

# SİĞİRLARIN STAFİLOKOK MASTİTİSLERİNE KARŞI AŞI HAZIRLANMASI ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

Nedret AYDIN (\*)

Meliha CANBAZOĞLU (\*\*)

## GİRİŞ

Süt üretimini ve kalitesini direkt olarak etkileyen mastitis, süt sığırcılığında önemli bir sorun olarak bilinmekte, hastalığa neden olan etken türlerini belirlemede ve hayvanların aşılama yolu ile bağışık kılınması amacıyla değerli araştırmalar yapılmaktadır.

Mastitis'in yapıcı nedenleri arasında biyolojik faktörlerden olan mikroorganizmaların özel bir yeri vardır. Mastitis olgularından çeşitli mikroorganizma cinslerine ait bir çok etken izole ve identifiye edilmiştir.

Ancak diğer ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de mastitis olgularından izole edilen etkenler arasında Staph. aureus ilk sırayı almaktadır (1, 3, 4, 5, 6, 7, 17, 20). Nitekim Türkiye'nin çeşitli yörelerinde araştırma yapan araştırmacıların verileri ile birlikte değerlendirildiğinde mastitis olgularının etiyolojisinin de başta gelen mikroorganizmanın staph. aureus olduğu görülmektedir (1, 3, 4, 5, 6, 7, 20).

Sığır mastitis olaylarından izole edilen Staph. aureus'ların koagulaz, katalaz, hemoliz, bakteriyofaj, yumurta sarısı ve manni-tollü tuzlu agarda üreme gibi çeşitli karakterleri üzerinde çok sayıda araştırma yapılmış olup özellikle aşı hazırlanmasında bu özelliklerin saptanması gereği üzerinde durulmuştur (8, 11, 13, 14, 18, 21).

(\*) Hayvan Hastalıkları Arşt. Enst. Mastitis Lab. Şefi

(\*\*) Hayvan Hastalıkları Arşt. Enst. Mastitis Lab. Uzmanı

Günümüzde ineklerde görülen mastitis olgularına karşı hayvanları aşılama yolu ile bağışık kılma amacıyla birçok araştırmacı tarafından çalışmalar yapılmıştır. Bugüne kadar yapılan aşılama çalışmalarından alınan sonuçlara göre şayet hayvanlar laktasyon döneminde uygun bir yol ve etkili bir aşı ile aşılandıklarında meme bezinde bir immün yanıtın oluşmasının mümkün olabileceği üzerinde durulmuştur (2, 22). Stafilokokal mastitislere karşı çeşitli aşılama çalışmaları yapılmış olup, araştırılan bağışıklık tipleri antibakteriyel, antitoksin ve antienzim şeklinde olmuştur. Çalışma sonuçlarına göre hemolog suşlara karşı sınırlı bir koruma kaydedilmiştir. Dolayısıyla bu sonuçların yeterli olmayacağı ve bir sürüde çok geniş bir serotip dağılımının olabileceği ileri sürülmektedir. Diğer taraftan Stafilokokal mastitislerin çoğunun subklinik ve kronik karakterde olmasında tüm hayvanlarda bağışıklık sağlanmayacağı üzerinde de durulmaktadır (2, 11, 12, 22).

Stafilokok mastitislerine karşı sığır, koyun, keçi ve deney hayvanları üzerinde deneysel olarak bir çok araştırmacı çalışmalar yapmıştır. Bir kısım araştırmacılar formollü bakterin, adjuvanlı inaktif aşı, formolize toksoid, adjuvanlı toksoid ve formolize bakterin ÷ toksoid şeklinde hazırladıkları aşıları koyun, keçi ve sığırlarda denemişler ve farklı sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Bir kısım araştırmacılar da canlı aşılarla bu denemelerini gerçekleştirmişlerdir (9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 19, 23).

Aşılanmış ve kontrol olarak bırakılan hayvanların antikor düzeylerinin saptanmasında aglutinasyon testinin uygulandığı ve epürasyon denemelerinin de patojenik bir Staph. aureus suşunun  $10^9$  jerm içeren kültürleriyle yapıldığı bildirilmektedir (8, 9, 10, 11, 12, 13, 15).

Bu çalışmada, diğer ülkelerde olduğu gibi yurdumuzda da mastitis olaylarından izole edilen etkenler arasında ilk sıraları alan Stafilokok mastitislerine karşı hemoliz, koagulaz, yumurta sarısı fraksiyonu, bakteriyofaj duyarlılığı ve karbonhidrat fermantasyonu (laktoz) gibi karakterleri iyice incelenmiş olan Staph. aureuslardan seçilen suşlarla alüminyum hidroksitli bakterin ve bakterin ÷ toksoid aşısı hazırlanmıştır. Hazırlanan aşıların etkinlikleri gerek tavşanlar üzerinde yapılan denemeler ve gerekse keçiler üzerinde gerçekleştirilen denemelerle saptanmaya çalışılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### İzolasyon Çalışmaları :

Ankara ve yöresinde bulunan çiftliklerde yapılan muayeneler sonucu tesbit edilen 15 akut klinik mastitis olguları ve CMT uygulamasıyla pozitif reaksiyon gösteren subklinik mastitisli hayvanların, hasta meme lobundan alınan toplam 985 adet süt örneği aseptik koşullarda ve steril özel tüplerde laboratuvara getirilmiştir.

### Besi Yerleri :

Akut mastitis olgularından ve toplanan diğer süt örneklerinden izolasyon ve identifikasyon için genel ve selektif besi yerlerinden yararlanılmıştır. Bunlar da zenginleştirilmiş eskülinli kanlı agar, Nitrient agar, Mac Conkey agar, Nutrient buyyon, serumlu buyyon, Medium No: 110, Mannitol salt agardır. Ayrıca aşı hazırlanmasında beyin-kalp infüzyon buyyon (Difco) kullanılmıştır.

### Tavşan Plazması :

Stafilokokların koagülaz oluşturma durumlarını incelemede taze tavşan plazması kullanılmıştır.

