRAV-kalvarna. Av studien som Duse *et al.* (2013) genomförde framgår dock att inte alla KRAV-producenter följer denna regel. En fjärdedel av KRAV-producenterna som ingick i studien uppgav att de utfodrade kalvarna med mjölk från kor under pågående behandling med antimikrobiella läkemedel.

Utfodring av kalvar med överskottsmjölk är omdiskuterat, både med avseende på dess innehåll av antimikrobiella rests substanser och med avseende på de höga bakterietal som kan uppstå när den huvudsakliga behandlingsorsaken är mastit (Selim & Cullor, 1997). I en studie som jämförde kalvar utfodrade med överskottsmjölk respektive pastöriserad överskottsmjölk rapporteras att kalvar som utfodrades med pastöriserad överskottsmjölk hade bättre viktuppgång och bättre hälsa i form av att kalvar som fick diarré drabbades senare, fick lindrigare symtom och tillfrisknade snabbare än kalvar som utfodrades med opastöriserad överskottsmjölk (Jamaluddin *et al.*, 1996b). Det finns också rapporter om en ekonomisk fördel i att föda upp kalvar på pastöriserad överskottsmjölk (Jamaluddin *et al.*, 1996a; Godden *et al.*, 2005). I en annan studie sökte man statistiska samband mellan olika skötsel faktorer och hög kalvmortalitet. Studien innehöll data från ett stort antal mjölkgårdar i USA och resulterade i signifikanta statistiska samband mellan utfodring av kalvar med mastit- och antibiotikamjölk och hög kalvmortalitet under mjölkperioden, samt mellan utfodring av tankmjölk (dvs. ”frisk” helmjölk) till kalvarna och låg mortalitet under mjölkperioden (Losinger & Heinrichs, 1997).

Det finns dock också studier där man inte funnit något samband mellan pastörisering och hälso- eller viktuppgångsfördelar hos kalvar (Kaske *et al.*, 2009; Aust *et al.*, 2013). I stället drog författarna slutsatsen att väl utarbetade råmjölksrutiner och individuell inhysning under mjölkperioden reducerar risken för diarré hos neonatala kalvar, och att denna inte påverkas av utfodring med överskottsmjölk. Det bör dock påpekas att även Jamaluddin *et al.* (1996b) och Godden *et al.* (2005) genomförde studier där kalvarna inhystes individuellt samt att man tillämpade generellt accepterade råmjölksrutiner på de kalvar som deltog i studierna.

Diarré hos unga kalvar

Diarré hör till de vanligaste hälsoproblemen hos kalvar i mjölkbesättningar. Det är den vanligaste sjukdomen hos kalvar som är yngre än 90 dagar i Sverige (Svensson *et al.*, 2006). Bland kalvar som är yngre än 31 dagar utgör diarré även den största dödsorsaken. I Sverige är den totala mortaliteten bland kalvar relativt låg, omkring 3 % (Olsson *et al.*, 1993; Svensson *et al.*, 2006). Internationellt ligger ofta kalvmortaliteten på omkring det dubbla och även utomlands utgör diarré den största dödsorsaken hos unga kalvar (USDA, 2007; Vaarst & Sorensen, 2009; Raboisson *et al.*, 2013).

Diarré är en komplicerad och multifaktoriell sjukdom. Orsakerna till diarré kan vara många, och man brukar dela in dem i infektiösa och icke-infektiösa orsaker. Bland icke-infektiösa orsaker utgör felaktigheter i utfodringen en stor faktor, t ex överutfodring av mjölk, dåligt blandad mjölkersättning, dåligt diskade hinkar och dålig foderhygien. Även den så kallade avvänjningsdiarrén är icke-infektiös och beror på stress då kalven byter miljö vid avvänjning samt att den inte äter tillräckligt med foder.

Infektiös diarré orsakas av mikroorganismer där rotavirus och kryptosporidier är de två vanligaste i Sverige idag (Torsein *et al.*, 2011; Hertel *et al.*, 2013). Även coronavirus och patogen *Escherichia coli* (*E. coli* F5+) förekommer men i betydligt lägre utsträckning. Däremot är *Salmonella*, som är relativt vanlig utomlands (Blanchard, 2012), mycket sällsynt i Sverige tack vare strikta kontrollprogram och att denna smitta lyder under den svenska zoonoslagen.

Vid diarré är avföringen lösare än normalt och ofta har avföringen även en förändrad lukt och färg. Vid allvarligare fall kan kalven få feber, bli dehydrerad och på grund av detta även få ett nedsatt allmäntillstånd. Mild diarré är vanligast, de utgjorde två tredjedelar av diarréfallen i en svensk studie på 3081 kalvar varav 317 drabbades av diarré inom 1-90 dagars ålder (Svensson *et al.*, 2003). Hur kraftiga symtom som uppvisas av ett infekterat djur beror på flera faktorer, bland annat vilket infektionsagens som orsakar diarrén, dess virulens, infektionsdosen, eventuell saminfektion med andra agens, om kalven fått ett bra antikroppsskydd från råmjölken, kalvens ålder vid smittotillfället, omgivningens temperatur, eventuella foderbyten och hur stort smittrycket är i kalvens omgivning (Wells *et al.*, 1996; de Verdier, 2006; Kehoe *et al.*, 2007; Drackley, 2008). Faktorer som i svenska studier har associerats med en ökad risk för diarré hos 1-90 dagar gamla kalvar är om kalvarna är av rasen SRB, om de får råmjölk från en förstakalvare, om råmjölken intas genom att kalven själv får dia kon istället för att ges manuellt, samt om kalvarnas boxar är placerade längs en yttervägg (Svensson *et al.*, 2003; Lundborg *et al.*, 2005).

Vid behandling av diarré är det viktigast att man tillför elektrolyter eftersom kalven förlorar mycket vätska och elektrolyter och snabbt drabbas av uttorkning (Phillips, 1985; McGuirk, 1998). Mjölkgivan bör inte tas bort eller reduceras, däremot kan det vara fördelaktigt att dela upp dygns-givan på flera små måltider så att dels kalven förmår dricka hela mängden, dels tarmen klarar att hantera mjölk-mängderna och få ut så mycket näring som möjligt. För kalvar som blir allmänpåverkade, t ex får feber, är det också viktigt att sätta in antiinflammatoriska preparat (NSAID) för att kalven ska må bättre och orka få i sig näring. Men då är det än viktigare att man också har vätskebalansen under kontroll eftersom risk för njurskador föreligger vid behandling med NSAID av dehydrerade djur. Då majoriteten av alla diarréfall orsakas av rotavirus och kryptosporidier är rutinmässig behandling av diarré med antibiotika inte korrekt. Endast i fall där man konstaterat bakterieinfektion, eller där risken för sepsis och sekundärinfektion anses stor, är antibiotikabehandling indicerat (Stengärde, 2011).

De studier som gjorts hittills under svenska förhållanden visar att både djurägare och veterinärer fortfarande har en del att lära när det gäller behandling av diarré hos kalv. Elektrolyter och NSAID sätts in alltför sällan, mjölkgiva reduceras eller tas bort helt alltför ofta och användningen av antibiotika är större än vad som kan anses vara indicerat (Svensson *et al.*, 2003; Torsein *et al.*, 2011; Hertel *et al.*, 2013). Av kalvar med diarré där någon form av behandling satts in var en veterinär inblandad (via besök eller telefonkontakt) endast i 17 % av fallen, i resterande fall beslutade djurägaren själv om behandling (Svensson *et al.*, 2003).

***Staphylococcus aureus* i mjölk till kalvar**

S. aureus är den vanligaste mastitorsakande patogenen i svenska mjölkbesättningar (Ericsson Unnerstad *et al.*, 2009). Då majoriteten av svenska besättningar utfodrar kalvarna med överskottsmjölk är det en rimlig slutsats att ett stort antal svenska kalvar utfodras med mjölk som innehåller *S. aureus* under delar av eller hela mjölkperioden. Eftersom *S. aureus* i huvudsak är en smittsam juverpatogen har det sedan flera årtionden tillbaka funnits intresse för att ta reda på om risken för *S. aureus*-mastit vid inkalvning ökar om kvigan som kalv utfodrats med mjölk innehållande *S. aureus*. Redan i början på 1980-talet utfördes försök för att utforska detta område. Dels undersökte man om *S. aureus* kunde infektera olika vävnader i kroppen på unga kalvar som en följd av oralt intag, dels följde man upp ett antal kvigkalvar fram till inkalvning för att bedöma risken för att utveckla *S.*

aureus-mastit (Barto *et al.*, 1982). Ingen av dessa två hypoteser kunde styrkas utifrån resultaten i den nämnda studien, men fortsatta försök har genomförts som antyder att *S. aureus* i mjölk kan vara en potentiell källa till *S. aureus* i råmjölk vid inkalvning (Roberson *et al.*, 1998). Detta motsägs dock av resultat från en tidigare studie av samma forskargrupp som visade att ingen kvigkalv var persistent koloniserad med *S. aureus* från födsel till första kalvning (Roberson *et al.*, 1994). Capurro *et al.*, (2010b) rapporterar lägre andel individer med kroppsprover positiva för *S. aureus* hos kvigor 4-12 månader gamla än hos kvigkalvar 0-3 månader gamla (8 % vs. 29 %). Resultaten från de nämnda studierna utesluter inte att mjölk innehållande *S. aureus* kan vara en risk vid utfodring av kvigkalvar, men visar inte heller på något tydligt samband.

Ett par studier rapporterar att köttraskalvars vikt vid avvänjning var signifikant lägre om de diar en moder med *S. aureus*-mastit (Watts *et al.*, 1986; Newman *et al.*, 1991). I en ny svensk studie i 10 köttrasbesättningar fann man dock inget sådant samband (Persson Waller *et al.*, 2014). *S. aureus* potential att påverka mag-tarmkanalen och utgöra en del av diarréetiologin hos unga kalvar är idag ett ännu outforskat område.

Staphylococcus aureus

S. aureus är en fakultativt anaerob, gram-positiv kockoid bakterie som är katalas- och koagulaspositiv. Bakterien lever på slemhinnor och på hud och hår hos varmblodiga djur. Den kan växa i temperaturer från +7 till 48,5 °C, med ett optimum runt 30-37 °C, och klarar även att växa i pH 4,2–9,3 med optimum runt 7,0–7,5 (Le Loir *et al.*, 2003).

S. aureus är, till skillnad från de flesta andra *Staphylococcus spp.*, mycket spridd och förekommer hos de flesta marina och landlevande däggdjuren (Baird-Parker, 1990). Gemensamt för alla *Staphylococcus spp.* är att de är väl anpassade till ett liv på ytan av varmblodiga djur och att de hjälper huden att stå emot kolonisation av patogena mikroorganismer. Det går att särskilja många *S. aureus* med olika ursprung genom subtypning då de ofta utvecklats något olika egenskaper beroende på huvudsakligt värdjur och vart på djuret de lever. Bland annat förekommer skillnader i enzymproduktion, resistensmönster och immunologisk aktivitet. Sjukdomsorsakande stammar av *S. aureus* kan orsaka flera olika typer av sjukdomar (Baird-Parker, 1990). Dessa kan delas in i två huvudgrupper; akuta infektioner (lokala eller systemiska), samt akuta toxemier (t ex toxic shock syndrome (TSS) och matförgiftning).

Uppkomsten av en *S. aureus*-infektion och sjukdomens framskridande styrs både av värdjurets försvarsmekanismer (resistensen hos värdjuret) och av organismens förmåga att överkomma dessa (virulensfaktorer). *S. aureus* producerar en mängd olika virulensfaktorer och dess förmåga att orsaka infektion är multifaktoriellt medierad (Baird-Parker, 1990). Uppkomsten av toxemi orsakas av specifika proteintoxiner producerade av *S. aureus*. Till dessa hör bland annat superantigenerna enterotoxiner och toxic shock syndrome toxin-1 som presenteras vidare i avsnittet ”Enterotoxiner och toxic shock syndrome toxin-1”.

Då man har sett att det finns genetiska skillnader mellan *S. aureus*-stammar av olika ursprung har man i flera studier jämfört stammar som uppehåller sig på människor respektive nötkreatur. I en studie försökte man, utan att lyckas, att identifiera en gen eller ett kluster av gener som finns hos alla bovina *S. aureus* men som saknas hos de humana stammarna (Kozytska *et al.*, 2010). Via genkaraktärisering av och jämförelse mellan ett stort antal *S. aureus*-stammar från humant och bovint ursprung har man dock funnit vissa skillnader som är framträdande men som inte kan användas för att skilja humana och bovina stammar med säkerhet (Zschöck *et al.*, 2005; Monecke *et al.*, 2007). Gemensamt är att det är vanligt med gener som kodar för superantigener hos både humana och bovina *S. aureus*-stammar (Johler *et al.*, 2011).

Mastitpatogen

S. aureus är en vanlig orsak till mastit som är en av de mest kostsamma sjukdomarna för mjölkindustrin världen över (Kossaibati & Esslemont, 1997; Elbers *et al.*, 1998; Waage *et al.*, 1999; Giannechini *et al.*, 2002; Olde Riekerink *et al.*, 2008). I Sverige behandlas varje år 1/5 av alla mjölkkor för mastit under laktation och minst 21 % respektive 19 % av akuta kliniska mastiter respektive subkliniska mastiter orsakas av *S. aureus* (Valde *et al.*, 2004; Ericsson Unnerstad *et al.*, 2009). *S. aureus* har således en stor betydelse för djurvälståndet hos mjölkkor och för antibiotikaanvändningen inom produktionsdjurssektorn.

En virulensfaktor som vissa *S. aureus* har är produktion av β -laktamas, ett enzym som inaktiverar β -laktamantibiotika, bland annat penicillin som i Sverige använts som systemisk behandling vid 80 % av alla akuta kliniska mastiter hos mjölkkor de senaste decennierna. I Sverige är trots detta prevalensen av β -laktamasproducerande *S. aureus* isolerade från akuta kliniska mastiter fortsatt låg, runt 7 % (Bengtsson *et al.*, 2009). Förekomsten av resistens är även betydligt lägre bland bovina stammar av *S. aureus* i jämförelse med humana.

Kliniska och subkliniska mastiter

S. aureus infekterar juvret via spenkanalen. Bakterierna producerar toxiner som förstör cellmembran vilket inducerar en inflammation och leukocyter attraheras till området. När vävnaden i spenkanalen och spencisternen skadas bildas ärrvävnad. *S. aureus* fortsätter sin väg uppåt i juvret via mjölkgångarna och tar sig ända ut i de mjölkproducerande alveolerna, där en djuprotad infektion etableras. Här kan *S. aureus* bilda abscesser som både skyddar bakterierna från upptäckt av immunförsvarsceller och från effekterna av antibiotika. De kan också gömma sig intracellulärt i leukocyter och juverepitelceller (Petersson-Wolfe *et al.*, 2010).

Skadorna i mjölkalveolerna och mjölkgångarna leder till reducerad mjölkproduktion och bildande av ärrvävnad. Klinisk presentation av en mastit orsakad av *S. aureus* innebär vanligtvis måttlig svullnad av den affekterade juverdelen och flockor i mjölken, men majoriteten av juverinfektionerna orsakade av *S. aureus* är dock subkliniska och kroniska. Dessa kor visar inga kliniska symtom på mastit, däremot är det vanligt med höga celltal (Somatic Cell Count, SCC) i mjölken från affekterade juverdelar. Förmågan hos *S. aureus* att orsaka kroniska och subkliniska infektioner kan till stor del tillskrivas den abscessbildande egenskapen som tillåter bakterien att gömma sig undan immunförsvarsceller och antibiotikabehandling (Petersson-Wolfe *et al.*, 2010).

