



ARAŞTIRMA MAKALESİ

Süt inekleri için hazırlanan kombine mastitis aşılarının farelerde etkinliğinin belirlenmesi

H. Hüseyin Hadimli¹, Zafer Sayın¹, Kürşat Kav¹,
Osman Erganiş¹, Hülya Türütoğlu²,
Dursun Ali Dinç³

¹Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ²Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Veteriner Fakültesi, Selçuk Üniversitesi, 42075, Konya,

³Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Veteriner Fakültesi, Mehmet Akif Üniversitesi, Burdur, Türkiye

Geliş: 02.04.2013, Kabul: 07.06.2013

*hhadimli@selcuk.edu.tr

Özet

Hadimli HH, Sayın Z, Kav K, Erganiş O, Türütoğlu H, Dinç DA. Süt inekleri için hazırlanan kombine mastitis aşılarının farelerde etkinliğinin belirlenmesi. *Eurasian J Vet Sci*, 2013, 29, 3, 163-170

Amaç: Bu çalışmada, farklı bakteriyel mastitis (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* ve *Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes*) etkenlerine karşı kombine aşı geliştirilmesi, farelerde aşılamanın humoral bağışıklık üzerine etkinliğinin ve çelinc denemelerine karşı hastalık ve ölüm oranlarının belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Süt ineklerinde klinik ve subklinik mastitislerden izole edilen *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* ve *Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes* suşlarından iki farklı kombine mastitis aşısı (Ginseng ekstraktı, alüminyum hidroksit jelli veya mineral yağlı) hazırlandı. Gebe fareler, doğumdan önce 5 gün aralıkla 2 kez alüminyum hidroksitli veya mineral yağlı kombine mastitis aşıları ile aşılandı. Kan örnekleri doğumdan sonra 10. gün alındı. Her bir bakteriyel etken için ELISA kitleri hazırlandı ve antikor titreleri ELISA ile ölçüldü.

Bulgular: Aşılanan farelerin tümünün serumlarında her bir etken için antikor titreleri kontrollere göre oldukça yüksekti. Doğumdan 20 gün sonra, çelinc denemeleri için canlı patojen *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Str. agalactiae*, *C. bovis* ve *T. pyogenes* etkenleri farelere verildi. Fareler 20 gün boyunca hastalık oluşumu ve ölüm yönünden gözlemlendi. Aşılannmış fare gruplarının hiçbirinde hastalık ve ölüm şekillenmedi.

Öneri: Mastitise sebep olan farklı bakteriyel etkenlerden hazırlanan kombine mastitis aşılarının farelerde etkili olduğu bulundu.

Anahtar kelimeler: Mastitis, aşı, fare, süt ineği, bakteriyel etken

Abstract

Hadimli HH, Sayın Z, Kav K, Erganiş O, Turutoglu H, Dinc DA. Determination of effectiveness of combined mastitis vaccines prepared for dairy cows in mice. *Eurasian J Vet Sci*, 2013, 29, 3, 163-170

Aim: In this study, the development of combined mastitis vaccines for different bacterial mastitis agents (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* and *Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes*), the determination of effectiveness of vaccination on humoral immunity and the ratio of morbidity and mortality against challenge trials in mice was aimed.

Materials and Method: Two combined mastitis vaccines (with ginseng extract, aluminium hydroxide or mineral oil adjuvants) were prepared strains of *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Str. agalactiae*, *C. bovis* and *T. pyogenes* isolated from clinical and subclinical mastitis cases in dairy cows. Mice were vaccinated twice at interval 5 days before parturition by combined mastitis vaccine with aluminum hydroxide or mineral oil. Blood samples were taken at 10th days after second vaccination. ELISA kits for each mastitis agents were prepared and the antibodies titers were measured by ELISA in samples.

Results: The levels of antibodies for each agents in sera of all vaccinated mice were significantly higher than that of controls. *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Str. agalactiae*, *C. bovis* and *T. pyogenes* were administered to mice for challenge trials at 10th days after second vaccination. Mice were observed for 20 days for determination of occurrence of morbidity and mortality. No mortality and morbidity were occurred in all vaccinated mice.

Conclusion: Combined mastitis vaccines prepared by different bacterial agents causing mastitis were found to be effective in mice.

Keywords: Mastitis, vaccine, mice, dairy cow, bacterial agents



Giriş

Mastitis, öncelikle bakteriyel etkenlerin oluşturduğu meme yangısıdır ve süt ineklerinde ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Aynı zamanda, laktasyonun tüm dönemlerinde süt üretiminde azalmaya ve sürüden hayvanların ayrılmasında artışa neden olur (Barkema ve ark 2006, Nyman 2007). Mastitis oluşturan başlıca etkenler *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Str. dysgalactiae*, *Str. agalactiae* ve *Escherichia coli*'dir. Farklı patojenlerin oluşturduğu enfeksiyonların sıklığı ülkeden ülkeye değişebilmektedir. Hastalık etkenlerinin polimikrobiyal dağılım göstermesi, hayvan-çevre ilişkisi ve kötü yönetim gibi çeşitli faktörler mastitisin eradikasyonunu imkansız hale getirmektedir (Alaşam ve ark 1989, Ateş ve ark 1991). Yavruların beslenmesi ve insan sağlığı açısından enfekte hayvanların sütünün kullanılması sakıncalı olduğundan mastitisle mücadelede hayvanların korunması ön plana çıkmaktadır (Philpot ve Nickerson 1991, Dinç ve ark 1992, Duijkeren ve ark 2004, Guler ve ark 2005).