### Diğer Test Araçları ve Ortamları :

İzole edilen Stafilokokların identifikasyonunda karbonhidrat fesmantasyonu, yumurta sarısı fraksiyonu kullanıldı.

### Bakteriyofaj :

Çalışmada kullanılan stafilokok faj seti (Bovine set) ve konakçı suşları Veteriner Danışman C.D., Wilson, İngiltere'den temin edilmiştir. Denemelerde Watson A.L. and Lee C.G. (1978) bildirdiği yöntemden yararlanılmıştır.

Faj üretme ve tiplendirme 1 ml.'sinde 400 Mg. CaCl<sub>2</sub> bulunan triptoz soy buyyon, Stafilokok agarı ve Stafilokok faj agarı kullanılmıştır. Konakçı suşlar, kanlı agar, nitrient agar ve buyyonda üretilerek kültüre edilmiştir.

### Fajların Üretilmesi ve Titrajı :

$10^{-1}$  lik 1 ml. faj süspansiyonu 1 ml. % 4'lük  $\text{CaCl}_2$  solusyonu ve 0,1 - 0,2 ml. miktarındaki 4 saatlik konakçı suşunun nutrient buyyondaki kültürü karıştırılmış ve bu karışıma 10 ml. stafilokok agar ilave edilmiştir. Bu karışım 15 dakika  $40^\circ\text{C}$ 'lik benmaride bırakılmış ve sonra bundan 2 stafilokok faj agarı yüzeyine yayılmıştır.

Daha sonra plaklar  $37^\circ\text{C}$ 'de 18 saat inkübe edildikten sonra plaklara 4 ml. nutrient buyyon ilave edilerek üst tabaka toplanıp santrifüj tüpüne alınmıştır. Tüpler 2000 devirde 20 dakika santrifüje edilmiştir ve 0,20 mm. poorsize milipor filtrelerden süzülerek sterilite kontrolü yapıldıktan sonra kullanılmak üzere  $+ 4^\circ\text{C}$  de saklanmıştır.

Faj titrajı için, stafilokok faj agar besiyerine konakçı suş yayılmış ve agarın yüzeyi kuruduktan sonra fajın değişik dilusyonları ( $10^{-1}$  —  $10^{-6}$ ) işaretli bölgelere damlatılmıştır. Agar yüzeyi kuruduktan sonra plaklar  $30^\circ\text{C}$  de 24 saat tutulmuş ve konjluent tam bir erime meydana getiren en yüksek dilusyon RTD olarak değerlendirilmiştir.

### Faj ile Tiplendirme :

Nutrient buyyone kanlı agardaki tiplendirilecek Stafilokok kültüründen ekim yapılmış ve hafifçe çalkalanarak  $37^\circ\text{C}$  de 4 saat inkübe edilmiştir. Sonra Stafilokok faj agar besiyerine inkübe edilen buyyon kültüründen 1 ml. yayılmış 30 dakika kuruması bekletilmiştir. Daha sonra faj süspansiyonundan belirli bölgelere damlatılmış ve petriyerler  $30^\circ\text{C}$  de 20 saat inkübe edilmişlerdir. Bu sürenin sonunda erimenin olup olmadığına bakılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

Test edilen Stafilokok suşları önce 1 x RTD'de, bundan sonuç vermeyenler ise 1000 x RTD'de denenmişlerdir.

### Deney Hayvanları :

Aşılama çalışmalarında, Enstitümüz deneme hayvanları ünitesinde yetiştirilen 24 adet 3,5 - 4 aylık dişi Yeni Zelanda tavşanları ile Çubuk'tan satın alınan 1,5 yaşlı 14 adet dişi ve sağmal keçilerden yararlanılmıştır. Ayrıca zararsızlık kontrollerinin yapılmasında

da gene Enstitü deneme hayvanları ünitesindeki kobaylardan yararlanılmıştır.

#### **Aşı Suşunun Seçimi :**

İzole ve identifiye edilen Staph. aureus suşlarından koagülaz pozitif, beta hemolitik, laktöz pozitif, yumurta sarısı reaksiyonu pozitif ve sığır faj setinde 117 tipine dahil olan 4 suş, aşı hazırlanmasında kullanılmıştır. Bu suşlardan 2'si subklinik mastitis ve 2'si de klinik mastitis olgusundan izole edilmiştir.

#### **Aşının Hazırlanması :**

İlk etapta tavşanlarda deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere iki tür aşı hazırlanmıştır. Aşı hazırlanmasında Blobel ve ark. (8) ve Derbyshire (11)'in bildirdikleri yöntemlerden yararlanılmıştır.

##### **a) Bakterin + Toksoid Aşısı :**

Seçilen suşların 24 saatlik buyyon kültürlerini her birinden 1 ml. miktarında 200 ml. erlenmayer içindeki kalp-beyin infüzyon buyyonuna ekimler yapılarak 48 saat süre ile günde iki kez çalkalamak suretiyle 37°C de inkube edilmişlerdir. Bu süre sonunda bakteri sayımı yapılmış ve 1 ml.'de  $1,7 \times 10^9$  a yakın bir değer ( $2 \times 10^8$ ) elde edilmiştir. Daha sonra kültüre final konsantrasyonu % 05 olacak şekilde formalin katılmıştır. İnaktivasyon ve detoksikasyon amacıyla formüllü kültür 3 hafta süre ile 37°C de inkube edilmiştir. Bu süre sonunda etüvden alınarak besi yerlerine ekimler yapılmıştır. Sterilite kontrolleri yapıldıktan sonra Şap Enstitüsünden temin edilen Alüminyum hidroksitten % 10 oranında katılarak absorpsiyon işlemi yapılmıştır. Daha sonra prezervatif madde olarak % 001 oranında mertiyolet katılmıştır. Sterilite ve zararsızlık kontrolleri yapıldıktan sonra kullanılmak üzere + 4°C de muhafaza edilmiştir.