En konsekvens av att behandlingsframgången är låg är att *S. aureus*-mastit utgör en av de vanligaste utslagningsorsakerna hos mjölkkor (Barkema *et al.*, 2006). De kroniska infektionerna har även visat sig vara mycket persistenta. Försök med att tillsätta en annan bakteriestam som aktiverar immunförsvaret ytterligare för att på så sätt förmå juvret att rena sig själv från infektion har inte lyckats (Young *et al.*, 2001). Mottagligheten för infektion hos mjölkkor i en besättning varierar både med virulensfaktorer hos *S. aureus* och med faktorer hos korna så som immunförsvaret och den individuella förmågan att rena sig från en infektion. Dessa egenskaper hos bakterier och kor verkar variera mellan olika besättningar (Bannerman *et al.*, 2008; Sandgren *et al.*, 2008).

Många frågor står än idag obesvarade avseende epidemiologin kring *S. aureus*-mastiter. I vissa besättningar sprider sig infektionen snabbt mellan kor, medan den i andra gör det väldigt långsamt. Skillnader i smittsamhet och persistens har konstaterats i flera studier (Sommerhauser *et al.*, 2003; Haveri *et al.*, 2007; Fournier *et al.*, 2008), men återstår att undersöka bland de svenska *S. aureus*-stammarna (Capurro *et al.*, 2010a).

Fram till idag har man identifierat infekterade juver, spenkanaler och spenhud samt sår på spenarna som huvudsakliga reservoarer för *S. aureus*. Flera studier har på senare år också sökt smittkällor för *S. aureus* utanför juvret (Saperstein *et al.*, 1988; Zadoks *et al.*, 2002; Capurro *et al.*, 2010b). I en ny svensk studie fann man att hashud och de hos vissa mjölkbesättningar vanligt förekommande hassåren kan vara en viktig reservoar för mastitorsakande stammar av *S. aureus* (Capurro *et al.*, 2010b). Samma studie visade även att förekomst av dessa *S. aureus*-stammar hos unga kalvar inte innebar att kalven bar med sig bakterien efter mjölkperioden. Förekomsten av den mastitorsakande *S. aureus*-stammen utanför juvret varierade mycket mellan de ingående besättningarna i studien, vilket tolkades kunna vara en följd av skillnader i virulensfaktorer hos de olika besättningarnas *S. aureus*, eller orsakas av skillnader i rutiner på gårdarna (Capurro *et al.*, 2010b).

De rekommenderade kontrollåtgärderna för *S. aureus* innefattar förbättrad mjölkningshygien, kontroll över mjölkningsrutiner såsom mjölkningsordning och spendoppning, samt sintidsbehandling och utslagning av infekterade kor (Petersson-Wolfe *et al.*, 2010). Åtgärderna är dock inte alltid så effektiva i att förebygga nya infektioner som man förväntat (Sommerhauser *et al.*, 2003). Detta indikerar komplexiteten i *S. aureus*-problematiken och möjligheten att andra smittkällor än de som hittills identifierats förekommer. För att utreda detta område inom *S. aureus*-epidemiologin krävs identifiering av *S. aureus* på stamnivå. Det kan förekomma flera stammar i samma besättning, men oftast är det bara en av dem som är avgörande för mastitproblematiken (Capurro *et al.*, 2010b).

I Sverige är mångfalden bland *S. aureus* stammar från akuta kliniska mastiter hos mjölkkor stor, men ett fåtal pulsotyper (isolat med exakt likadana bandmönster vid pulsfält gelelektrofores kallas pulsotyper) dominerar vilket indikerar att det förekommer en spridning mellan besättningar (Capurro *et al.*, 2010b). I en nyligen genomförd svensk studie stamtypades 185 *S. aureus*-isolat och man fann då att två dominerande pulsotyper stod för 64 % av kliniska *S. aureus*-mastiter (Lundberg *et al.*, 2014). I denna studie undersöktes associationerna mellan pulsotyp och behandlingsframgång vid akuta kliniska *S. aureus*-mastiter hos svenska mjölkkor. De dominerande pulsotyperna visade bättre behandlingsresultat vid 120 dagars uppföljning av celltal, utslagningsfrekvens, återfall av mastit och producerad mjölmängd än de mindre vanliga pulsotyperna. Behandlingsframgången varierade också med faktorer hos kon så som laktationsstadium och kronicitet av infektionen vid insatt behandling, samt med bakteriefaktorer så som β -laktamasproduktion. Resultaten indikerar att den bakteriella genotypen påverkar den långsiktiga utgången för en klinisk mastit orsakad av *S. aureus*.

Humanpatogen

S. aureus är en viktig humanpatogen på grund av sin kombination av toxin-medierad virulens, invasiva natur och potentiella antimikrobiella resistens. Bakterien orsakar ett brett spektra av sjukdomar, lokala så som hudinfektioner, och systemiska så som toxic shock syndrom och sepsis. Till detta kommer förmågan att via en typ av virulensfaktor, enterotoxinerna, orsaka matförgiftning (Le Loir *et al.*, 2003).

Matförgiftning hos människa

Att stafylokokker orsakar matförgiftning misstänkte man redan på 1880-talet. Men det var inte förrän 30 år senare som man kunde demonstrera att stafylokokker kunde orsaka förgiftning som ett resultat av intag av mjölk från en ko med stafylokokkermastit. Ytterligare ett par årtionden senare lyckades man visa att det var ett toxin, kallat enterotoxin, som var orsaken till förgiftningen. Sedan dess har man visat att *S. aureus* är en vanlig och utbredd organism i matförgiftningssammanhang och att flera olika enterotoxiner förekommer (Baird-Parker, 1990).

Den huvudsakliga källan till *S. aureus*-orsakad matförgiftning är att mänsklig kontakt via händer eller hosta och nysningar kontaminerar matprodukter efter värmebehandling. Därför varierar toxinkällan

mycket mellan olika länder och utbrott, och kan vara allt från köttprodukter och köträtter (från olika köttkällor) till mjölkprodukter, skaldjur, ägg och även sallad. Oftast är det alltså en human stam av *S. aureus* som ligger till grund för matförgiftningarna, men i mat så som rått kött och korv, opastöriserad mjölk och ost gjord på opastöriserad mjölk förekommer även kontamination av *S. aureus* från djur som är bärare av eller har en infektion orsakad av *S. aureus*, såsom mastit (Le Loir *et al.*, 2003).

För att bli matförgiftad av *S. aureus* krävs intag av preformerat enterotoxin. Det finns flera sådana enterotoxiner varav den som kallas SEA (Stafylokock Enterotoxin A) är den vanligaste i fall av matförgiftning hos människa världen över (Argudín *et al.*, 2010). Symtomen vid en *S. aureus*-orsakad matförgiftning är abdominala kramper, illamående, kräkningar, ibland följt av diarré. Symtomen uppstår snart inpå intag, 30 minuter till 8 timmar, och avtar spontant efter omkring 24 timmar (Le Loir *et al.*, 2003).

Enterotoxiner producerade av en bovin stam av *S. aureus* har många gånger visats orsaka matförgiftning. Bland annat vid ett utbrott av matförgiftning i Norge år 2003 där potatismos tillagat med mjölk från en viss leverantör visade sig vara källan till toxinet SEH (Jorgensen *et al.*, 2005).

Enterotoxiner och toxic shock syndrome toxin-1

Enterotoxiner (Stafylokock Enterotoxiner, SE) och toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) är superantigena proteiner som *S. aureus* i huvudsak producerar under sin exponentiella tillväxtfas. För att produktionen ska vara maximal krävs en temperatur runt 37°C och ett neutralt pH. Enterotoxinerna är oerhört tåliga mot värme, låga pH och proteolytiska enzymer, vilket gör att de klarar uppvärmning av livsmedel samt passagen genom magsäcken, vilket inte *S. aureus* överlever (Argudín *et al.*, 2010).

Enterotoxinerna har namngetts i bokstavsordning från A och framåt. Bokstaven läggs till prefixet SE- som står för Stafylokock Enterotoxin. De första enterotoxinerna som man upptäckte var SEA-SEE och de kallas idag för ”klassiska” enterotoxiner då man på senare år har upptäckt fler och kallat dessa för ”nya” enterotoxiner. De klassiska enterotoxinerna samt en del av de nya har en konstaterat emetisk (kräkframkallande) effekt (Argudín *et al.*, 2010). Övriga har man inte kunnat konstatera en emetisk effekt hos eller så har man inte undersökt det än. Dessa benämns SEls (stafylokockenterotoxin-liknande) då de strukturellt är mycket lika de SE som har bevisad emetisk effekt (Argudín *et al.*, 2010).

Alla SEs, SEls samt TSST-1 är så kallade superantigener (SAGs), vilket innebär att toxinerna undviker igenkänning av kroppens immunförsvar. Genom en direkt interaktion mellan SAGs, T-cellreceptorer (TCR) och major histocompatibility complex (MHC) på antigenpresenterande celler åstadkoms en korslänkning mellan TCR och MHC. Denna leder till en ospecifik aktivering och proliferering av T-celler till skillnad från T-cellernas normalt mycket antigen-specifika aktivering. En massiv frisättning av kemokiner och proinflammatoriska cytokiner åtföljer och om det sker på systemisk nivå kan det leda till toxic shock syndrome som är ett livshotande tillstånd (Le Loir *et al.*, 2003; Argudín *et al.*, 2010).

Allteftersom man upptäckt nya SEs och SEls och sett att de är vanligt förekommande har man börjat misstänka att de kan spela en större roll i patogenesen vid matförgiftning än man trodde från början. Det är fortfarande oklart idag vilka delar av toxinet som står för de emetiska respektive de superantigena egenskaperna, men man vet att det är två funktioner hos toxinet som är lokaliserade till två olika strukturer på proteinet. Samtidigt finns det en stark korrelation emellan dem då en mutation som avlägsnar den ena egenskapen automatiskt leder till bortfall av den andra (Le Loir *et al.*, 2003; Argudín *et al.*, 2010).

Verkningsmekanismerna bakom den emetiska effekten hos SEs är inte fullständigt kartlagda. Man har inte kunnat koppla ihop SEs med specifika celler eller receptorer i digestionskanalen, men en hypotes är att SEs stimulerar nervus vagus i abdominala viscera som sänder en signal till hjärnans kräkcentrum (Argudín *et al.*, 2010). Att receptorer på vagala afferenta neuron visats vara essentiella för SEA-utlöst emesis stödjer denna hypotes. SEs kan också penetrera tarmslemhinnan och aktivera det lokala såväl som det systemiska immunförsvaret. Frisättning av vissa inflammatoriska mediatorer så som histaminer, leukotriener och neuroenterisk peptid substans P orsakar kräkningar och är en hypotes för SEs emetiska aktivitet då denna kan elimineras via histamin-2- och calciumkanalblockerare. Lokal immunaktivering kan också svara för de gastrointestinala skador som associeras med SEs (Argudín *et al.*, 2010).

Flera studier visar att gener som kodar för SEs (benämns *se*) är vanligt förekommande bland *S. aureus* stammar från olika källor så som människor, nötkreatur och får. Man har även visat att *S. aureus* som har *se*-gener också kan producera enterotoxiner (Boerema *et al.*, 2006). Hos mjölkproducerande nötkreatur är det inte lika tydligt som vid fall av matförgiftning vilka enterotoxiner som är vanligast, men *sec* och *sei* är vanligt förekommande i flera studier (Johler *et al.*, 2011). Man har även hittat antikroppar mot TSST-1 i mjölk och serum, samt hos unga kalvar vilket indikerar att dessa förvärvat maternella antikroppar mot detta toxin (Hayakawa *et al.*, 2000). Studien rapporterar att antikroppskoncentrationen av TSST-1 var högre i mjölkprover med höga celltal, vilka kan indikera juver infekterade med *S. aureus*.

Enterocolit

Några studier har gjorts på andra djurslag än nöt där resultaten tyder på att *S. aureus* och dess SAgS kan ha en påverkan på tarmen inte bara hos människa. Hos möss och råttor har man genomfört försök med enterotoxinet SEB som visar en ökad permeabilitet i kolonepitelet samt en aktivering av inflammatoriska mediatorer och T-celler i Peyerska plaque och mesenteriala lymfknotor (Yang *et al.*, 2005; Perez-Bosque & Moreto, 2010). Kaniner har visat sig vara känsliga för TSST-1 samt enterotoxiner. De utvecklar kraftiga symtom så som feber, diarré, apati, hyperemi i slemhinnor och olika förändringar som indikerar toxiska skador av flera organ. Hos andra djurslag så som minigrisar, grisar och babianer ses liknande symtom men ofta av en mildare och mer lokal än systemisk karaktär (Kohrman *et al.*, 1989; Bulanda *et al.*, 1989).

På grund av enterotoxiners tydliga och mätbara effekter hos kaniner har detta djur ofta använts som försöksdjur vid forskning om enterotoxiner. En nyare studie hade som syfte att undersöka en mjölksyreproducerande bakteriestams potentiella skyddande effekt mot SEs. Kaniner som fick mjölk innehållande en enterotoxinproducerande stam av *S. aureus* drabbades av diarré 5 dagar efter intaget (Bendali *et al.*, 2011). Histologiskt kunde skador och atrofi av tunntarms- och kolonepitel observeras. I träck sjönk nivåerna av *S. aureus* med tiden, men diarrén upphörde inte trots administrering av steril mjölk. Hos kaninerna som behandlades med den mjölksyreproducerande bakterien (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*) upphörde diarrén och man såg en återhämtning av tunntarmsvilli och kolonkryptor vid histologisk undersökning.

Förutom att vissa djurarter och inte bara människa påverkas av enterotoxiner och andra superantigena toxiner producerade av olika stammar av *S. aureus* så har man även visat att *se*-gener är vanligt förekommande bland *S. aureus*-stammar isolerade från tarmfloran hos spädbarn (Hight & Goldwater, 2009). Hight & Goldwaters resultat tyder också på att *S. aureus* kan kolonisera tarmen på spädbarn, och det är en intressant hypotes att detsamma skulle kunna vara möjligt även hos mycket unga djurindivider.

Metoder för att påvisa och karaktärisera *Staphylococcus aureus*

Bakteriologi

I rutindiagnostiken av *S. aureus* i mjölkbesättningar består provmaterialet nästan uteslutande av mjölkprov, oftast från individuella kor men ibland även tankmjölksprover.

Standardprotokollet för isolering av *S. aureus* på mastitlaboratoriet på SVA (Statens Veterinärmedicinska Anstalt) innebär utstryk av 10 µl mjölk på nötblodagar och inkubering i 37 °C över natt. Därefter görs en primärvläsning och renodling om misstänkta kolonier förekommer. Om inget ses efter första inkuberingen får plattan stå i 37 °C ytterligare en natt varefter den återigen avläses. Först därefter kan man anse provet negativt. Sedan några år tillbaka har man lagt till ytterligare ett steg som innebär att mjölkproverna inkuberas tillsammans med primärplattorna första natten och sedan stryks 10 µl av varje prov ut på en nötblodagar och inkuberas med övriga plattor andra natten. Detta steg kallas anrikning och metoden har visat sig innebära att man hittar upp till 50 % fler *S. aureus* (Artursson *et al.*, 2010).