##### **b) Bakterin Aşısı :**

Yukarıda bildirildiği şekilde kalp-beyin infüzyon buyyonuna ekim yapılan suşların 48 saatlik kültürlerine, bakteri sayımı yapıldıktan sonra, final konsantrasyonu % 0,5 olacak şekilde formalin katılmış ve 24 saat 37°C de bekletildikten sonra 3000 devirde 30 dakika santrüfüje edilmiştir. Daha sonra üst kısım atılarak dip-

teki tortu steril fizyolojik tuzlu su ile Meferland 10'a tekabül edecek şekilde sulandırılmıştır. Bundan sonra % 10 oranında Alüminyum hidroksit adsorbsiyon işlemi yapılmış ve nihayet prezervatif madde olarak % 001 oranında Mertiyolet katılmıştır. Sterilite ve zararsızlık kontrolü yapıldıktan sonra kullanılmak üzere + 4°C de muhafaza edilmiştir.

#### **Aşılama Denemeleri :**

İlk etapta hazırlanan aşılarda bağışıklık kontrollerinde tavşanlar gruplara ayrılarak kullanılmıştır. 10 tavşana subkutan olarak önce 0,5'er ml. ve 3 hafta sonra 1 ml. miktarında Bakterin aşısından, 10 tavşana ise aynı miktarlarda Bakterin + Toksoid aşısından şırınga edilmiştir. 4 tavşan kontrol olarak bırakılmıştır.

İkinci etapta tavşanlarda etkinliği belirlenen Bakterin aşısı kullanılmıştır. 12 dişi ve sağmal keçiden 8'ine kas içi yolla ikişer gün aralıklarla 2 ml, 5 ml, ve 5 ml. ilk şırıngadan 3 hafta sonrada 5 ml. miktarında 4 şırınga yapılmıştır. Mukayese amacıyla 2 keçiye deri altı yolla 2 ml., 3 ml. ve 3 ml. ilk şırıngadan 3 hafta sonra da 3 ml. miktarında ve 2 keçiye de aynı miktarda meme derisi altına bakterin aşısından şırınga edilmiştir. 2 keçi ise kontrol olarak bırakılmıştır.

#### **Eprüvasyon :**

Klinik mastitis olgusundan izole ve identifiye edilen 5. süt no.lu patojenik Staph. aureus suşu eprüvasyon denemelerinde kullanılmıştır. Tavşanlarda eprüvasyon aşılama sonrası 3,6 ve 8 aylarda yapılmış olup eprüve dozu olarak ml.sinde  $1,5 \times 10^9$  bakteri içeren kültürden 1 ml. subkutan yolla şırınga edilerek denemeler gerçekleştirilmiştir.

Keçilerin eprüvasyon denemeleri ise aynı patojenik suşla yapılmıştır. Eprüvasyonda ml.'sinde  $1,5 \times 10^9$  bakteri içeren beyin-kalp infuzyon buyyonunda iki meme lobundan birine meme içi yolla 2,5 ml. inokule edilmiştir. İnokulasyondan sonra memedeki değişiklikler (şişme, kızarma, akıntı v.s.) ve hayvanların dereceleri alınarak sağlık durumları hergün gözlem altında tutulmuştur. Sağmal hayvanlarda sütün pH durumu incelenmiş ve inokulasyondan 12 gün sonra hayvanlar kesilerek memelerin histopatolojik ve bakteriyolojik muayeneleri yapılmıştır.

## Serolojik Testler :

Aşılı hayvanlarda antikor düzeyinin saptanmasında ve aşısız hayvanların kanlarında antikor varlığının araştırılmasında çabuk (lam) aglutinasyon testinden yararlanılmıştır. Morfolojik ve kültürel özellikleri belirlenmiş olan stok suşlardan biri (No : 4) antijen hazırlanmasında kullanılmıştır. Seçilen suşun nutrient agardaki 24 saatlik üreyen kolonileri izotonik fizyolojik tuzlu su içinde toplanmış, 2.500-3.000 devirde 15 dakika santrüföje edildikten sonra, kesif bir emülsiyon hazırlanmış ve 70°C de yarım saat benmaride bırakılarak bakterilerin öldürülmesi sağlanmıştır. Daha sonra bu kesif suspansiyon Mc. Ferland 1'in 50 misli kesafette olacak şekilde ayarlanarak testte kullanılmak üzere + 4°C de saklanmıştır.

Bu testle tavşanlarda antikor aranması 8 ay, keçilerde ise 10 ay süre ile sürdürülmüştür. Hayvanlardan alınan serumların çift katlı sulandırılması (1/2'den 1/64'e kadar) yapılmış ve temiz çizgisiz lamalar üzerinde eşit miktardaki antijenle birer damla miktarında karıştırılarak 2-3 dakika içindeki partiküller halindeki aglutinasyonun görülmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

## B U L G U L A R

### İzolasyon Sonuçları :

Çalışma süresince 15 klinik akut mastitis olgusu ve subklinik mastitisli hayvanlardan alınan toplam 985 adet süt örneğinden 128 Staph. aureus ile 38 Staph. epidermitis izole ve identifiye edilerek diğer denemelerimizde bu suşlardan yararlanılmıştır. İzole edilen Staph. aureus suşlarının bazı özelliklerine göre dağılımları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo : 1. İzole edilen Staph. aureus'ların bazı özelliklerine göre dağılımları.

Test Edilen Suş Sayısı	Koagülaz Testi		Mannitol Fermantasyonu		Yumurta Sarısı		Hemoliz	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Beta	Diğer
128	62	66	94	34	38	90	102	26
	(%48,4)	(%51,5)	(%73,4)	(%26,5)	(%29,6)	(%70,3)	(%79,6)	(%20,3)

### Bakteriyofaj Tiplendirme Sonuçları :

Sığır faj setinde bulunan 7 tip suşa karşı izole ve identifiye edilen tüm Stafilokokların duyarlılıkları incelenmiş olup alınan sonuçlar Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo : 2. Bakteriyofaj Tiplendirme Sonuçları

İncelenen Suş ve sayısı	Sığır faj seti suş no :							Tiplendirilmeyen suş sayısı
	78	102	116	107	117	118	119	
Staph,au-reus (128)	37	26	58	2	98	46	24	30
	(%28,9)	(%20,3)	(%5,3)	(%1,5)	(%76,5)	(%35,9)	(%18,7)	(%23,4)

Tablodan anlaşılacağı gibi incelenen 128 Staph. aureus suşunun % 76,5.117 no.lu faja duyarlı çıkmış olup tiplendirilmeyen suşların oranı ise % 23,4 kadar olmuştur. Elde edilebilen fajlarla çalışılmıştır.

### Aşılama Sonuçları :

İlk etapta hazırlanan bakterin ve bakterin + toksoid aşısının tavşanlardaki uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Aşılanan tavşanlar 3, 6 ve 8 aylarda eprüve edilmişler ve 8 aya kadar gruplardaki tavşanlardan alınan kan örneklerinden elde edilen serumlarla aglutinasyon titrelerine bakılmıştır. Aşılı hayvanlarda 1/4 ile 1/32 ara-



sında değişen titrelerde pozitif reaksiyon görölmesine karşılık kontrollerde sonuç negatif bulunmuştur.

Bakterin aşısının tavşanlardaki bağışıklık denemelerinde tavşanların aylara göre lam aglutinasyon titreleri Grafik-1 ve 2'de gösterilmiştir ve log<sub>2</sub> tabanına göre ortalamaların aylara dağılımı ise Grafik-3'de verilmiştir. Grafiklerin incelenmesinden anlaşılacağı üzere 5 aydan itibaren antikor düzeyleri düşmeye başlamaktadır.

Bakterin + Toksoid aşısının bağışıklık denemelerinde tavşanların aylara göre lam aglutinasyon titreleri Grafik-4 ve 5'de gösterilmiş ve log<sub>2</sub> tabanına göre ortalamaların aylara dağılımı ise Grafik-6'da verilmiştir. Grafiklerin incelenmesinden anlaşılacağı gibi antikor düzeyleri 3 aydan itibaren düşmeye başlamaktadır.

İki aşının karşılaştırılmasında bakterin aşısının bakterin + toksoid aşısına oranla daha yüksek düzeyde ve daha uzun süre antikor oluşturduğu görölmektedir. Bakterin aşısı ile aşılanmış olan keçilerden son aşılamaadan 21 gün sonra kan alınarak lam aglutinasyonu ile antikor titrelerine bakılmış ve aşılı hayvanların 1/4 ile 1/32 arasındaki değişik titrelerde pozitif reaksiyon gösterdikleri gözlenmiştir. Aşılı ve kontrol keçilerden her ay kan alınarak antikor düzeyleri incelenmiştir. Sonuçlar Tablo-3'de gösterilmiştir.

#### **Eprüvasyon Sonuçları :**

##### **a) Tavşanların Eprüvasyonu :**

Bakterin ve bakterin + toksoid aşıları ile aşılı tavşanların eprüvasyon denemeleri 3, 6 ve 8 aylarda yapılmıştır.

Üçüncü aydaki eprüvasyonda toksoid + bakterin aşısı uygulanan gruptan 4 tavşan patojenik Staph. aureus'la eprüve edilmiş ve 2 tavşanda herhangi bir patolojik bozukluk görölmemesine karşılık 2 tavşan 1 hafta içinde hastalanarak ölmüşlerdir. Ölen hayvanların otopsisinden sonra alınan materyallerden etken izole edilmiştir. Aynı zamanda bakterin aşısı ile aşılanmış gruptaki 4 tavşan da eprüve edilmiş ve tüm hayvanların sağlıklı kaldıkları gözlenmiştir.

Tablo : 3. Lam aglutinasyonunda Bakterinle aşıli keçilerde antikor titreleri.

AYLAR	Kas içi aşı yapılan hay. no.								Subkutan Aşılı No.		Meme derialtı aşıli no.		Kontrol no.	
	969	971	974	973	980	976	6647	981	986	968	6636	6633	6631	977
2. ay	1/16	1/32	1/32	1/8	1/32	1/32	1/16	1/32	1/32	1/8	1/4	1/32	—	—
3. ay	1/16	1/32	1/32	1/4	1/32	1/32	1/16	1/32	1/32	1/8	1/4	1/32	—	—
4. ay	1/16	1/16	1/32	1/4	1/16	1/16	1/16	1/32	1/32	1/8	1/4	1/32	—	—
5. ay	1/16	1/4	1/32	1/2	1/8	1/16	1/16	1/32	1/32	1/4	1/2	1/16	—	—
6. ay	1/16	1/4	1/32	1/2	1/8	1/16	1/16	1/16	1/32	1/4	1/2	1/16	—	—
7. ay	1/16	1/2	1/32	—	1/4	1/16	1/16	1/16	1/32	1/4	1/2	1/16	—	—
8. ay	1/8	—	1/32	—	1/4	1/16	1/8	—	1/6	-/4	—	1/16	—	—

Altıncı ayda bakterin + toksoid aşısı uygulanan gruptaki 4 tavşan eprüve edilmiş ve sonuçta 2 tavşan 1 hafta içinde ölmüş ve 2 hayvan canlı kalmıştır. Ölen hayvanlardan etken izole edilmiştir. Bakterin aşısı ile aşılanmış gruptaki 4 tavşanın eprüvasyonunda hayvanlarda hiçbir patolojik bozukluk görülmediği gibi ölen hayvan da olmamıştır.

Sekizinci ayda bakterin + toksoid aşısı uygulanan gruptaki 2 tavşanın eprüvasyonunda hayvanlar 3 gün içinde komaya girerek öldükleri halde bakterin aşısı ile aşılanan gruptaki 2 tavşandan biri hastalanarak 1 hafta içinde ölmüş, 1 hayvan ise canlı kalmıştır. Ölen hayvanlardan etken izole edilmiştir.

Kontrol grubunda bulunan 4 tavşanın eprüvasyonunda hayvanlar 3 gün içinde komaya girerek ölmüşlerdir. Ölen hayvanların otopsi sonucu alınan materyallerden etken izole edilmiştir.