Vid identifiering av misstänkta kolonier efter någon av inkuberingarna renodlas de på en ny blodagarplatta om man inte redan har fina rena kolonier på primär- eller anrikningsplattan. Om kolonierna har typiskt utseende och uppvisar karaktäristisk dubbelhemolys anses provet som positivt och man testar stammen för β-laktamasproduktion som ger en uppskattning av hur känslig stammen är för penicillin. Vid förekomst av kolonier som man misstänker är *S. aureus* men som inte har ett helt karaktäristiskt utseende kör man en MALDI-TOF. Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)-time of flight (TOF) är en metod som bygger på masspektrometri (MS). MS har använts i årtionden inom kemien och man kom också tidigt på att olika bakterier producerade olika masspektra. Men det var först 1996 som MALDI-TOF utvecklades och möjliggjorde snabb analys av hela bakterieceller utan att någon tidskrävande preparering var nödvändig före MS-analysen. Idag har denna metod slagit sig in på marknaden som en snabb, pålitlig och känslig metod för mikrobiell karaktärisering och identifiering av bakterier, svamp och virus (De Carolis *et al.*, 2014).

Traditionellt har man utnyttjat fenotypiska egenskaper för identifiering av *S. aureus*, framför allt biokemiska tester så som katalas- och koagulasaktivitet. Trots att man hela tiden har förfinat dessa metoder förblir de tidskrävande, inte minst i laboratorier där man analyserar ett stort antal prover varje dag. Hos *S. aureus* finns en stor inneboende diversitet, samtidigt som arten kan te sig väldigt lik vissa andra *Staphylococcus spp.* Med MALDI-TOF kan man med mycket hög specificitet och sensitivitet korrekt identifiera *S. aureus* på kort tid, vilket gör metoden värdefull i det diagnostiska arbetet på större laboratorier (Rajakaruna *et al.*, 2009).

En egenskap hos *S. aureus* är att den tillväxthämmas i närvaro av konkurrerande bakteriearter (Le Loir *et al.*, 2003). Detta utgör sällan ett problem i rutindiagnostiken av mastiter eftersom mjölk vid mastit generellt har en dominans av den mastitorsakande bakterien. När man, som i detta arbete, försöker isolera *S. aureus* från träck, innehåller dock provmaterialet en övervägande andel andra bakterier (bland andra koliformer) som både är snabbväxande och många till antalet. Man kan då öka chansen att isolera *S. aureus* från sådana provmaterial genom att använda selektiva medium som dels främjar tillväxt av *S. aureus*, men också hämmar tillväxten av de oönskade bakteriearterna. I denna studie utnyttjades dessa egenskaper hos Vogel-Johnson medium samt hos Baird-Parker agar.

Vogel-Johnson medium

Vogel-Johnson agar (VJA) utvecklades 1960 som ett medium selektivt för *S. aureus* (Vogel & Johnson, 1960). VJA innehåller mannitol som kolkälla, vilken vid fermentering färgändrar den röda agarn till gult. Kaliumtellurit i agarn inhiberar organismer som inte är av *Staphylococcus spp.* och ger

karaktäristiskt svarta kolonier hos koagulas-positiva Stafylokocker (Kim & Oh, 2010). Att inkludera ett anrikningssteg för provmaterial från spenhud och mjölkutrustning i flytande Vogel-Johnson medium (37 °C i 4 h) har visats kunna dubbla chanserna att hitta *S. aureus* i svabblösningar från grovt kontaminerat material, så som när man tar svabbprov från mjölkutrustning eller hud (Fox *et al.*, 1992).

Baird-Parker agar

Baird-Parker agarn utvecklades i början av 1960-talet då man var ute efter ett odlingsmedium som kunde selektera fram *S. aureus* bättre än tidigare tillgängliga medium. Syftet var att med hög specificitet kunna odla fram *S. aureus* från olika matprodukter och därmed bidra till diagnostiken i utredningen av matförgiftningsutbrott. Man utgick från en neutral agarbas till vilken äggula, glycin, lithiumklorid, kaliumtellurit och natriumpyruvat tillsattes i olika koncentrationer. Baird-Parker plattorna ska inkuberas i 48 h eller mer då det tar denna tid för *S. aureus* att växa fram på agarn och få sitt karaktäristiska utseende (Baird-Parker, 1962).

De selektiva delarna i agarn är glycin, lithiumklorid och tellurit medan äggula och pyruvat hjälper skadade celler att återhämta sig. Reduktion av telluriten ger kolonierna en svart blank färg, men det är främst uppklämningen av äggulan via hydrolys av lipovitellenin som använts som ett diagnostiskt kriterium. Dock är vissa bovina *S. aureus* stammar negativa för detta test och i de fallen får man förlita sig till koloniutseende i större utsträckning (Baird-Parker, 1990).

Trots att Baird-Parker agarn var ett stort steg framåt jämfört med tidigare odlingsmedium var hämningen av andra organismer inte fullständig. Detta tillsammans med bristen hos ägguletestet på bovina *S. aureus* föranledde ett arbete för att ta fram en modifiering av den ursprungliga Baird-Parker agarn. Vissa av de ursprungliga koncentrationerna ändrades men inget reagens togs bort, däremot tillsattes acriflavin, polymyxin B och sulfonamid. Det ledde till att man enklare kunde känna igen *S. aureus*, inte minst för att man fick en betydligt mer effektiv hämning av gram-negativa bakterier och koagulasnegativa stafylokocker samt proteus då alla dessa är mer känsliga för och tillväxthämmas mer av de tre tillsatta substanserna än *S. aureus* (Devriese, 1981).

DNA microarray

DNA microarray är en metod för genkaraktärisering som kan användas inom många områden. Även om teknikerna för de olika områdena kan skilja sig till viss del så bygger de i grund och botten på samma metodik. Här beskrivs tekniken utifrån det arbetsschema som använts för genkaraktärisering av *S. aureus* i detta arbete. Produkten kommer från Alere Technologies, Jena, Tyskland (se www.alere-technologies.com) och heter CLONDIAG *S. aureus* Genotyping Kit 2.0 (Alere Technologies, 2014). Den detekterar flera artmarkörer och ett stort antal resistensgener samt patogenicitetsmarkörer hos *S. aureus* (totalt över 300 markörer). Principen för microarray-tekniken baseras på det faktum att komplementära DNA-sekvenser kan bindas till varandra genom hybridisering. I stort kan processen delas in i tre delar; 1) Tillverkning av microarrays, små chip som prepareras med sekvenserade gener, i detta fall de gener som finns identifierade hos *S. aureus*. Varje gen utgör en punkt på chipet och gensekvenserna blir helt immobiliserade när de preparerats på chipet. Färdigpreparerade chip följer med produkten. 2) Preparering av provmaterial från bakterieisolaten. Detta steg inkluderar isolering och rening av mRNA och DNA som amplifieras och märks med fluorescerande markörer innan de tillsätts till chipet (ett chip per bakterieisolat) och via hybridisering fäster in till sina komplementära DNA-sekvenser på chipet. 3) Förvärvande av bild genom scanning av chipet och analys av data via en dataprogramvara. Punkt 2 är det tidskrävande steget i processen och utgör det egentliga laborationsarbetet vid microarray-experiment. Beroende på hur mycket provmaterial man har kan även dataanalys bli en stor del av arbetet, men för detta finns som nämnt sofistikerade programvaror till hjälp.

Microarray-tekniken har visat sig vara en användbar metod för att bedöma virulenskaraktär hos *S. aureus*. I mjölkbesättningar kan förhållandet mellan virulenskaraktär och prevalens av bakterien i besättningen utredas och vissa specifika genmönster kan associeras till *S. aureus* mastit (Piccinini *et al.*, 2010).

Pulsfält gelelektrofores (PFGE)

PFGE är en DNA-baserad stamtypningsteknik som har högre typabilitet, reproducerbarhet och diskriminatorisk kraft än bakteriofagtypning (BT), som tidigare var referensmetod, s.k. gold standard, för typning av *S. aureus*. BT användes i över 30 år, men studier visade att tekniken hade låg reproducerbarhet, att den bara lyckades typa upp till en femtedel av isolaten samt att den inte hade förmågan att subtypa isolaten (Bannerman *et al.*, 1995; Zadoks *et al.*, 2002). Detta ledde till att man gick över till PFGE som gold standard, eftersom denna teknik visat sig korrekt kunna både typa och subtypa *S. aureus*. Sedan ungefär 15 år har också PFGE erkänts som en robust metod för att typa *S. aureus* från komjölk (Zadoks *et al.*, 2000).

PFGE bygger på att genomet i det undersökta materialet genomgår en restriktionsklyvning med ett enzym som man på förhand har utvärderat och skapat en referensbas gentemot. Klyvningen sker på specifika ställen i genomet och beroende på stam kommer olika stora DNA fragment att skapas. Dessa skiljer sig åt både avseende storlek och laddning, vilket utnyttjas när man sedan placerar fragmenten i en gel och lägger på en elektrisk ström som får fragmenten att röra på sig i en riktning. Hur långt de kommer beror både på laddningen och storleken. Vissa fragment är gemensamma för alla *S. aureus* stammar, medan andra varierar mellan olika stammar. På så sätt kan man som i detta arbete ta reda på om två stammar av *S. aureus* isolerade från olika provmaterial är av samma polsotyp, dvs. bildar ett identiskt bandmönster i PFGE-gelen (Lognonne, 1993).

MATERIAL OCH METODER

Studiedesign

Förstudie

Tre svenska mjölkproducerande nötbosättningar selekterades fram genom en urvalsprocess under hösten 2014. En sammanfattning av förloppet redovisas i Figur 1. Följande var de initiala inklusionskriterierna; gårdarna skulle 1) vara geografiskt lokaliserade i Uppsala län, Västra Götalands län eller i området däremellan, 2) ha minst 100 mjölkkor, 3) utfodra kalvarna med överskottsmjölk eller annan helmjölk, 4) ha problem med *S. aureus*-mastiter, samt 5) vara villiga att delta i studien.

Trettioen gårdar med minst 100 mjölkkor identifierades inom det angivna området utifrån en lista på 266 svenska mjölkbesättningar som ingick i en vid SVA och SLU tidigare genomförd studie (Duse et al., 2013). Till dessa 31 mjölkproducenter mailades en webbaserad enkät via programmet EasyResearch från QuestBack™ (www.questback.com/se/) med 7 frågor (se Bilaga 1) för att säkerställa att de initiala inklusionskriterierna uppfylldes. Tolv mjölkproducenter svarade på enkäten, varav 9 uppfyllde kriterierna för att gå vidare i urvalsprocessen. De övriga 3 angav antingen att de inte ville delta i studien eller att de inte utfodrade kalvarna med överskottsmjölk.

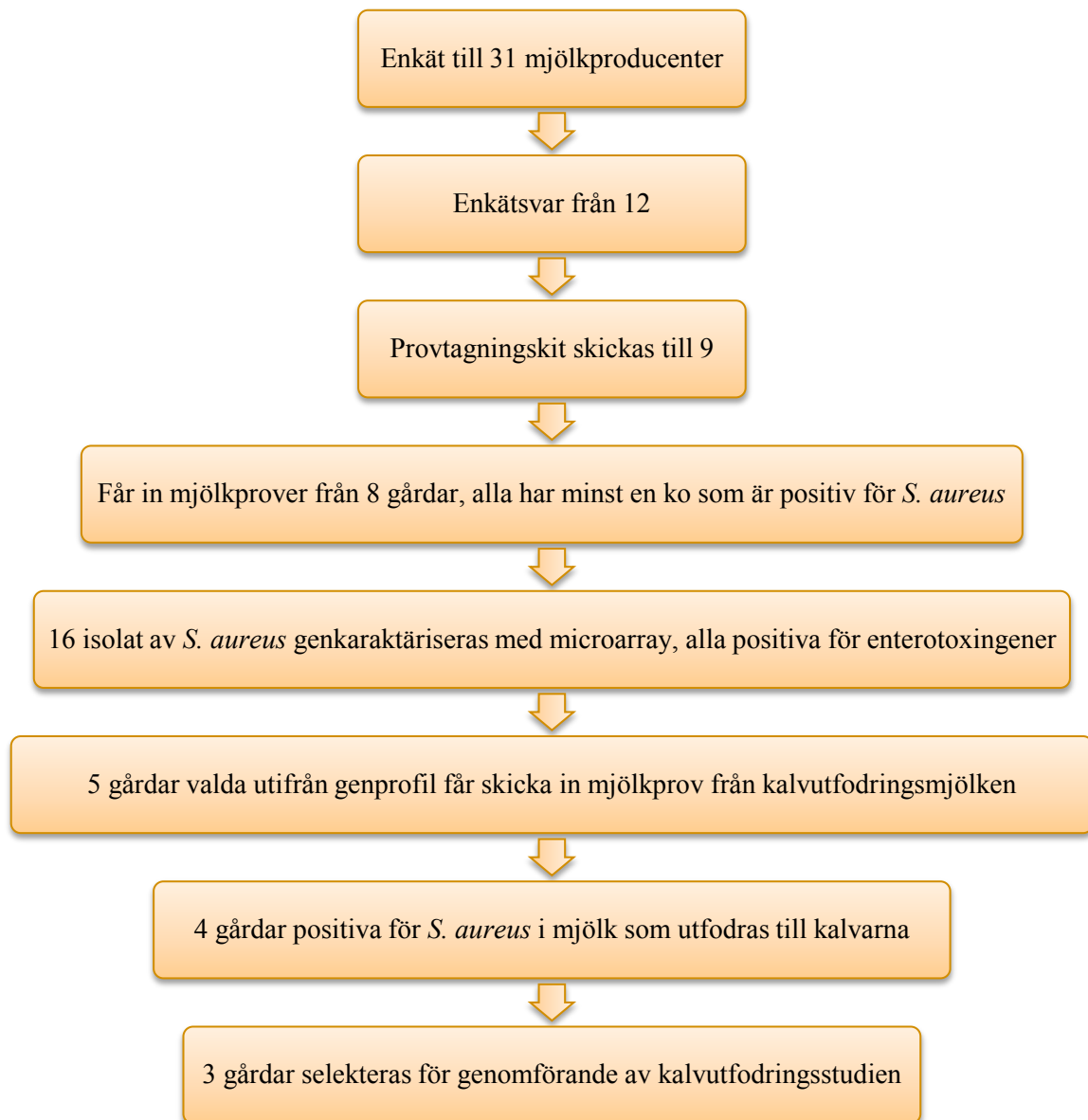
Ett provtagningskit postades till de 9 gårdarna med material för provtagning av kor som kunde misstänkas ha *S. aureus* i juvret utifrån fyra kriterier; att de hade 1) höga celltal, 2) diffusa tecken på juverinflammation (t.ex. en flocka då och då), 3) en obehandlad klinisk juverinflammation, eller 4) behandlats för *S. aureus*-mastit för minst en månad sedan och inte återgått till samma juverhälsa som före *S. aureus*-mastiten. Kriterierna tillsammans med provtagningsinstruktioner och en kort redogörelse för syftet med studien fanns i ett följebrev i utskicket (se Bilaga 2). Djurägarna tog själva enspensprov från 1-4 juverdelar på upp till 5 kor och skickade till mastitlaboratoriet vid SVA. Åtta av de 9 besättningar som fick provtagningskitet skickade in mjölkprover från koindivider.