Tavşanların aşılama denemelerinde çeşitli zamanlarda gerçekleştirilen eprüvasyon sonuçları Tablo 4'de gösterilmiştir. Tablonun incelenmesinden anlaşılacağı üzere bakterin aşısı 6. aya kadar % 100 bir korunma sağladığı halde bakterin + toksoid aşısı % 50 bir korunma sağlamıştır. Sekizinci ayda bakterin aşısında korunma değeri % 50'ye düşmesine karşın bakterin + toksoid aşısında korunma olmamıştır. Bu nedenle keçilerin aşılamalarında bakterin aşısı tercih edilmiştir.

Tablo : 4. Tavşanlarda çeşitli zamanlarda yapılan eprüvasyon sonuçları ve aşıların koruma değerleri.

Eprüvasyon Zamanı	Bakterin			Bakterin + Toksoid			Kontrol		
	Ölü	Canlı	korun- ma %	Ölü	Canlı	korun- ma %	Ölü	Canlı	korun- ma %
3. ay	0/4	4/4	100	2/4	2/4	50	4/4	0/4	0
6. ay	0/4	4/4	100	2/4	2/4	50	—	—	—
8. ay	1/2	1/2	50	2/0	0/2	0	—	—	—

Bakterinle aşılı keçilerde yapılan eprüvasyon denemeleri aşılama- lamadan sonra 8, 9 ve 10. aylarda patojenik Staph. aureus'un meme içine verilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Tablo 3'de aglutinasyon titreleri belirtilen keçilerden antikor düzeyi yüksek olan hayvanların meme loblarında hiçbir patolojik değişiklik olmamasına karşılık antikor düzeyi düşük olan hayvanlarda memeden bir akıntı ve hafif bir şişkinlik gözlenmiştir.

8. ayda eprüve edilen aglutinasyon titresi en yüksek olan 2 keçi- çide (Kulak no : 974-986) inokulasyondan 11 gün sonrasına kadar hiç bir klinik septomla karşılaşılmadığı gibi memede de herhangi bir değişikliğe rastlanılmamıştır. 12 gün sonra kesilen hayvanların meme materyalinden bakteriyolojik ve histopatolojik muayeneler sonucu Stafilokokal mastitis saptanmamıştır.

9. ayda eprüve edilen yine antikor düzeyi yüksek olan 2 keçi- den de (Kulak no : 976-6633) aynı bulgular elde edilmiştir.

10. ayda önce 4 aşılı keçi (Kulak no : 969, 971, 973, 6647) eprüve edilmiş. Bunlardan birinde klinik olarak mastitis olgusuna rastlanmış ve 12 gün sonra yapılan otopside bakteriyolojik olarak etken izole edildiği gibi histopatolojik olarak da Stafilokokal mastitis saptanmıştır. Bu hayvan düşük antikor taşıyan hayvanlar arasında idi. (Kulak no : 973). Diğer hayvanlarda klinik araz görülmediği gibi, bakteriyolojik ve histopatolojik bulgulara rastlanılmamıştır.

Aynı ay içerisinde geri kalan 4 aşılı (Kulak no : 981, 980, 6636, 968) ve 2 kontrol hayvan (Kulak no : 6631, 977) eprüve edilmiştir. Aşılı hayvanların birinde patolojik olarak mastitis olgusu saptanmış ancak klinik araz görülmemiş ve bakteriyolojik etken üretilmemiştir. Diğer üç keçide normal bulgular elde edilmiştir.

Kontrol grubu hayvanların eprüvasyonunda ise inokulasyondan 5 gün sonra memede tipik mastitis belirtileri saptanmış ve 12 gün sonra kesilen kontrol hayvanların histopatolojik yoklamalarında Stafilokokal mastitis saptandığı gibi bakteriyolojik olarak etken üretilmiştir.

Tablo 5'in incelenmesinden anlaşılacağı üzere kas içi yolla aşılanan 8 keçiden 1'inde hem klinik olarak mastitis görülmüş ve gerek bakteriyolojik olarak etken izole edilmiş, gerekse histopatolojik olarak stafilokokal mastitis saptanmıştır. Bu gruptaki bir hayvanda da sadece histopatolojik olarak mastitis saptanmıştır. Dolayısıyla bu grupta korunma % 80 olmuştur. Subkutan ve meme derisi altı aşıllı keçiler ise epürvasyon sonuçlarına göre normal bulunmuş olup % 100 korunmuşlardır, ancak 7. aydan itibaren antikor titrelerinin düşüşüne bağlı olarak korunma düzeyide düşmüştür.

Tablo : 5. Bakterinli aşıllı keçilerde epürvasyon sonuçları

Aşıllı Keçi No. ve Grupları	Klinik Mastitis	Bakteriyolojik	Histopatolojik	
KAS İÇİ	969	Görülmedi	Etken üremedi	—
	971	»	»	—
	974	»	»	—
	973	Görüldü	Etken üredi	Staphylococcal mastitis
	980	Görülmedi	Etken üremedi	Staphylococcal mastitis
	976	»	»	—
	6647	»	»	—
	981	»	»	—
SUBKUTAN	986	»	»	—
	988	»	»	—
MEME DERİ ALTİ	6636	»	»	—
	6633	»	»	—
KONTROL	6631	Görüldü	Etken üredi	Staphylococcal mastitis
	977	Görüldü	Etken üredi	Staphylococcal mastitis

## TARTIŞMA

Çalışma süresince izole ve identifiye edilen 128 Staph. aureus suşunun çeşitli özellikleri incelenmiş ve aşı hazırlanmasında seçilen suşlarda Tablo 1'de belirlenen bu özelliklerin bulunması sağlanmıştır. Ayrıca bu suşların sığır faj seti (78-102-116-107-117-118-119) ile tiplendirilmeleri yapılmış ve 98 suşun (% 76,5) 117 faj tipine ait oldukları belirlenmiştir.

Nitekim bu konuda çalışan araştırmacılar da suş seçiminde bu özelliklerin belirlenmesi gereği üzerinde durmuşlardır (8, 9, 11, 12, 13).

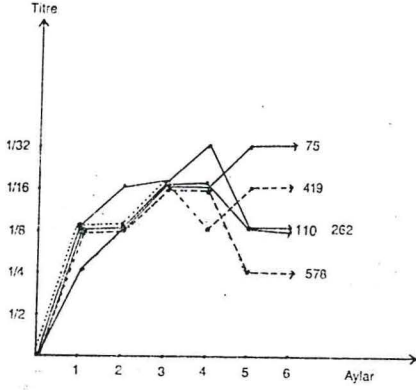
Aşılama çalışmalarında hazırlanan alüminyum hidroksitli bakterin ve bakterin + toksoid aşısının tavşanlar üzerindeki denemelerinde bakterin aşısının bakterin + toksoid aşısına oranla daha yüksek düzeyde ve daha uzun süre antikor oluşturdıkları görülmüştür (Grafik 1, 2, 3, 4, 5 ve 6).

Tavşanlarda 3, 6 ve 8. aylarda yapılan epruvasyon denemelerinde hayvanların bakterin aşısı ile 3 ve 6 ayda % 100, 8. ayda ise % 50 bir korunma sağladıkları halde bakterin + toksoid aşısında korunma 3 ve 6 aylarda % 50, 8. ayda ise % 50 olmuştur (Tablo 4).

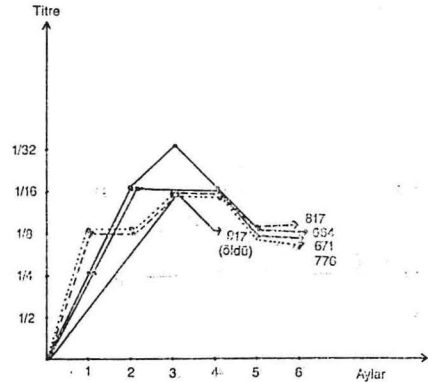
Tavşanlarda etkinliği saptanan bakterin aşısı ile keçiler aşılandığında ise hayvanların serumlarında 10 aya kadar değişik titrelerde antikor saptanmıştır (Tablo 3).

Keçilerin kas içi, subkutan ve meme derisi altına bakterinle yapılan aşılamalarında; kas içi yolla aşılanan 8 keçiden 1'inde hem klinik olarak mastitis görülmüş ve hem bakteriyolojik muayene sonucunda etken izole edilmiş ve hem de histopatolojik olarak Stafilokokal mastitis saptanmıştır. Yine bu grupta bulunan 1 hayvanda sadece histopatolojik olarak mastitis saptanmıştır. Subkutan ve meme derisi altı aşılanan keçilerde epruvasyonda dirençli bulunmuştur. Dolayısıyla kontrol hayvanlara oranla keçilerde önemli bir düzeyde korunma sağlanmıştır (Tablo 5).

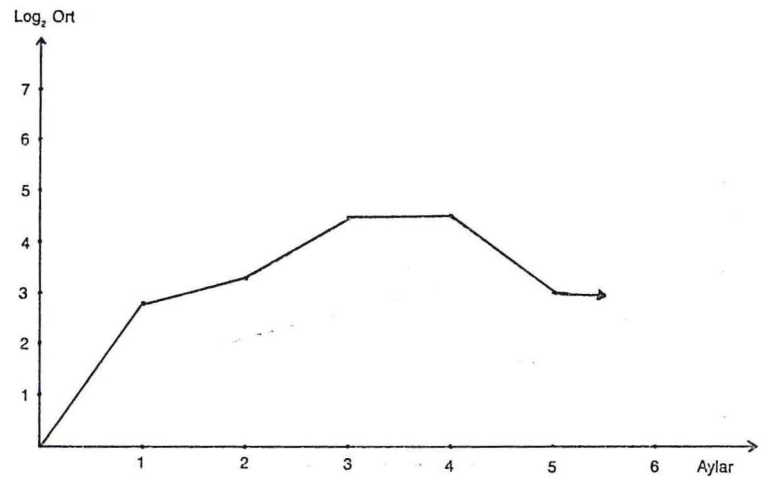
Aşılama çalışmalarındaki bulgularımız araştırmacıların bulgularına uygunluk göstermektedir (2, 8, 9, 11, 16, 19).



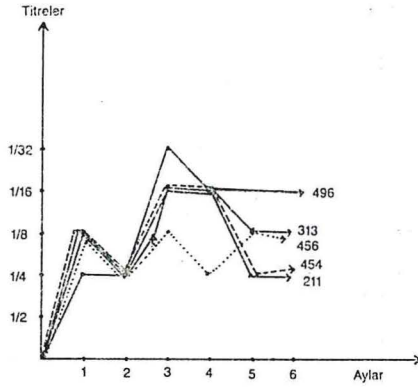
Grafik - 1 : Bakterin'in bağışıklık denemelerinde 5 tavşanın aylara göre antikor düzeyleri (Lâm Ag.)



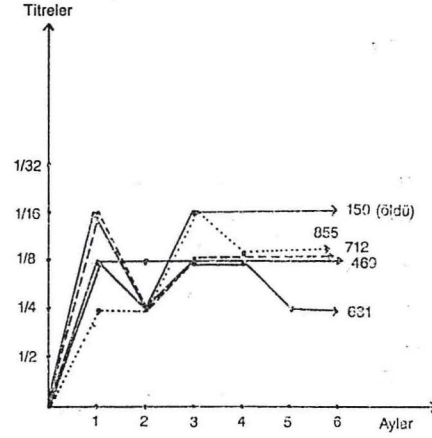
Grafik - 2 : Bakterin'in bağışıklık denemelerinde 5 tavşanın aylara göre antikor düzeyleri (Lâm Ag.)