Mjölkproverna analyserades med avseende på förekomst av *S. aureus* och om en och samma ko var positiv i flera juverdelar sparades endast ett av isolaten, alltså maximalt 5 isolat av *S. aureus* per besättning. Totalt inkom till SVA 108 mjölkprover tagna från 38 kor. Antalet provtagna kor var fem i alla besättningar utom en där tre provtogs. Antalet inkomna mjölkprover från varje besättning var 4-18 stycken (median 15).

Samtliga 19 erhållna isolat av *S. aureus* sparades i frys. Genkaraktärisering av isolaten för att påvisa förekomst av enterotoxingener samt genen för TSST-1 (Tabell 1) påbörjades. Delvis parallellt med genkaraktäriseringen genomfördes även telefonintervjuer med lantbrukarna med stöd av ett på förhand utformat frågeformulär (se Bilaga 3). De sex besättningar med de för studien mest gynnsamma genprofilerna (avseende förekomst av ovan nämnda gener) kontaktades per telefon och information samlades om utfodringsrutinerna av kalvarna och hur kalvutfodringsmjölken hanterades. I detta skede framkom att en av besättningarna endast utfodrade kalvarna med helmjölk under råmjölksperioden, därefter med mjölkersättning. Denna besättning uteslöts då kalvutfodringsstudien krävde minst två veckors utfodring med helmjölk. Från besättningen hade vid intervjutillfället endast ett av besättningens fyra *S. aureus*-isolat genkaraktäriserats, vilket innebar att resterade tre isolat aldrig genkaraktäriserades. Av 19 *S. aureus*-isolat genkaraktäriserades därför 16 stycken. Fem besättningar kvarstod efter genkaraktärisering och intervjuer. Djurägarna informerades i samband med intervjun om nästa steg i urvalsprocessen, som innebar att de skulle skicka in mjölkprov från kalvutfodringsmjölken taget i samband med kalvutfodringen två på varandra följande dagar.

Fyra av de fem besättningarna var positiva för *S. aureus* i utfodringsmjölken. Av dessa fyra hade en besättning svårt att göra sig tillgänglig för provtagning under perioden då kalvutfodringsstudien

planerades genomföras och uteslöts därför. Detta lämnade tre besättningar (benämnda II, IV och VI) i vilka kalvutfodringsstudien genomfördes under november 2014.



Figur 1. Schematisk beskrivning av förstudien där 3 mjölkproducerande besättningar selekterades fram genom en urvalsprocess augusti-oktober 2014.

Besättning II

Besättningen drevs konventionellt och kalvarna utfodrades med överskottsmjolk, mjölk från kor som behandlades med läkemedel och under efterföljande karens. Vilka kor som levererade mjölk till kalvarna varierade därmed hela tiden. Mjölken avskildes genom ett slutet system till en separat tank och kylades, därifrån tappades den i en mjölktaxi och värmdes till 40 °C innan utfodring av kalvarna med 3-3,5 l två gånger per dygn.

Kalvarna var uppstallade i samma ladugård som korna. De inhystes i gruppboxar om ca 6 kalvar från 2-3 veckors ålder, dessförinnan i ensambox.

Besättning IV

Besättningen var en relativt nyetablerad och mycket stor besättning (>1000 kor) och var ansluten till KRAV. Vid uppstarten några år tidigare köptes många kor in från olika håll och en del av de kor som vid studiens genomförande levererade mjölk till mejeri var känt infekterade med *S. aureus* men uppvisade inga kliniska symtom. Dessa kor mjölkades sist i mjölkningsordningen. I besättningen utfodrades kalvarna med tankmjölk, all mjölk från behandlade kor slängdes. I tanken kylades mjölken och inför varje kalvutfodring tappades behövd mängd upp i en öppen rostfri tunna och transporteras till kalvavdelningen där den fördes över till en mjölktaxi och värmdes till 40 °C.

Kalvarna inhystes under sina första 2-3 levnadsveckor i ensamboxar med hydda inomhus i ett separat kalvstall. Under denna period utfodrades de med pastöriserad tankmjölk. Därefter förflyttades de till gruppboxar om 8-10 kalvar och utfodrades då med opastöriserad tankmjölk, 3-3,5 l två gånger per dygn.

Besättning VI

Besättningen var KRAV-ansluten och utfodrade kalvarna med överskottsmjölk. Ca 8 kor levererade mjölk till kalvarna varje dag. Av de 8 var 2 kor känt *S. aureus*-infekterade och levererade endast mjölk till kalvarna, dvs. de levererade aldrig mjölk till mejeri trots att de inte hade någon klinisk mastit eller stod på någon behandling. Övriga kor som levererade mjölk till kalvarna var kor med karens efter behandling och dessa varierade därmed över tiden. Mjölken samlades i en öppen rostfri tank i ladugården där den förvarades maximalt 12 timmar (utfodringsintervall för kalvarna) utan att kylas ned. Inför utfodring överfördes mjölken till en mjölktaxi och värmdes till 40 °C.

Kalvarna inhystes i hyddor inomhus i samma ladugård som korna under sina första 2 levnadsveckor därefter i gruppboxar om ca 6 kalvar i samma ladugård. Mjölmängderna som kalvarna utfodrades ökade från 3 l under de första par levnadsveckorna till 4 l under senare delen av mjölkperioden.

Slutliga inklusionskriterier

De tre besättningarna som slutligen valdes ut för genomförande av kalvutfodringsstudien uppfyllde förutom de initiala inklusionskriterierna även att de 1) var positiva för *S. aureus* i mjölk från individuella kor, 2) var positiva för *S. aureus* i mjölk som utfodrades till kalvarna, 3) hade de genprofiler som innehöll flest enterotoxingener samt förekomst av genen *tsst-1*, 4) utfodrade sina kalvar med helmjölk under minst två veckor, samt 5) var tillgängliga för genomförande av kalvutfodringsstudien under den tilltänkta försöksperioden.

Kalvutfodringsstudie

Kalvutfodringsstudien omfattade två provtagningar i varje besättning med 10 dagars mellanrum. Provtagningarna genomfördes av författaren. Alla tre besättningar inhyste sina kalvar i gruppboxar om 6-10 kalvar från 2-3 veckors ålder. Vid första besökstillfället valdes i varje besättning en kalvgrupp ut som vid besöket var 3-4 veckor gamla samt kliniskt friska vid okulär bedömning. Målet var att samma kalvar skulle provtas vid de två tillfällena. I besättning II och VI fanns bara en gruppbox med kalvar i åldern 3-4 veckor medan det i besättning IV fanns flera att välja bland. Här valdes en box godtyckligt vid första besöket vilket visade sig vara ett misstag då gruppen bestod av tjurkalvar som förmedlades (lämnade gården) innan det andra provtagningstillfället. Därför provtogs två olika kalvgrupper i denna besättning. Valet av kalvbox vid andra besöket i denna besättning gjordes utifrån att kalvarna skulle vara ca 5 veckor gamla så som kalvarna i den första gruppen hade varit om de stannat på gården. I besättning VI fanns vid första besökstillfället fyra stycken 1-2 veckor gamla kalvar inhysta i individuella hyddor inomhus som hade mild diarré. Dessa inkluderades i studien utöver den gruppbox med 6 kalvar som också provtogs i denna besättning.

Djurägarna tog ett prov av mjölken vid utfodringen av kalvarna morgonen innan besöket (dvs. 24-30 timmar före provtagningen av kalvarna) och förvarade detta i kyl. I besättning IV togs till följd av missförstånd endast mjölkprov från kalvutfodringen i anslutning till träckprovtagning vid det första besökstillfället. Träckprov togs från varje kalv av författaren. Samtliga prover transporterades i kylväska av författaren till SVA och omhändertogs på laboratoriet samma dag. Det andra provtagningstillfället utfördes på samma kalvar (undantaget besättning IV) och enligt samma protokoll som vid det första besöket.

Samtliga isolat av *S. aureus* från de tre besättningarna (från individmjölk, kalvutfodringsmjölk och kalvträck) kördes i en Pulsfält gelelektrofores för stamtypning och jämförande av pulstyper i mjölk och hos kalvarna.

Provtagning

Mjölksprover togs av djurägarna med hjälp av postat provtagningsmaterial. Djurägarna fick instruktioner via följebrev om vad som skulle provtas (kor eller mjölk som utfodrades till kalvarna) samt om hygien vid provtagning och förvaring/transport av proverna.

Provtagning av kalvar gjordes av författaren genom att en bomullstops fördes in i rektum och rullades mot tarmslemhinnan. Varje tops förvarades under transporten till laboratoriet i ett rör med flytande Vogel-Johnson medium som innehåller komponenter som ska främja selektion av *S. aureus* (Fox et al., 1992).

Bakteriologi

Vid ankomst till mastitlaboratoriet på SVA skrevs alla prover (mjölk- och träckprover) in i SVAs registreringssystem SVALA.

Mjölksproverna togs omhand av i huvudsak författaren i enlighet med SVA:s rutindiagnostik för *S. aureus*. Dag 1 ströks 10 µl av varje prov ut på en halv platta med 5 % Nötblodagar med Eskulin (primärplattor) och inkuberades i 37 °C 16-24 h. Även mjölkkrören inkuberades i 37 °C i 16-24 h för att få en anrikning (tillväxt) av bakterierna, en metod som har visats öka chanserna att isolera *S. aureus* från mjölkprov (Artursson *et al.*, 2010). Dag 2 gjorde författaren en preliminär avläsning av primärplattorna och renodling av misstänkta *S. aureus*-kolonier. Av mjölken som anrikats ströks 10 µl ut på 5 % Nötblodagar med Eskulin (anrikningsplattor) och både primär- och anrikningsplattor inkuberades sedan i 37°C i 16-24 h. Dag 3 lämnades plattorna för expertavläsning enligt ackrediterade rutiner för diagnosticering av *S. aureus* på mastitlaboratoriet. Detta innebar att man identifierade *S. aureus* på typisk morfologi och förekomst av α - och β -hemolys. I osäkra fall kördes MALDI-TOF, en metod som snabbt och säkert identifierar *S. aureus* från kolonimaterial med hjälp av masspektrometri (Rajakaruna *et al.*, 2009; Seng *et al.*, 2009). Alla isolat testades för β -laktamasproduktion för att fastställa förekomst av penicillinresistens. Rena isolat av *S. aureus* frystes i Trypticase Soy Broth med tillsats av 20 % glycerol i cryorör i -80°C.

Träckproverna ströks från topsen ut på en hel platta 5 % Nötblodagar med Eskulin samt på Modifierad Baird-Parker agar (Devriese, 1981) och inkuberades i 37°C. Plattorna preliminäravlästes av författaren efter 16-24 h och misstänkta kolonier renodlades. Alla plattor inkuberades sedan ytterligare 16-24 h och därefter lämnades blodplattorna till mastitlaboratoriet för rutindiagnostik av *S. aureus* medan författaren (med stöd av en av mastitlaboratoriets experter) avläste Baird-Parker-plattorna och renströk misstänkta kolonier på 5 % Nötblodagar med Eskulin. Rena isolat av *S. aureus* frysförvarades enligt tidigare beskrivning.

Genkaraktärisering och stamtypning

DNA microarray

En DNA microarray hybridization assay (CLONDIAG *S. aureus* Genotyping Kit 2.0, Alere Technologies, Jena, Tyskland) (på svenska även kallad mikromatris, DNA-chips eller genchips) kördes på *S. aureus*-isolat från koindivider från alla besättningar för kartläggande av förekomst av enterotoxingener (*se*) och genen för toxic shock syndrome toxin-1 (*tsst-1*) enligt tillverkarens instruktioner.

Arbetsgång: bakterieisolat odlades ut på blodagar, kolonimaterial plockades med 10 µl ögla och tillsattes till ett rör med buffert för cell-lys och degradering av RNA. DNA extraherades med hjälp av Qiagen DNeasy kit genom tillsättning av buffert som gav bindning av DNA och därefter tvättningar som resulterade i en ren DNA-produkt. Mängden DNA mättes och vid behov korrigerades koncentrationen genom utspädning eller avdunstning. DNA:t amplifierades via PCR, därefter märktes DNA-molekylerna och applicerades till array-stripsen. DNA band in till motsvarande sekvens i matrisen och obundet material tvättades bort. Därefter avlästes array-stripsen med laser i Array-mate avläsare och resultatet erhöles i datorn.

Förekomsten av *se* och *tsst-1* jämfördes mellan isolat och besättningar med syftet att gå vidare med besättningar vars isolat hade så många av dessa gener som möjligt.

Pulsfält gelelektrofores

PFGE kördes på samtliga *S. aureus*-isolat från de tre besättningar som ingick i kalvutfodringsstudien enligt Harmony Protocol (se www.harmony-microbe.net) som tidigare använts vid SVA för typning av *S. aureus* (Capurro *et al.* 2010a). Som referensstam användes *S. aureus* NCTC8325.

Makrorestriktionsklyvning skedde med hjälp av enzymet *SmaI* och mönstret analyserades via visuell inspektion för jämförande av pulstyper. Isolat med identiska restriktionsprofiler tilldelades samma pulstyp, skillnader i ett band eller mer ansågs vara olika pulstyper.

Arbetsgång: kolonimaterial togs från blodagarplattor och 3-5 bakteriekolonier av varje isolat slammades upp i en buffert tillsammans med Lysostaphin, ett ämne som bryter ner cellväggen på *S. aureus* (Le Loir *et al.*, 2003). Till lösningen tillsattes smält N-agaros-gel, därefter fylldes små kamrar med lösningen som fick stelna. Från kamrarna erhöles så kallade pluggar, ca 8x4x1 mm stora. Till pluggarna tillsattes buffert och Lysozyme, ett enzym som även det bryter ner cellväggen. Nästa dag byttes bufferten ut och ett nytt enzym, proteinas-K, tillsattes. Proteinase-K bryter ner proteiner som kontaminerar DNA:t och bryter även ner bland annat DNase och RNase, enzymer som i sin tur bryter ner DNA. Detta ledde till att fullständiga och okontaminerade DNA-molekyler frilades i gelpluggen. Efter inkubering i 56 °C i minst 24 h tvättades pluggarna, varefter det var möjligt att förvara pluggarna i buffert i kyl upp till en vecka innan nästa steg måste genomföras.

En plugg från varje isolat delades i två delar varav man gick vidare med den ena. Till denna tillsattes en ny buffert samt restriktionsenzymet *SmaI*, ett enzym som klyver DNA-molekylen på bestämda punkter genom att den identifierar en viss DNA-sekvens. Därefter skars en tunn skiva av pluggarna och placerades på en kam. Först och sist placerades en storleksmarkör, därefter en skiva av kontrollstammen som även placerades efter var femte studieisolat. En gelplatta gjöts och kammen sänktes ned så att pluggskivorna stelnade fast i gelen. Därefter togs kammen bort och gelen placerades i pulsfältsapparatens tråg i en buffertlösning. Ett program för ström och spänning ställdes in och kördes igång. När PFGE:n gått klart färgades gelen in med GelRedTM som är fluorescerande och fotograferades därefter med UV-ljus. Bilden sändes till ett program i datorn där restriktionsmönstren kunde analyseras visuellt.

RESULTAT

Förstudie – utfall av provtagningar i urvalsskedet

Av 108 mjölkprover från 38 kor var 21 prover från 19 kor positiva för *S. aureus*. I alla 8 besättningar var minst en ko positiv för *S. aureus*.

Genkaraktärisering av *S. aureus* från individuella kor

I Tabell 1 redovisas förekomsten av genen för toxic shock syndrome toxin 1 (*tsst-1*) samt enterotoxingenerna *seb*, *sec*, *sed* och *sel*. Övriga enterotoxingener, som inte presenteras i tabellen, förekom antingen hos så gott som alla 16 isolat (gällde enterotoxingenerna *seg*, *sei*, *selm*, *seln*, *selo* och *selu*) eller inte hos något av isolaten (*sea*, *see*, *seh*, *sej*, *sek*, *seq* och *ser*), varför de inte kunde utnyttjas i urvalet.

I besättning I, III och VII påvisades varken *tsst-1*, *seb*, *sec*, *sed* eller *sel*. Besättning VII gick trots detta vidare till provtagning av kalvutfodringsmjölken för att utgöra en back-up besättning (då den trots allt hade de enterotoxiner som var gemensamma för alla isolat) ifall färre än 3 av de 4 övriga besättningarna (II, IV, VI och VIII) skulle visa sig ha *S. aureus* i utfodringsmjölken. I besättning V påvisades såväl *tsst-1* som *seb*, *sec*, *sed* och *sel*. Besättningen uteslöts ändå då det upptäcktes att kalvarna endast utfodrades med helmjolk under råmjölksperioden och därmed inte uppfyllde ett inklusionskriterium.

S. aureus i kalvutfodringsmjölken

Mjolkprover togs från den mjolk som kalvarna utfodrades med i besättning II, IV, VI, VII och VIII. Totalt erhöles 9 prover (endast ett prov erhöles från besättning IV). Sex prover från fyra av besättningarna (II, IV, VI, VII) var positiva för *S. aureus*. Besättningarna II, IV och VI inkluderades i kalvutfodringsstudien.

Kalvutfodringsstudien

Besättning II

De två mjolkprov som togs av överskottsmjölken i anslutning till träckprovtagningarna var negativa för *S. aureus*. Samtliga 14 träckprover från de 7 kalvarna var negativa för *S. aureus*.

Besättning IV

Mjolkprovet som erhöles var positivt för *S. aureus*. I denna besättning provtogs två olika kalvgrupper vid de två besökstillfällena. Vid första besöket provtogs en grupp på 8 kalvar, vid det andra besöket en grupp på 9 kalvar. Av dessa 17 träckprover var samtliga negativa för *S. aureus*.

Besättning VI

De två mjolkproverna var båda positiva för *S. aureus*. Fem träckprover av 10 från första besöket var positiva för *S. aureus*. Alla fem proverna kom från kalvar inhyta i gruppbox. De fyra kalvar som vid första besöket hölls i individuella hyddor och hade diarré var negativa. Vid det andra besöket provtogs samma kalvar. Ett träckprov av 10 var då positivt för *S. aureus*. Detta kom från en av de fyra kalvar som 10 dagar tidigare hade diarré men nu var till synes frisk och hade förflyttats till gruppbox.

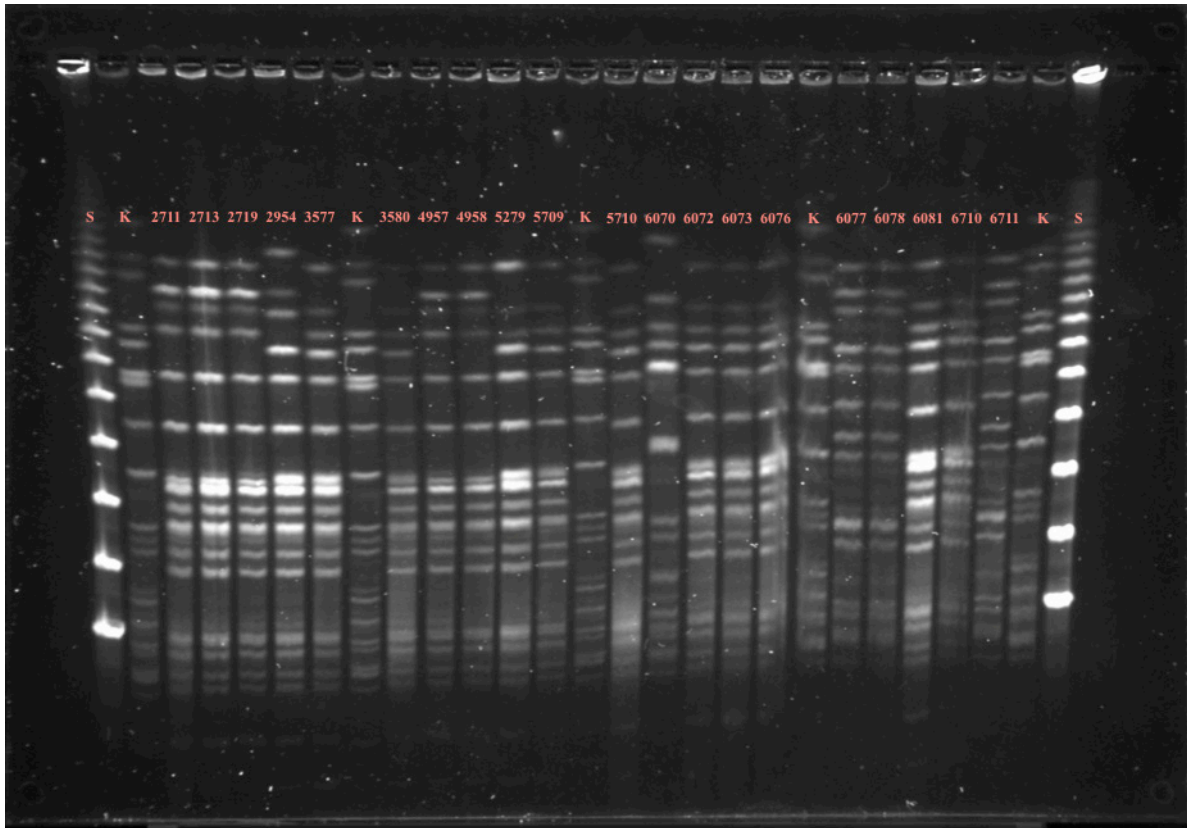
Tabell 1. Resultat av DNA micro-array på 16 *S. aureus*-isolat från enspensprover tagna från 16 kor i 8 besättningar. Förekomst av enterotoxingenerna *seb*, *sec*, *sed* och *sel* samt genen för toxic shock syndrome toxin 1 (*tsst-1*) presenteras. De fem besättningar markerade med □ fick skicka in prover från mjolk som används till kalvutfodring, och de tre besättningar som markerats med * valdes att ingå i kalvutfodringsstudien

Besättning	Isolat	Gener					Skickade in prov från kalvutfodringsmjölken	Ingick i kalvutfodringsstudien
		<i>tsst-1</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>sel</i>		
I	2123	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg		
	2126	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg		
	2133	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg		
II	2711	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	<input type="checkbox"/>	*
	2713	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg		
	2719	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg		
III	2748	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg		
	2755	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg		
IV	2954	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	<input type="checkbox"/>	*
V	3152	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos		
VI	3577	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	<input type="checkbox"/>	*
	3580	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg		
VII	3941	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	<input type="checkbox"/>	
	3944	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg		
	3952	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg		
VIII	4119	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	<input type="checkbox"/>	

Stamtypning

Totalt 20 isolat av *S. aureus* erhöles från samtliga provtagningar före och inom kalvutfodringsstudien från de tre studiebesättningarna. Fjorton isolat kom från mjölkprover (individprover och kalvutfodringsmjölk summerat) och 6 isolat från träckprover tagna på kalvarna. I Figur 2 ses restriktionsmönster för de 20 isolaten. Fem olika pulstyper identifierades och namngavs i alfabetisk ordning (se Tabell 2). I besättning II identifierades en pulstyp, *a*, i besättning IV tre pulstyper, *b*, *c* och *d*, och i besättning VI två pulstyper, *c* och *e*.

I besättning VI återfanns samma pulstyp (*c*) i samtliga mjölkprover, både från individuella kor och från överskottsmjölken som kalvarna utfodrades med. Bland de 6 *S. aureus*-isolaten från kalvträckprover var tre stycken av samma pulstyp som återfunnits i mjölken (*c*), medan resterande tre var av en annan pulstyp (*e*).



Figur 2. Makrorestriktionsmönster av 20 *S. aureus* isolat. På position 1 och 27 (först och sist) sitter en storleksmarkör (S). Kontrollstammen sitter på position 2, 8, 14, 20 och 26 (K). Mellan varje kontroll finns fem studieisolat angivna med nummer.

Tabell 2. *Beskrivning av 20 S. aureus-isolat från de tre besättningar som ingick i kalvutfodringsstudien. För varje isolat anges pulstyp samt vilken provtagningskälla isolatet härrör ifrån. Samma pulstyp som förekommer i mjölken i besättning VI återfinns även i träckprover från denna besättning.*

Besättning	Isolat	Pulstyp	Provtagningsstillfälle	Källa
II	2711	a	Förstudie	Individprov ko
	2713	a	Förstudie	Individprov ko
	2719	a	Förstudie	Individprov ko
	4957	a	Förstudie	Överskottsmjök till kalv
	4958	a	Förstudie	Överskottsmjök till kalv
IV	2954	b	Förstudie	Individprov ko
	5279	c	Förstudie	Tankmjök till kalv
	6070	d	Kalvutfodringsstudie, provtagning 1	Tankmjök till kalv
VI	3577	c	Förstudie	Individprov ko
	3580	c	Förstudie	Individprov ko
	5709	c	Förstudie	Överskottsmjök till kalv
	5710	c	Förstudie	Överskottsmjök till kalv
	6081	c	Kalvutfodringsstudie, provtagning 1	Överskottsmjök till kalv
	6710	c	Kalvutfodringsstudie, provtagning 2	Överskottsmjök till kalv
	6072	c	Kalvutfodringsstudie, provtagning 1	Träckprov från kalv 3-4 v gammal
	6073	c	Kalvutfodringsstudie, provtagning 1	Träckprov från kalv 3-4 v gammal
	6076	c	Kalvutfodringsstudie, provtagning 1	Träckprov från kalv 3-4 v gammal
	6077	e	Kalvutfodringsstudie, provtagning 1	Träckprov från kalv 3-4 v gammal
	6078	e	Kalvutfodringsstudie, provtagning 1	Träckprov från kalv 3-4 v gammal
	6711	e	Kalvutfodringsstudie, provtagning 2	Träckprov från kalv 3-4 v gammal

DISKUSSION

Enterotoxingener hos *S. aureus*

Flera *S. aureus* som isolerats i denna studie hade gener som kodar för olika enterotoxiner och toxic shock syndrome toxin-1 och samtliga isolat hade minst en sådan gen. Isolatens enterotoxinproducerande förmåga undersöktes inte, men en tidigare genomförd svensk studie visar att majoriteten av bovina *S. aureus*-stammar med enterotoxingener även kan stimuleras till enterotoxinproduktion *in vitro* (Blom, 2012).

Bland isolaten i denna studie förekom flera gener som kodar för såväl klassiska som nya SE samt SEls. Av de gener som kodar för klassiska SE identifierades *seb*, *sec* och *sed*, medan *sea* och *see* inte förekom hos något av de undersökta isolaten. *Sea*, som kodar för det vanligaste enterotoxinet associerat till *S. aureus*-orsakad matförgiftning, har tidigare påvisats hos isolat av *S. aureus* från bovina mastiter (Zschöck, 2000; Boerema *et al.*, 2006; Blom, 2012). Däremot förefaller *see* vara relativt ovanlig hos *S. aureus* från såväl nötkreatur som människa (Zschöck, 2000; Boerema, 2006). Förekomst av nya SE och SEls bland bovina *S. aureus*-isolat är inte lika väl studerat som förekomsten av klassiska SE. Bland nya SE och SEls är SEH det enda som hittills tydligt kunnat associeras med matförgiftning hos människa (Argudín *et al.*, 2010). Inget av de undersökta isolaten i denna studie var positivt för *seh*. Gener som kodar för SEH har dock tidigare påvisats hos bovina *S. aureus* och man har även kopplat matförgiftningsutbrott hos människa till SEH i komjölk (Jorgensen *et al.*, 2005; Boerema *et al.*, 2006).

TSST-1 från *S. aureus* är den vanligaste orsaken till toxic shock syndrome (TSS) hos människa (Bergdoll, 1981). Hälften av de 16 genkaraktäriserade isolaten var positiva för genen *tsst-1*. Produktion av TSST-1 har tidigare påvisats i mastitmjolk från kor (Jones & Wieneke, 1986; Matsunaga *et al.*, 1993; Takeuchi *et al.*, 1998). Jones & Wieneke (1986) påvisade TSST-1 i samtliga 4 mjölkprover från kor med kraftig klinisk mastit och Matsunaga *et al.* (1993) fann 28 % av 58 undersökta *S. aureus*-isolat från bovin mastitmjolk positiva för TSST-1. Takeuchi *et al.* (1998) påvisade TSST-1 i 58 % av 43 isolat från kliniska mastiter samt i 77 % av 103 isolat från subkliniska mastiter. De högre prevalenserna påvisade av Takeuchi *et al.* (1998) förklarade författarna med att de hade en detektionsmetod med högre sensitivitet än den som användes av Matsunaga *et al.* (1993). Jones & Wieneke (1986) undersökte endast ett fåtal prover vilket gör jämförelse av andelarna positiva prover mellan denna och andra studier osäker. I studier där man med PCR undersökt genförekomst hos *S. aureus* från mastitmjolk har *tsst-1* påvisats hos 36 % av 94 isolat från subkliniska mastiter i Tyskland (Zschöck *et al.*, 2000) och hos c:a 50 % av 120 isolat från subkliniska samt hos c:a 80 % av 54 isolat från kliniska mastiter i Japan (Hayakawa *et al.*, 2000). Den prevalens av *tsst-1* på 50 % som återfanns i denna studie är högre än den som rapporterades av Zschöck *et al.* (2000) men i nivå med den Hayakawa *et al.* (2000) påvisade bland isolat från subkliniska mastiter. Dock är antalet undersökta isolat i denna studie avsevärt mindre än i de båda nämnda studierna och metoderna skiljer också åt (PCR vs. Microarray).

Hayakawa *et al.* (2000) har också visat att antikroppar mot TSST-1 förekommer i serum- och mjölkprover från lakterande kor. Av 2380 lakterande kor från 36 mjölkgårdar som undersöktes var mer än 2/3 ELISA-positiva för TSST-1-antikroppar i serum (Hayakawa *et al.*, 2000). Man mätte även antikroppstitrar i mjölk och fann att titrarna var lägre i mjölk än i serum så länge celltalen i mjölken var låga. Vid höga celltal ökade antikroppstitrarna i mjölk. Författarna tolkade resultaten som att många lakterande kor kan vara infekterade med TSST-1-producerande *S. aureus*. De hittade inget samband mellan TSST-1-antikroppar och mastit, men spekulerade i att *S. aureus* produktion av TSST-1 hos mjölkkor är tillräckligt stor för att väcka ett immunsvaret hos mjölkorna (Hayakawa *et al.*, 2000). Man fann också antikroppar mot TSST-1 hos en del unga kalvar. Antikroppstiter sjönk när kalvarna

blev äldre vilket tolkades som att antikropparna överförts med råmjölken men att kalvarna inte bildade några egna antikroppar (Hayakawa *et al.*, 2000).