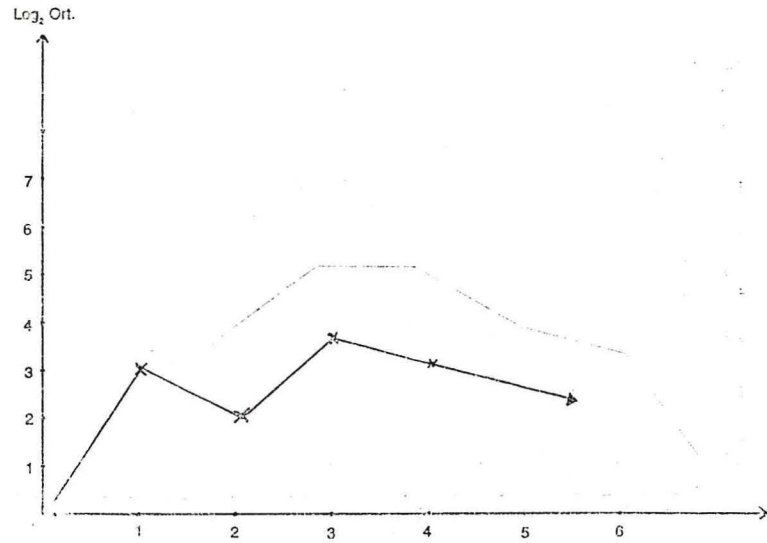
Grafik - 3 : Bakterinin bağışıklık denemelerinde log<sub>2</sub> tabanına göre ortalamaların aylara göre dağılımı



Grafik - 4 : Bakterin + Toksoid'in bağışıklık denemelerinde 5 tavşanın aylara göre antikor düzeyleri (Lâm Ag.)



Grafik - 5 : Bakterin + Toksoid'in bağışıklık denemelerinde 5 tavşanın aylara göre antikor düzeyleri (Lâm Ag.)



Grafik - 6 : Bakterin + Toksoid'in bağışıklık denemelerinde log, tabanına göre ortalamaların aylara göre dağılımı



## SONUÇ ve ÖNERİLER :

Tüm dünyada olduğu gibi yurdumuzda da sığırlardaki mastitis olgularında ilk sırayı alan Stafilokokal mastitislere karşı aşı ile korunmanın mümkün olabileceği görülmektedir. Ancak polimikrobiyel etyolojiye sahip olan mastitisin minimum düzeye indirilmesi söz konusu değildir. Her ne kadar bu çalışmada deneysel olarak tavşan ve keçiler üzerinde denenen bakterin aşısının etkinliği ortaya konulmuş ise de sahada bizzat sığırlar üzerinde de bu aşının denemesi gerektiği kanısına varılmıştır. Şayet inekler laktasyon dönemindeyken uygun bir yol ile ve etkili bir aşı ile aşılandıklarında yeterli bir bağışıklık sağlanabileceği düşünülmektedir. Ancak aşı ile korunmadan önce yetiştiricinin eğitimi gözönüne alınarak ahır hijyeni, meme hijyeni ve teat-deepping'e önem verilmelidir.

## Ö Z E T

Bu çalışmada aşı hazırlanması amacıyla 15 klinik akut mastitis olgusu ve 985 supklinik mastitisli ineklerden alınan süt örneğinden 128 staph. aureus izole ve identifiye edilmiştir. Aşı hazırlanmasında koagulaz pozitif, beta hemolitik laktoz pozitif, mannitol pozitif, yumurta sarısı fraksiyonu pozitif ve bakteriyofaj tiplendirmede Bovine 117 grubunda bulunan 4 suş kullanılmıştır. Bu suşların karışımından ibaret olan alüminyum hidrokside adsorbe bakterin ve bakterin + toksoid aşısı hazırlanmıştır.

Tavşanlarda yapılan aşılama denemelerinde Alüminyum hidroksitli bakterin ve bakterin + toksoid aşısından ilk aşılama 0,5 ml. ve bundan 3 hafta sonra 1 ml. miktarında subkutan olarak yapılmıştır. Keçilerde ise alüminyum hidroksitli aşidan ikişer gün aralıklarla 2 ml., 5 ml. ve 5ml. ilk aşılama 3 hafta sonra 5 ml. miktarında kas içi, meme derisi ve deri atlı yolla aşılama yapılmıştır. Aşılı hayvanlardan birer ay ara ile kan alınmış ve çabuk lam aglutinasyonla antikor düzeyleri saptanmıştır.

Gerek aşılı tavşanlar gerekse keçilerin 8-10 aya kadar 1/4 - 1/32 oranında titre gösterdikleri belirlenmiştir. Epürasyon denemeleri sonucunda tavşanların alüminyum hidroksitli bakterin aşısı ile 3 ve 6. ayda % 100, 8. ayda ise % 50 bir korunma sağladıkları halde

alüminyum hidroksitli bakterin + toksoid aşısında koruma 3 ve 6. aylarda % 50, ve 8. ayda da + 0 olmuştur.

Alüminyum hidroksitli bakterinle aşılanan keçilerin epürvasyonunda kas içi yolla aşılanan keçilerin % 80 korundukları, meme derisi altı ve subkutan aşılanan hayvanlarda ise tam bir korunma sağlandığı görülmüştür. Kontrol hayvanların tümünde de korunma sağlanmadığı saptanmıştır.

### S U M M A R Y

In this survey, with the aim of preparing an efficient vaccine 128 Staph. aureus strains were isolated and identified from cows with 15 clinical and 985 subclinical mastitis respectively. 4 strains, which were B-haemolytic, coagulase, lactose and mannitole positive, egg yolk fraction positive and found to be included in Bovine 117 group by bacteriophage grouping were used in the preparation of this vaccine. Aluminium hydroxide adsorbed bacterine and bacterine + toxoid vaccines possessing the combination of these strains were prepared.

3 weeks after the first vaccination in which 0,5 ml. of bacterine with Aluminium hydroxide and bacterine + toxoid was injected simultaneously, 1 ml. of the same vaccine was reinjected to rabbits subcutaneously. Goats were vaccinated 2 ml. and 5 ml. With 2 day interwals and 3 weeks after the first vaccination, they were injected 5 ml. subcutaneously to the vadder skin, intramuscularly and subcutaneously alone. Blood-samples were collected from the vaccinated animals with monthly interwals and their antibody titres were detected by slide agglutination method. It is noted that both the vaccinated rabbits and the goats show titres of 1/4 - 1/32 opto 8th - 10th months.