Samtliga 8 isolat som var positiva för *tsst-1* i denna studie var även positiva för *sec*. Ett starkt samband mellan förekomst av *tsst-1* och *sec* har tidigare rapporterats från Tyskland (Zschöck *et al.*, 2000). Bland bovina *S. aureus*-isolat har även samtidig förekomst av *sec*, *sel* och *tsst-1* visats utgöra en tidigare påvisad patogenicitetsgrupp (Monecke *et al.*, 2007). Fyra av isolaten i denna studie var positiva för denna patogenicitetsgrupp. Samtidig förekomst av *seg* och *sei* har också tidigare visats vara vanlig bland bovina *S. aureus*-isolat och även om man inte helt fastställt den superantigena potentialen hos dessa toxiner finns det studier som tyder på att sådan aktivitet förekommer hos människa (Zschöck *et al.*, 2000). Hos nöt finns en påvisad superantigen effekt av såväl TSST-1 som vissa SEs (Zschöck *et al.*, 2000), men deras roll i patogenesen för stafylokockmastit är inte klarlagd och än mindre vet man om den potentiella effekt som dessa toxiner kan ha till följd av oralt intag hos kalvar.

I studiebesättning VI, som var den besättning där träckprover från kalvar odlades positiva för *S. aureus*, genkaraktäriserades två isolat av *S. aureus* från två kor som vid försökens genomförande levererade mjölk till kalvutfodringen. Båda dessa isolat var positiva för *tsst-1*, *sec*, *seg* och *sei*, medan *sel* återfanns hos ett av isolaten. Övriga förekommande gener var *sels*. De kalvar som undersöktes var alla kliniskt friska vid provtagningstillfällena. Då information om produktion av TSST-1 och SE saknas i denna studie går det inte dra några slutsatser kring effekterna av dessa toxiner på kalvarna.

S. aureus i kalvutfodringsmjölken

Alla tre besättningar i vilka kalvutfodringsstudien genomfördes var under förstudien positiva för *S. aureus* i utfodringsmjölken till kalvarna. I besättningarna förelåg i olika utsträckning en risk för att kalvutfodringsmjölk innehållande *S. aureus* stod i temperaturförhållanden som kunde medge tillväxt och enterotoxinproduktion hos bakterien. Ingen av besättningarna kunde garantera kylkedjan av kalvutfodringsmjölken, men besättning II och IV hade system för nedkylning av mjölken direkt efter mjölkning. Besättning VI kylde inte utfodringsmjölken utan strävade efter att hålla tidsintervallet från mjölkning av kor till utfodring av kalvar så kort som möjligt, vilket i praktiken innebar att mjölken förvarades i maximalt 12 timmar. Alla tre besättningar värmde mjölken till 40 °C före utfodring. Om tillväxten av *S. aureus* hade påbörjats redan innan uppvärmningen är det möjligt att tillväxten kunde accelerera kraftigt i samband med uppvärmningen.

I besättning II verkade förekomsten av *S. aureus* i överskottsmjölken variera med tiden. Detta var inte så förvånande då denna besättning bara utfodrade mjölk från kor vars mjölk inte fick levereras till mejeri. Vilka kor detta var skiftade från dag till dag allteftersom nya kor insjuknade och andra tillfrisknade. På så sätt varierade koncentrationen och typen av mikroorganismer som förekom i utfodringsmjölken. En annan möjlig förklaring till att vi fann *S. aureus* i vissa prover av utfodringsmjölken från denna besättning men inte i andra är att mjölken vid några tillfällen kan ha innehållit antibiotikarester då även mjölk från kor under läkemedelsbehandling användes för att utfodra kalvarna. Detta kan ha påverkat möjligheterna att odla fram *S. aureus* från ett mjölkprov även om bakterien fanns där från början.

Till skillnad från besättning II så hade både besättning IV och VI alltid en andel mjölk från känt *S. aureus*-infekterade kor i den mjölk som kalvarna utfodrades med. I besättning IV innehöll den tankmjölk som gavs till kalvarna mjölk från ett antal subkliniskt *S. aureus*-infekterade kor. I besättning VI, som i huvudsak utfodrade kalvarna med överskottsmjölk från karenskor, hade man även två känt subkliniskt *S. aureus*-infekterade kor vars mjölk man valde att aldrig skicka till mejeri utan bara använda till kalvarna.

Utsöndring av *S. aureus* i ett subkliniskt infekterat juver kan vara intermittent (Sears *et al.*, 1990). Man kan därmed inte förutsätta att mjölken vid varje utfodring av kalvarna i besättning IV och VI innehöll *S. aureus*. Våra resultat tyder dock på att en stor andel av utfodringsmjölken i de här två besättningarna innehöll *S. aureus* eftersom samtliga prover av utfodringsmjölk var positiva. Då besättning IV gav kalvarna tankmjölk innehöll denna inte heller några rester av antibiotika som kunde påverka *S. aureus* i mjölken. I besättning VI användes inte mjölk från kor under läkemedelsbehandling utan endast karensmjölk enligt KRAVs regelverk. Därmed bör risken för påverkan av antibiotikarester vara låg även i denna besättning.

Denna studie undersökte förekomst av *S. aureus* i utfodringsmjölk via bakteriologisk odling. Genom PFGE kunde sedan pulstypen i utfodringsmjölken jämföras med de isolat som kom från individuella juverprover från kor med juverhälsostörningar. På så sätt kunde vi visa att de isolat som återfanns i utfodringsmjölk (och senare även i träckprover) verkligen tillhörde en stam av *S. aureus* som skulle kunna ha sitt ursprung från juver och potentiellt var mastitorsakande.

Det hade varit intressant att också undersöka om det fanns preformerade enterotoxiner i utfodringsmjölken, men tyvärr fanns inte tid och möjlighet till detta inom projektets tidsramar. Enterotoxinerna är både syra- och värmestabila och kan därför passera magsäcken (löpmagen) i oförändrad form och det är dessa som orsakar matförgiftning hos människa. Särskilt intressant hade det varit att mäta enterotoxinproduktionen i besättning VI, där *S. aureus* påträffades både i utfodringsmjölken och i kalvträckprover. Utfodringsmjölken i denna besättning förvarades ofta i flera timmar i ladugårdens omgivningstemperatur, från det att den mjölkades till dess den värmdes upp inför utfodring av kalvarna. Det verkar rimligt att risken för att *S. aureus* i utfodringsmjölken skulle växa till och hinna producera enterotoxiner var större i denna besättning än i de två andra. Temperaturen är en avgörande faktor för tillväxt och enterotoxinproduktion hos *S. aureus* och optimalt för enterotoxinproduktion är runt 37 °C (Le Loir *et al.*, 2003). Eftersom temperaturen i ladugården varierar med utomhustemperaturen kan man anta att risken för enterotoxinproduktion var lägre då proverna togs under vinterhalvåret än den varit om provtagningen skett på sommarhalvåret. Men bara det faktum att mjölken inte aktivt kyls när den mjölkats från korna medför definitivt en risk för tillväxt av bakterier i mjölken. Utan att mäta temperatur och tillväxt samt enterotoxinproduktion i utfodringsmjölken är det inte möjligt att utifrån denna studie kvantifiera riskerna med de olika förvaringssystemen för utfodringsmjölk till kalvar.

S. aureus i träckprover

Vid provtagning av kalvarna lades största vikt vid att reducera kontaminationsrisken från hud och omgivning så mycket som möjligt. Sterilförpackade topsar användes, hjälp med att hålla kalvarna erhölls och vid införande av topsen i rektum lades stor noggrannhet vid att inte komma åt huden som omgiver anus. Därmed anses risken låg att de *S. aureus* som isolerats från träckprover skulle vara ett resultat av kontamination.

Eftersom denna studie enbart undersökte bakterieförekomst i början och i slutet av mag-tarmkanalen så går det utifrån resultaten inte att uttala sig om det faktiskt förekom en kolonisation av *S. aureus* i de kalvar som testades positiva. Ett sätt att ta reda på detta skulle kunna vara att mäta förekomst av enterotoxiner i kalvträck. Produktion av enterotoxiner är inte bevis för kolonisation, men det indikerar att bakterien klarar av att inte bara överleva utan faktiskt tillväxa i tarmen på kalvarna. För att få mer entydiga svar på kolonisationsfrågan är *in vitro* försök att föredra. *S. aureus* kan kolonisera tarmen hos människa (Rimland & Roberson, 1986). *S. aureus* kan också ta sig in intracellulärt i odlade kulturer av enterocyter och överleva (Hess *et al.*, 2003). Hos nöt har man visat att *S. aureus* kan inta både juverepitelceller och lokala immunceller (Almeida *et al.*, 1996; Hébert *et al.*, 2000), men några studier på bovina *S. aureus* och deras egenskaper i tarmmiljö har jag inte funnit.

Endast i besättning VI kunde *S. aureus* odlas fram från träckprover. Totalt var 6 kalvar positiva och av dessa var tre isolat av samma pulstyp som även återfanns i utfodringsmjölken och från individuella kor. Materialet i denna studie var litet men resultaten tyder på att denna pulstyp var en juver-*S. aureus* och med stor sannolikhet även en mastitorsakande stam. Det var bara 3-4 veckor gamla kalvar som var positiva, men antalet undersökta kalvar i olika åldrar var inte tillräckligt stort för att det ska kunna gå att dra några slutsatser kring förekomsten av *S. aureus* i relation till kalvarnas ålder.

Stamtypning

Från besättning IV kördes tre *S. aureus*-isolat i pulsfält gelelektroforesen, varav ett var taget från individmjölk och de två andra från utfodringsmjölken till kalvarna vid två skilda tillfällen. Alla tre isolaten var av olika pulstyper. En av stammarna (pulstyp *c*) är samma som den som återfanns i mjölk i besättning VI och som kan antas vara en mastitorsakande stam då den i besättning VI även isolerades från individuella kor. Besättning IV och VI ligger endast ett par mil ifrån varandra. Att samma pulstyp (*c*) förekommer i båda dessa besättningar skulle kunna bero på att de delvis besöks av samma människor. En studie genomförd 2006-2007 i fem svenska mjölkbesättningar visade att det vanligen finns en dominerande pulstyp av *S. aureus* i varje besättning (Capurro *et al.*, 2010b). Våra resultat från besättning II och VI indikerar detsamma. Att besättning IV avviker kan bero på att den är mycket stor (>1000 mjölkande kor) och nystartad sedan några år och att man då var tvungen att köpa in många kor och kvigor från andra besättningar. Dock har vi analyserat ett mycket litet antal *S. aureus*-isolat från denna besättning så några slutsatser är av den anledningen svåra att dra.

Med undantag för pulstyp *c* fann vi olika pulstyperna i de tre provtagna besättningarna. En tidigare genomförd svensk studie påvisade 29 olika pulstyper från 185 epidemiologiskt oberoende *S. aureus*-isolat från bovina mastiter (Lundberg *et al.*, 2014). Lundberg *et al.* (2014) fann att 2 av de 29 pulstyperna var vanligare än de andra och visade att behandlade mastiter orsakade av de vanliga pulstyperna visade signifikant lägre celltal vid uppföljning 120 dagar efter behandling än de ovanliga pulstyperna. Detta indikerar att de vanligaste mastitorsakande *S. aureus* i Sverige har goda behandlingsmöjligheter. Isolat som undersöktes i Lundbergs studie var isolerade från kor med klinisk mastit (Lundberg *et al.*, 2014). Om man ser till vilket kriterium djurägarna i denna studie angett som orsak till provtagning av de kor som var positiva för *S. aureus* förefaller det som att majoriteten av de isolat som kom från individuella kor i de tre studiebesättningarna orsakade subklinisk/kronisk mastit. Det viktiga i relation till denna studies syfte är dock att våra resultat indikerar att vi funnit att *S. aureus* från juver hos individuella kor kan passera magtarmkanalen på unga kalvar om de utfodras med mjölk från dessa kor.

SLUTSATS

Resultaten visar att *S. aureus* i mjölk som används till kalvutfodring har gener för enterotoxinproduktion och indikerar att *S. aureus* kan passera genom unga kalvars mag-tarmkanal. Från denna studie går dock inte att dra några slutsatser om bakteriens förmåga att kolonisera tarmen.

Det finns behov för mer forskning inom detta område för att utvärdera de potentiella effekter som *S. aureus* och enterotoxiner kan ha på kalvars hälsa.

TACK

Jag vill tacka min handledare Camilla Björkman för det stora engagemang hon visat under hela det här arbetets gång och för all hjälp inte minst i skrivandeprocessen. Jag vill också tacka biträdande handledare Karin Artursson som gav mig förtroendet att förvalta idén som detta arbete bygger på och omsätta projektet i praktiken, det har jag lärt mig otroligt mycket på. Ett stort tack går även till personalen på mastitlaboratoriet på SVA samt övriga medarbetare vid SVA Bakteriologen som hjälpsamt svarat på alla mina frågor och hjälpt mig med praktiska saker på lab. Sist men inte minst vill jag tacka alla engagerade djurägare som ställt upp i detta projekt och möjliggjort dess genomförande. Det gläder mig att ni visat sådan stor samarbetsvillighet och ett intresse för detta viktiga forskningsområde.

REFERENSER

- Alere Technologies (2014). *S. aureus genotyping kit 2.0*. http://alere-technologies.com/fileadmin/Media/Downloads/op/manuals/05_16_04_0008_V01_Manual_S.aureus_Genotyping_Kit_2.0.pdf [2015-01-18].
- 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 (6):1021-1026.
- Argudín, M., Mendoza, M. C. & Rodicio, M. R. (2010). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, 2:1751-73.
- Arnold-Larsen, I.-L. (2011). *Kalvuppfödning på mjölkgårdar*. Yrkehögskolan NOVA, Raseborg, Finland. Lantbruksnäringsarna (Examensarbete för Agrolog (YH)-examen)
- Artursson, K., Nilsson-Ost, M. & Persson Waller, K. (2010). An improved method to culture *Staphylococcus aureus* from bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 93:1534-8.
- Aust, V., Knappstein, K., Kunz, H. J., Kaspar, H., Wallmann, J. & Kaske, M. (2013). Feeding untreated and pasteurized waste milk and bulk milk to calves: effects on calf performance, health status and antibiotic resistance of faecal bacteria. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97:1091-103.
- Babu, L. K., Pandey, H. N. & Sahoo, A. (2004). Effect of individual versus group rearing on ethological and physiological responses of crossbred calves. *Applied Animal Behaviour Science*, 87:177-191.
- Baintner, K. (2007). Transmission of antibodies from mother to young: Evolutionary strategies in a proteolytic environment. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 117:153-161.
- Baird-Parker, A. C. (1962). An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci. *Journal of Applied Bacteriology*, 25:12-19.
- Baird-Parker, A. C. (1990). The staphylococci: an introduction. *Society for Applied Bacteriology symposium series*, 19:1S-8S.
- Bannerman, D. D., Springer, H. R., Paape, M. J., Kauf, A. C. W. & Goff, J. P. (2008). Evaluation of breed-dependent differences in the innate immune responses of Holstein and Jersey cows to *Staphylococcus aureus* intramammary infection. *Journal of Dairy Research*, 75:291-301.
- Bannerman, T. L., Hancock, G. A., Tenover, F. C. & Miller, J. M. (1995). Pulsed-field gel-electrophoresis as a replacement for bacteriophage-typing of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33:551-555.
- Barkema, H. W., Schukken, Y. H. & Zadoks, R. N. (2006). Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science*, 89:1877-1895.
- Barto, P. B., Bush, L. J. & Adams, G. D. (1982). Feeding milk containing *Staphylococcus aureus* to calves. *Journal of Dairy Science*, 65:271-274.
- Bendali, F., Madi, N. & Sadoun, D. (2011). Beneficial effects of a strain of *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* in *Staphylococcus aureus*-induced intestinal and colonic injury. *International Journal of Infectious Diseases*, 15:e787-794.
- Bengtsson, B., Unnerstad, H. E., Ekman, T., Artursson, K., Nilsson-Ost, M. & Waller, K. P. (2009). Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. *Veterinary Microbiology*, 136:142-149.
- Bergdoll, M. S., Reiser, R. F., Crass, B. A., Robbins, R. N. & Davis, J. P. (1981). A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. *The Lancet*, 317 (8228):1017-1021.
- Bernes, G., Martinsson, K. & Pettersson, T. (1986). *Kviguppfödning i praktiken. (Raising of the dairy heifer.)*. Umeå: Department of Agricultural Research for Northern Sweden (Report no. 7).

- Blanchard, P. C. (2012). Diagnostics of Dairy and Beef Cattle Diarrhea. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice*, 28:443-464.
- Blom, J. (2012). *Enterotoxin-producing ability of isolated Staphylococcus aureus strains from cows with acute clinical mastitis*. Lunds univeristet. Applied Microbiology (Examensarbete KMB410)
- Blum, J. W. (2006). Nutritional physiology of neonatal calves. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 90:1-11.
- Boerema, J. A., Clemens, R. & Brightwell, G. (2006). Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, 107:192-201.
- Brunton, L. A., Duncan, D., Coldham, N. G., Snow, L. C. & Jones, J. R. (2012). A survey of antimicrobial usage on dairy farms and waste milk feeding practices in England and Wales. *Veterinary Record*, 171:296-.
- Bulanda, M., Zaleska, M., Mandel, L., Talafantova, M., Travnicek, J., Kunstmann, G., Mauff, G., Pulverer, G. & Heczko, P. B. (1989). Toxicity of staphylococcal toxic shock syndrome toxin 1 for germ-free and conventional piglets. *Reviews of Infectious Diseases*, 11 Suppl 1:248-253.
- Capurro, A., Aspan, A., Artursson, K. & Waller, K. P. (2010a). Genotypic variation among *Staphylococcus aureus* isolates from cases of clinical mastitis in Swedish dairy cows. *The Veterinary Journal*, 185:188-192.
- Capurro, A., Aspan, A., Ericsson Unnerstad, H., Persson Waller, K. & Artursson, K. (2010b). Identification of potential sources of *Staphylococcus aureus* in herds with mastitis problems. *Journal of Dairy Science*, 93:180-191.
- Curtis, C. R., Scarlett, J. M., Erb, H. N. & White, M. E. (1988). Path model of individual-calf risk-factors for calfhooood morbidity and mortality in new-york holstein herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 6:43-62.
- Danielsson, H. (2012). *Möjligheter att utfodra överskottsmjölk till kalvar efter pastörisering*. Sveriges lantbruksuniversitet. Husdjursvetenskap - kandidatprogrammet. (Examensarbete 2012: 394)
- De Carolis, E., Vella, A., Vaccaro, L., Torelli, R., Spanu, T., Fiori, B., Posteraro, B. & Sanguinetti, M. (2014). Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *Journal of Infection in Developing Countries*, 8:1081-1088.
- De Verdier, K. (2006). Infektionspanoramat vid diarréer hos svenska kalvar. *Svensk veterinärtidning*, 8-9:29-32.
- Dewell, R. D., Hungerford, L. L., Keen, J. E., Laegreid, W. W., Griffin, D. D., Rupp, G. P. & Grotelueschen, D. M. (2006). Association of neonatal serum immunoglobulin G1 concentration with health and performance in beef calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228:914-921.
- Devriese, L. A. (1981). Baird-Parker medium supplemented with acriflavine, polymyxins and sulphonamide for the selective isolation of *Staphylococcus aureus* from heavily contaminated materials. *The Journal of Applied Bacteriology*, 50:351-357.
- Drackley, J. K. (2008). Calf nutrition from birth to breeding. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice*, 24:55-86.
- Duse, A., Waller, K. P., Emanuelson, U., Unnerstad, H. E., Persson, Y. & Bengtsson, B. (2013). Farming practices in Sweden related to feeding milk and colostrum from cows treated with antimicrobials to dairy calves. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55:49-.
- Elbers, A. R. W., Miltenburg, J. D., De Lange, D., Crauwels, A. P. P., Barkema, H. W. & Schukken, Y. H. (1998). Risk factors for clinical mastitis in a random sample of dairy herds from the southern part of The Netherlands. *Journal of Dairy Science*, 81:420-426.

- European Medicines Agency (2014). *Maximum residue limits*.
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/document_listing/document_listing_000165.jsp&mid=WC0b01ac058002d89b [2014-11-28]
- Ericsson Unnerstad, H., Lindberg, A., Persson Waller, K., Ekman, T., Artursson, K., Nilsson-Ost, M. & Bengtsson, B. (2009). Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. *Veterinary microbiology*, 137:90-97.
- Filteau, V., Bouchard, E., Fecteau, G., Dutil, L. & Dutremblay, D. (2003). Health status and risk factors associated with failure of passive transfer of immunity in newborn beef calves in Quebec. *Canadian Veterinary Journal*, 44:907-913.
- Fournier, C., Kuhnert, P., Frey, J., Miserez, R., Kirchhofer, M., Kaufmann, T., Steiner, A. & Graber, H. U. (2008). Bovine *Staphylococcus aureus*: Association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. *Research in Veterinary Science*, 85:439-448.
- Fox, L. K., Gaskins, C. T., Hancock, D. D., Newkirk, D. & Hutton, C. T. (1992). Comparison of media to isolate *Staphylococcus aureus* from teat skin and milking unit liners. *The Cornell Veterinarian*, 82:225-231.
- Giannechini, R., Concha, C., Rivero, R., Delucci, I. & Lopez, J. M. (2002). Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the West Littoral Region in Uruguay. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 43:221-230.
- Godden, S. M., Fetrow, J. P., Feirtag, J. M., Green, L. R. & Wells, S. J. (2005). Economic analysis of feeding pasteurized nonsaleable milk versus conventional milk replacer to dairy calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226:1547-1554.
- Goodger, W. J. & Theodore, E. M. (1986). Calf management-practices and health management decisions on large dairies. *Journal of Dairy Science*, 69:580-590.
- Guilloteau, P., Zabielski, R. & Blum, J. W. (2009b). Gastrointestinal tract and digestion in the young ruminant: ontogenesis, adaptations, consequences and manipulations. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 60:37-46.
- Hammon, H. M., Schiessler, G., Nussbaum, A. & Blum, J. W. (2002). Feed intake patterns, growth performance, and metabolic and endocrine traits in calves fed unlimited amounts of colostrum and milk by automate, starting in the neonatal period. *Journal of Dairy Science*, 85:3352-3362.
- Hanninen, L., Hepola, H., Rushen, J., De Passille, A. M., Pursiainen, P., Tuure, V. M., Syrjala-Qvist, L., Pyykkonen, M. & Saloniemä, H. (2003). Resting behaviour, growth and diarrhoea incidence rate of young dairy calves housed individually or in groups in warm or cold buildings. *Acta Agriculturae Scandinavica Section a-Animal Science*, 53:21-28.
- Haveri, M., Roslo, A., Rantala, L. & Pyorala, S. (2007). Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. *Journal of Applied Microbiology*, 103:993-1000.
- Hayakawa, Y., Akagi, M., Hayashi, M., Shimano, T., Komae, H., Funaki, O., Kaidoh, T. & Takeuchi, S. (2000). Antibody response to toxic shock syndrome toxin-1 of *Staphylococcus aureus* in dairy cows. *Veterinary Microbiology*, 72:321-327.
- Hébert, A., Sayasith, K., Sénéchal, S., Dubreuil, P. & Lagacé, J. (2000). Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiology Letters*, 193:57-62.
- Hertel, J., Silverlås, C. & Jonasson, A. (2013). *Trender inom kalvhälsan baserat på information från kalvpaketet*. Sveriges lantbruksuniversitet. Veterinärprogrammet (Examensarbete ISSN: 1652-8697)
- Hess, D. J., Henry-Stanley, M. J., Erickson, E. A. & Wells, C. L. (2003). Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* within cultured enterocytes. *Journal of Surgical Research*, 114 (1):42-49.

- Hight, A. R. & Goldwater, P. N. (2009). Staphylococcal enterotoxin genes are common in *Staphylococcus aureus* intestinal flora in Sudden Infant Death Syndrome (SIDS) and live comparison infants. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 57:151-5.
- Jamaluddin, A. A., Carpenter, T. E., Hird, D. W. & Thurmond, M. C. (1996a). Economics of feeding pasteurized colostrum and pasteurized waste milk to dairy calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 209:751-756.
- Jamaluddin, A. A., Hird, D. W., Thurmond, M. C. & Carpenter, T. E. (1996b). Effect of preweaning feeding of pasteurized and nonpasteurized milk on postweaning weight gain of heifer calves on a Californian dairy. *Preventive Veterinary Medicine*, 28:91-99.
- Jensen, M. B. (1999). Effects of confinement on rebounds of locomotor behaviour of calves and heifers, and the spatial preferences of calves. *Applied Animal Behaviour Science*, 62:43-56.
- Jensen, M. B., Munksgaard, L., Mogensen, L. & Krohn, C. C. (1999). Effects of housing in different social environments on open-field and social responses of female dairy calves. *Acta Agriculturae Scandinavica Section a-Animal Science*, 49:113-120.
- Johler, S., Layer, F. & Stephan, R. (2011). Comparison of virulence and antibiotic resistance genes of food poisoning outbreak isolates of *Staphylococcus aureus* with isolates obtained from bovine mastitis milk and pig carcasses. *Journal of Food Protection*, 74:1852-1859.
- Jones, T. O. & Wieneke, A. A. (1986). Staphylococcal toxic shock syndrome. *Veterinary record*, 119 (17):435-436.
- Jordbruksverket (2014-07-22). *Jordbruksstatistisk årsbok 2014, kap. 6 Husdjur*. <http://www.jordbruksverket.se/omjordbruksverket/statistik/jordbruksstatistiskarsbok/jordbruksstatistiskarsbok2014.4.37e9ac46144f41921cd21b7b.html> [2015-02-16]
- Jorgensen, H. J., Mathisen, T., Lovseth, A., Omoe, K., Qvale, K. S. & Loncarevic, S. (2005). An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. *Fems Microbiology Letters*, 252:267-272.
- Kaske, M., Leister, T., Smolka, K., Andresen, U., Kunz, H. J., Kehler, W., Schuberth, H. J. & Koch, A. (2009). Neonatal diarrhea in the calf - IV. communication: Neonatal diarrhea as a herd problem: colostrum management. *Praktische Tierarzt*, 90:756-.
- Kehoe, S. I., Jayarao, B. M. & Heinrichs, A. J. (2007). A survey of bovine colostrum composition and colostrum management practices on Pennsylvania dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 90:4108-4116.
- Kim, H.-J. & Oh, S.-W. (2010). Performance Comparison of 5 Selective Media Used to Detect *Staphylococcus aureus* in Foods. *Food Science and Biotechnology*, 19:1097-1101.
- Kohrman, K. A., Kirkland, J. J. & Danneman, P. J. (1989). Response of various animal species to experimental infection with different strains of *Staphylococcus aureus*. *Reviews of Infectious Diseases*, 11 Suppl 1:231-237.
- Kossaibati, M. A. & Esslemont, R. J. (1997). The costs of production diseases in dairy herds in England. *Veterinary Journal*, 154:41-51.
- Kozytska, S., Stauss, D., Pawlik, M. C., Hensen, S., Eckart, M., Ziebuhr, W., Witte, W. & Ohlsen, K. (2010). Identification of specific genes in *Staphylococcus aureus* strains associated with bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 145:360-5.
- KRAV (2015). *KRAV: Regler 2015 Djurhållning, kapitel 5.10.10: Dubbla karenstider eller 2 dygns karenstid*. <http://www.krav.se/sites/www.krav.se/files/paket-djurhallning.pdf> [2015-02-16]
- Lantbrukarnas Riksförbund (2014). *Mjolk i siffror*. http://www.lrf.se/globalassets/dokument/om-lrf/branscher/lrf-mjolk/statistik/mjolk_i_siffror.pdf [2015-02-16]
- Le Loir, Y., Baron, F. & Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and molecular research*, 2:63-76.

- Liberg, P. & Carlsson, J. (1998). *Colostrum in Swedish dairy cows: Quality and effects on passive immunity in the calves*. Utrecht, the Netherlands. Proceedings of the Xth International Congress on Production Diseases in Farm Animals, 24-28 aug, 1998.
- Lognonne, J. L. (1993). Introduction to pulsed-field gel electrophoresis. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 4:49-55.
- Losinger, W. C. & Heinrichs, A. J. (1997). Management practices associated with high mortality among preweaned dairy heifers. *Journal of Dairy Research*, 64:1-11.
- Lundberg, A., Aspán, A., Nyman, A., Unnerstad, H. E. & Waller, K. P. (2014). Associations between bacterial genotype and outcome of bovine clinical *Staphylococcus aureus* mastitis. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56:2.
- Lundborg, G.K., Svensson, E.C. & Oltenacu, P.A. (2005). Herd-level risk factors for infectious diseases in Swedish dairy calves aged 0-90 days. *Preventive Veterinary Medicine*, 68:123-143.
- Läkemedelsverket (2014-08-29). *Läkemedelsrester i livsmedel*
<http://www.lakemedelsverket.se/malgrupp/Halso---sjukvard/Forskrivning/Veterinarmedicinska-lakemedel/Lakemedelsrester-i-livsmedel/> [2014-11-28]
- Matsunaga, T., Kamata, S., Kakiichi, N. (1993). Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. *Journal of Veterinary Medical Science*, 55 (2):297-300.
- Mcguirk, S. M. (1998). New approach to electrolyte therapy. *Cattle Practice*, 6:67-69.
- Mcguirk, S. M. & Collins, M. (2004). Managing the production, storage, and delivery of colostrum. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice*, 20:593-.
- Monecke, S., Kuhnert, P., Hotzel, H., Slickers, P., Ehricht, R. (2007). Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. *Veterinary Microbiology*, 125:128-140.
- Moran, J. (2002). *Calf rearing: a practical guide*. 2. ed. Landlinks Press. ISBN 0 643 06766 3.
- Newman, M. A., Wilson, L. L., Cash, E. H., Eberhart, R. J. & Drake, T. R. (1991). Mastitis in beef cows and its effects on calf weight gain. *Journal of Animal Science*, 69:4259-4272.
- Nielsen, C. (2009). *Economic impact of mastitis in dairy cows*. Diss. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet.
- Norrman, E. (1990). *Kviguppfödning och kvigmastit (Raising of heifers and heifer mastitis)*. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet (Rapport 1990: 67, ISBN: 91-576-4109-9).
- Olde Riekerink, R. G. M., Barkema, H. W., Kelton, D. F. & Scholl, D. T. (2008). Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *Journal of dairy science*, 91:1366-1377.
- Olsson, S. O., Viring, S., Emanuelsson, U. & Jacobsson, S. O. (1993). Calf diseases and mortality in Swedish dairy herds. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 34:263-269.
- Perez-Bosque, A. & Moreto, M. (2010). A rat model of mild intestinal inflammation induced by *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69:447-453.
- Perez, E., Noordhuizen, J., Vanwuijkhuis, L. A. & Stassen, E. N. (1990). Management factors related to calf morbidity and mortality-rates. *Livestock Production Science*, 25:79-93.
- Persson Waller, K., Persson, Y., Nyman, A. K. & Stengarde, L. (2014). Udder health in beef cows and its association with calf growth. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56:9.
- Petersson-Wolfe, C. S., Mullarky, I. K. & Jones, G. M. (2010-06-11). *Staphylococcus aureus mastitis: cause, detection and control*. Virginia State University. Tillgänglig:
<https://pubs.ext.vt.edu/404/404-229/404-229.html> [2014-12-10]
- Pettersson, K., Svensson, C. & Liberg, P. (2001). Housing, feeding and management of calves and replacement heifers in Swedish dairy herds. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 42:465-478.