The challange studes stated that, bacterine with Aluminium hydroxide vaccines elicited 100 % and 50 % protection during 3rd and 6th, and 8th months respectively. While bacterine with Aluminium hydroxide + toxoid vaccine elicited 50 % during the 3rd and 6th months and so protection (0 %) was obtained during the 8th month.

In the challenge of goats which were vaccinated with bacterine adsorben to Aluminium hydroxide, the ones that received an intramuscularly vaccine had a protection of 80 %, but the ones that received either a subcutaneously to the vadder skin or a subcutaneously injection a lone had no sifnificanat protection. All the control animals also didn't have any significant protection.

## L İ T E R A T Ü R

- 1 — ALİBAŞOĞLU, M., DOĞANELİ, M.Z. ve KESKİNTEPE, H. (1969) : Süt ineklerinde mastitiserin insan ve hayvan sağlığı yönünden araştırılması, A.Ü. Vet. Fak. Derg. 16, 122-145.
- 2 — ANDERSON, J.C. (1978) : The problem of immunization against Staphylococcal mastitis, Br. Vet. J. 134, 412-420.
- 3 — ARDA, M. ve İSTANBULLUOĞLU, E. (1979) : Mastitislere sebep olan earob ve anaerob, Mycoplasma ve mantarların izolasyonu, bunlara karşı etkili olan antibiyotik ve fungusitlerin saptanması, VHAG-Proje No: 254, TÜBİTAK.
- 4 — ARDA, M. ve İSTANBULLUOĞLU, E. (1980) : Mastitislere sebep olan aerobik, mikroaerofilik, anaerobik bakterilerin izolasyon ve identifikasyonu üzerinde çalışmalar. VHAG-Proje No. 304, TÜBİTAK.
- 5 — AYDIN, N. ve COŞKUNER, M.R. (1981-1983) : Ankara bölgesinde klinik ve subklinik mastitislere neden olan aerobik mikroorganizmaların ve mantarların izolasyon, identifikasyon ve antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının saptanması üzerinde çalışmalar. Etlik Vet. Mikrobiyol. Enst. Derg., 5 (4-5), 7-28.
- 6 — BATU, A., DURAK, Ö. ve FIRAT, G. (1979) : Marmara ve Trakya bölgesi ineklerinde klinik ve subklinik mastitisle rve etkenleri ile bu etkenlerin antibiyotiklere duyarlılıklarının tesbiti üzerinde araştırma, Pendik Vet. Mikrobiyol. Enst. Derg. 1, 25-40.
- 7 — BATU, A. ve FIRAT, G. (1981) : Trakya ve Marmara bölgesinde koyunlarda klinik ve subklinik mastitiser ve etkenleri üzerine araştırma. VHAG-Proje No. 456, TÜBİTAK.
- 8 — BLOBEL, H. and BERMAN, D.T. (1962) : Vaccination of dairy cattle against Staphylococcic mastitis. Am. J. Vet. Res. 23, 7-14.
- 9 — BROCK, J.H., STEEL, E.D. and REITHER, B. (1975) : The effect of intramuscular and intramammary vaccination of cows on antibody levels and cal cell-toxoid vaccine, Res. Vet. Sci. 9, 416-423.  
resistance to intramammary infection by Staphylococcus aureus, Res. in Vet. Sci. 19, 152-158.

- 10 — COLDITZ, I.G. and WATSON, D.L. (1982) : Effect of immunisation on the early influx of neutrophils during Staphylococcal mastitis in ewes. Res. in Vet. Sci. 33, 146-151.
- 11 — DERBTSHIRE, J.B. (1960) : Studies in immunity to experimental Staphylococcal mastitis in the goat and cow. J. Path. 70, 222-231.
- 12 — DERBYSHIRE, J.B. (1960) : Experimental studies on the occurrence of Staphylococcal antitoxin in the whey of cows. Res. Vet. Sci. 1, 350-354.
- 13 — DERBYSHIRE, J.B. and HELLIWELL, B.I. (1962) : Immunity to experimental Staphylococcal mastitis in goats produced by alpha lysin, coagulase and leucocidin. Res. Vet. Sci., 3, 56-62.
- 14 — GILLESPIE, W.A. and ALDER, V.G. (1952) : Production of the opacity in egg yolk media by coagulase positive Staphylococci. J. Pathol. Bacterial. 64, 187-200.
- 15 — ÊEL JACSZEWICZ, J. et all (1976) : Staphylococci and Staphylococcal diseases Gustav Fisher Verlag, Stuttgart-Newyork.
- 16 — KORNITZER, R.T. and WINKLER, M. (1975) : Immunization of mice with Staphylococcus aureus isolated from case of ovine mastitis. Refuah Vet. 32, 125-136.
- 17 — LEE, C.S. and FROST, A.J. (1970) : Mastitis in Slaughtered dairy cows. 1— Udder Infection. Aust. Vet. J., 46, 201-203.
- 18 — UOLTE, F.S. and KAPRAL, F.A. (1981) : Immunogenicity of Staphylococcus aureus delta-toxin. Inf. and immun. 31, 1251-1260.
- 19 — OUTERIDGE, M.P., WILLIAMS, R. and LASCELLES, K.A. (1968) : Local immunity in the mammary gland following the infusion of a Staphylococcus aureus.
- 20 — ÖKTEM, B. ve ANTEPLİOĞLU, H. (1962) : Ankara bölgesi ineklerinde görülen mastitisin tedavisi üzerindeki mukayeseli incelemeler. A.Ü. Vet. Fak. Yay. No: 85.
- 21 — PARGAONKER, V.N. et all (1962) : Phage typing of Staphylococcus aureus associated with case of bovine mastitis. Am. J. Vet. Res. 23, 1205-1212.
- 22 — POUTREL, B. (1982) : Susceptibility to mastitis: A review of factor related to the cow. Ann. Rech. Vet., 13, 85-99.
- 23 — WATSON, D.L. and LEE C.G. (1978) : Immunity to experimental Staphylococcal mastitis comparasion of live and killed vaccines. Aust. Vet. J., 54, 374-378.