- Phillips, R. W. (1985). Fluid therapy for diarrheic calves - what, how, and how much. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice*, 1:541-562.
- Piccinini, R., Borromeo, V. & Zecconi, A. (2010). Relationship between *S. aureus* gene pattern and dairy herd mastitis prevalence. *Veterinary Microbiology*, 145:100-105.
- Raboisson, D., Delor, F., Cahuzac, E., Gendre, C., Sans, P. & Allaire, G. (2013). Perinatal, neonatal, and rearing period mortality of dairy calves and replacement heifers in France. *Journal of Dairy Science*, 96:2913-2924.
- Rajakaruna, L., Hallas, G., Molenaar, L., Dare, D., Sutton, H., Encheva, V., Culak, R., Innes, I., Ball, G., Sefton, A. M., Eydmann, M., Kearns, A. M. & Shah, H. N. (2009). High throughput identification of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* using MALDI-TOF-MS of intact cells. *Infection Genetics and Evolution*, 9:507-513.
- Rimland, D., Roberson, B. (1986). Gastrointestinal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 24 (1) :137-138.
- Roberson, J. R., Fox, L. K., Hancock, D. D., Gay, J. M. & Besser, T. E. (1994). Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 77:3354-3364.
- Roberson, J. R., Fox, L. K., Hancock, D. D., Gay, J. M. & Besser, T. E. (1998). Sources of intramammary infections from *Staphylococcus aureus* in dairy heifers at first parturition. *Journal of Dairy Science*, 81:687-693.
- Sandgren, C. H., Waller, K. P. & Emanuelson, U. (2008). Therapeutic effects of systemic or intramammary antimicrobial treatment of bovine subclinical mastitis during lactation. *Veterinary Journal*, 175:108-117.
- Saperstein, G., Hinckley, L. S. & Post, J. E. (1988) Taking the team-approach to solving staphylococcal mastitis infection. *Veterinary Medicine*, 83:939-.
- Sears, P.M., Smith, B.S., English, P.B., Herer, P.S. & Gonzales, R.N. (1990). Shedding pattern of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infections. *Journal of Dairy Science*, 73 (10):2785-2789.
- Selim, S. A. & Cullor, J. S. (1997). Number of viable bacteria and presumptive antibiotic residues in milk fed to calves on commercial dairies. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 211:1029-.
- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P.-E., Rolain, J. M. & Raoult, D. (2009). Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clinical Infectious Diseases*, 49:543-551.
- Soelberg, S. D., Stevens, R. C., Limaye, A. P. & Furlong, C. E. (2009). Surface Plasmon Resonance Detection Using Antibody-Linked Magnetic Nanoparticles for Analyte Capture, Purification, Concentration, and Signal Amplification. *Analytical Chemistry*, 81:2357-2363.
- Sommerhauser, J., Kloppert, B., Wolter, W., Zschöck, M., Sobiraj, A. & Failing, K. (2003). The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. *Veterinary Microbiology*, 96:91-102.
- Stenebo, H. (1995). *Har uppfoeningen från kalv till ko någon betydelse för 1:a-kalvarnas hälsa? (Does the raising from calf to cow affect the health status of the first lactating cow?)*. Uppsala, Sveriges lantbruksuniversitet (Fördjupningsarbete).
- Stengärde, L. (2011). Behandla kalvdiarréer rätt. *Djurhälsnytt*, 1:21-23.
- Svensson, C., Linder, A. & Olsson, S. O. (2006). Mortality in Swedish dairy calves and replacement heifers. *Journal of Dairy Science*, 89:4769-4777.

- Svensson, C., Lundborg, K., Emanuelson, U. & Olsson, S. O. (2003). Morbidity in Swedish dairy calves from birth to 90 days of age and individual calf-level risk factors for infectious diseases. *Preventive Veterinary Medicine*, 58:179-197.
- Takeuchi, S., Ishiguro, K., Ikegami, M., Kaidoh, T. & Hayakawa, Y. (1998). Production of toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cow's milk and farm bulk milk. *Veterinary Microbiology*, 59:251-258.
- Torsein, M., Lindberg, A., Sandgren, C. H., Waller, K. P., Tornquist, M. & Svensson, C. (2011). Risk factors for calf mortality in large Swedish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 99:136-147.
- USDA (2010). *Dairy 2007; Part J, 1-3: Heifer Calf Health and Management Practices on U.S. Dairy Operations: Mortality, Necropsy, Cause of Death*. (USDA:APHIS:VS, CEAH. Fort Collins, CO. no. 550-0110). Tillgänglig: http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07_ir_CalfHealth.pdf [2015-03-22].
- Waage, S., Mork, T., Roros, A., Aasland, D., Hunshamar, A. & Odegaard, S. A. (1999). Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, 82:712-719.
- Vaarst, M. & Sorensen, J. T. (2009). Danish dairy farmers' perceptions and attitudes related to calf-management in situations of high versus no calf mortality. *Preventive Veterinary Medicine*, 89:128-133.
- Valde, J. P., Lawson, L. G., Lindberg, A., Agger, J. F., Saloniemi, H. & Osteras, O. (2004). Cumulative risk of bovine mastitis treatments in Denmark, Finland, Norway and Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 45:201-210.
- Van Gessel, Y. A., Mani, S., Bi, S. G., Hammamieh, R., Shupp, J. W., Das, R., Coleman, G. D. & Jett, M. (2004). Functional piglet model for the clinical syndrome and postmortem findings induced by staphylococcal enterotoxin B. *Experimental Biology and Medicine*, 229:1061-1071.
- Van Miert, A. S. J. P. A. M., Van Duin, C. T. M. & Schotman, A. J. H. (1984). Comparative observations of fever and associated clinical hematological and blood biochemical changes after intravenous administration of staphylococcal enterotoxins b and f toxic shock syndrome toxin-1 in goats. *Infection and Immunity*, 46:354-360.
- Watts, J. L., Pankey, J. W., Oliver, W. M., Nickerson, S. C. & Lazarus, A. W. (1986). Prevalence and effects of intramammary infection in beef-cows. *Journal of Animal Science*, 62:16-20.
- Weaver, D. M., Tyler, J. W., Vanmetre, D. C., Hostetler, D. E. & Barrington, G. M. (2000). Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14:569-577.
- Wells, S. J., Dargatz, D. A. & Ott, S. L. (1996). Factors associated with mortality to 21 days of life in dairy heifers in the United States. *Preventive Veterinary Medicine*, 29:9-19.
- Vogel, T. A. & Johnson, M. (1960). A modification of the Tellurite-glycine media for use in the identification of *Staphylococcus aureus*. *Public Health Lab*, 18:131.
- Växa Sverige. (2014a). *Husdjursstatistik 2014, Diagram 1 (s. 7)*. http://www.vxa.se/Documents/Husdjursstatistik_2014_slutl.pdf?epslanguage=sv [2014-12-17]
- Växa Sverige. (2014b). *Jämför dig med andra*. <http://www.vxa.se/Radgivning-service/Mjolk--kottdata/Nyheter/2012/Jamfor-dig-med-andra/> [2014-11-26].
- Yang, P. C., Wang, C. S. & An, Z. Y. (2005). A murine model of ulcerative colitis: induced with sinusitis-derived superantigen and food allergen. *BMC Gastroenterology*, 5:6.
- Young, F., Platt, D., Logue, D., Ternent, H. & Fitzpatrick, J. (2001). Bovine *Staphylococcus aureus* mastitis: strain recognition and dynamics of infection. *Journal of Dairy Research*, 68:377-388.
- Zadoks, R., Van Leeuwen, W., Barkema, H., Sampimon, O., Verbrugh, H., Schukken, Y. H. & Van Belkum, A. (2000). Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in

veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (5):1931-1939.

Zadoks, R. N., Van Leeuwen, W. B., Kreft, D., Fox, L. K., Barkema, H. W., Schukken, Y. H. & Van Belkum, A. (2002). Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 40:3894-3902.

Zschöck, M., Botzler, D., Blocher, S., Sommerhauser, J. & Hamann, H. P. (2000). Detection of genes for enterotoxins (*ent*) and toxic shock syndrome toxin-1 (*tst*) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase-chain-reaction. *International Dairy Journal*, 10:569-574.

Zschöck, M., Kloppert, B., Wolter, W., Hannman, H. P., Lammler, Ch. (2005). Pattern of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 108:243-249.

BILAGA 1

Frågeformulär kalvutfodring

Hej,

Mitt namn är Madeleine Lodin och jag är veterinärstudent som går sista året på utbildningen och ska göra ett examensarbete till hösten. Arbetet är en undersökning av kalvar utfodrade med överskottsmjölk i besättningar med *Staphylococcus aureus* mastiter. Syftet är att ta reda på om man kan påvisa att bakterier från mjölken kalvarna dricker kan passera deras mag-tarmkanal och orsaka sjukdom.

Jag söker just nu gårdar som uppfyller kriterierna för studien och du får detta mail då du tidigare deltagit i en studie av Anna Duse vid SVA. Jag skulle uppskatta mycket om du kan tänka dig att delta i en ny studie med liknande upplägg. Inledningsvis behöver du bara svara på sju frågor via länken nedan, det tar inte mer än ett par minuter.

Maila gärna om du har några frågor!

Med vänliga hälsningar,

Madeleine Lodin med handledare Camilla Björkman, SLU och Karin Artursson, SVA

Mail: malo0008@stud.slu.se

Frågor i Qustback-formulär:

1. Ange besättningsnummer:
2. Hur många mjölkkor finns på gården totalt?
 - a. Ange ungefärligt antal:
3. Förekommer problematik med *Staphylococcus aureus*-mastiter i besättningen, dvs. har någon ko under de senaste 3 månaderna haft mastit där *S. aureus* har växt vid odling?
 - a. Ja
 - b. Nej
4. Utfodras kalvarna med överskottsmjölk?
 - a. Ja
 - b. Nej
5. Hur hålls kalvarna under de två första levnadsveckorna?
 - a. Ensambox
 - b. Gruppbox (ange antal kalvar per box):
 - c. Annat alternativ:
6. Hur får kalvarna sin mjölk?
 - a. I napphink eller vanlig hink
 - b. Via kalvamma (automatisk mjölkutfodring) med eller utan transponder
 - c. Annat alternativ:
7. Skulle du kunna tänka dig att delta i en kommande studie som innebär totalt ca 3-4 provtagningar (mjölkprov och träckprov) av ca 5 kor och 5 kalvar i besättningen under aug-oktober i år, om du blir tillfrågad?
 - a. Ja
 - b. Nej

BILAGA 2

Instruktioner för provtagning 1 i kalvutfodringsprojektet

Var god läs igenom hela instruktionen innan du påbörjar provtagningen.

Då var det dags för den första provtagningen, som skall avgöra om er besättning uppfyller kriterierna för deltagande i kalvutfodringsprojektet, som syftar till att ta reda på om *S. aureus*-bakterier i mjölken som kalvarna utfodras med kan passera kalvens mag-tarmkanal.

Den här provtagningen innebär att ni får en kostnadsfri analys av mjölkprover från max 5 stycken olika kor. De individer som ni provtar ska uppfylla ett eller flera av följande kriterier:

1. Har höga celltal
2. Har diffusa tecken på juverinflammation (t ex en flocka då och då)
3. Har en obehandlad klinisk juverinflammation
4. Har behandlats för *S. aureus* mastit för minst en månad sedan och inte återgått till samma juverhälsa som före *S. aureus*-mastiten.

Så här går provtagningen till

1. Proverna ska tas i de mjölkror som följer med detta utskick. Använd 1 mjölkror till varje juverdel (dvs. 1-4 rör per ko). Hos kor som visar tecken på klinisk mastit/förhöjda celltal i endast en juverdel ska prov bara tas från den juverdel som är påverkad. Hos kor som har två eller flera juverdelar som är påverkade provtas alla påverkade juverdelar.
2. Varje rör märks med kons identitetsnummer och vilken juverdel provet kommer ifrån.
3. Det följer med en SVA-remiss som måste fyllas i och skickas med proverna. På remissen skriver ni anledningen till provtagningen för varje enskild ko (enligt de fyra kriterierna ovan).
4. Proverna och remissen skickas i svarskuvertet till SVA.

När proverna anländer till SVA kommer de att analyseras för förekomst av *S. aureus*. Ni kommer inom 2-3 veckor att få svar via mail på om proverna är positiva eller negativa för *S. aureus*. I de fall vi isolerar bakterien kommer vi också att kontakta er för vidare information om studiens genomförande.

Hör gärna av er via mail till malo0008@stud.slu.se om ni har några frågor eller funderingar.

Med vänliga hälsningar

Madeleine Lodin, veterinärstudent årskurs 6, med handledare Camilla Björkman, SLU och Karin Artursson, SVA.

BILAGA 3

Fördjupningsfrågor kalvutfodring (telefonintervju)

1. Hur många kalvar har ni ungefär i besättningen och hur är de inhysta?
2. Berätta hur utfodringen av kalvarna går till i din besättning, från det att mjölken lämnar korna till det att kalvarna dricker den.
3. Vilka kor ger/ger inte mjölk till kalvarna?
 - Får kalvarna mjölk från kor under antibiotikabehandling? (relevant pga kan påverka våra möjligheter att hitta *S. aureus* i sådan mjölk)
 - Är det någon mjölk som ni väljer att inte ge kalvarna, t ex från kor under antibiotikabehandling vid mastit eller mjölk från känt *S. aureus*-infekterade kor?
 - Ger ni någon typ av mjölk i större utsträckning? (t ex höga celltal som egentligen får gå i tanken men ni väljer att sortera bort den och ge till kalvarna för högre kvalitet på mjölk som levereras till mejeri)
4. Vad har ni för system för uppsamling/avskiljning av kalvutfodringsmjölk?
5. Hur förvaras mjölken fram till utfodring, och hur lång tid?
6. Vad har ni för rutiner kring själva utfodringsmomentet – typ av hink, tider, volymer, uppvärmning etc.?
7. Sker pastörisering av mjölken före utfodring av kalvar? I så fall vilka åldersgrupper/kön?
8. Utfodrar ni någon gång under mjölkperioden med mjölkersättning? Till vilka åldersgrupper/kön i så fall?