S. aureus mastitisleri süt hayvanlarının en önemli problemi- dir. Klinik mastitislerin %60-65'ini ve subklinik mastitislerin %80-85'ini stafilokoklar oluşturmaktadır (Nizamlioğlu ve ark 1989, Ateş ve ark 1991, Erganiş ve ark 1993, Fox ve Gay 1993, Erganiş ve ark 1995). *S. aureus*'un sebep olduğu subklinik mastitislerde süt üretiminde kayıp, süt ve süt ürünlerinin kalitesinde bozulma meydana gelmektedir (Degraeves ve Fetrow 1993, Jones 1993). Konakçı savunma mekanizmalarından kaçabilme yeteneklerinin bulunması ve bakteriye ait çeşitli virulens faktörlerine sahip olması nedeniyle *S. aureus* mastitislerin kontrolü oldukça güçtür. Koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) ikincil mastitis patojenleri olarak değerlendirilmektedir. Çünkü KNS'lar daha hafif ve çoğunlukla subklinik mastitis oluşturmaktadır (Erganiş ve ark 1995, Pengov 2001, Zadoks ve Watts 2009). Birçok ülkede yaygın mastitis oluşturan etkenler olmaya başlamasından dolayı KNS'ların önemlerinin yeniden değerlendirilmesi gerekmektedir (Pyörala ve Tanopen 2008). *Str. agalactiae* çok bulaşıcı ve çoğunlukla hayvan bakıcıları tarafından tespit edilemeyen subklinik mastitise sebep olmaktadır. Dolayısıyla süt verim kayıtlarının incelenmesi sonucu süt verimindeki azalma ile teşhis edilebilmektedir (Meiri-Bendek ve ark. 2001, Merl ve ark 2003). Mastitis vakalarından izole edilen *Corynebacterium ssp.* türlerinin patojenik potansiyelleri fazla dikkate alınmamış ve belli başlı türler dışında identifikasyonu yapılmamıştır (Nizamlioğlu ve ark 1989, Ateş ve ark 1991, Hommez ve ark 1999, Huxley ve ark 2003, Hadimli ve ark 2006). Mastitis olgularından en fazla izole edilen *Corynebacterium ssp.* türleri *C. bovis*, *C. pseudotuberculosis* ve *Arcanobacterium pyogenes* olarak belirtilmiştir (Watts ve Rossbach 2000, Watts ve ark 2000). *Trueperella pyogenes*, önceleri *Arcanobacterium pyogenes*, *Corynebacterium pyogenes*, *Actinomyces pyogenes* olarak isimlendirilen fırsatçı bir patojendir (Silva ve ark 2008, Hadimli ve ark 2010). Etken, mastitis, atıklar, pyometra, artritis, orşitis vakalarından, evcil hayvanların ve kanatlıların ayak apselerinden tek başına ya da karışık kültürler ola-

rak izole edilebilmektedir (Watts ve ark 2000, Nolte ve ark 2001, Jost ve Billington 2005).

Ginseng, Asya ülkelerinde uzun yıllardan beri kullanılan Panax ginseng C.A. Meyer (Araliaceae) kökünden elde edilen bir ekstraktır. Ginsengin kuru ekstraktında bir çeşit saponin olan ginsenosidler, kimyasal olarak da tri-terpenoid glikozidler belirlenmiştir. Aslında, ginseng daha çok enfeksiyonlara karşı doğal direnci artırmak için immünmodulator olarak önerilmektedir (Hu ve ark 2003, Rivera ve ark 2003).

Bu çalışmada, Türkiye'de farklı ticari süt işletmelerindeki klinik ve subklinik mastitisli süt ineklerine ait süt örneklerinden izole edilen *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Str. agalactiae*, *C. bovis* ve *T. pyogenes* suşlarından kombine mastitis aşılarını (ginseng ilaveli aliminyum hidroksit ve mineral yağlı kombine) geliştirmek ve farelerde etkinliklerini (kan serum örneklerinde antikor titreleri ölçmek ve koruma testlerinde mikrobiyolojik yoklamaları) belirlemek amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Hayvan materyali

Mikroorganizmaların patojenitelerinin belirlenmesi için (seçilen her bir bakteri suşu için 10'ar adet) 6-8 haftalık ve aşuların etkinlik denemeleri için (her bir aşı için 10'ar adet) ise 12-14 haftalık Swiss albino beyaz fareler kullanıldı. Bu çalışma Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Etik Kurulu'nun 26.04.2005 tarih ve 2005/010 nolu kararı ile "Etik Kurul Yönergesi" ilkelerine uygundur.

Bakteriler

Aşı antijenlerinin ve ELISA kitlerinin hazırlanmasında kullanılan *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Str. agalactiae*, *C. bovis* ve *T. pyogenes* suşları subklinik ve/veya klinik mastitisli süt ineklerinin süt örneklerinden izole edildi. *S. aureus* izolatları katalaz, koagülaz, hemoliz ve diğer biyokimyasal özelliklerine, koagülaz geni (coa gen), spa geni ve rRNA spacer typing moleküler özelliklerine göre seçildi (Lipman ve ark 1996, Annemuller ve ark 1999, Raimundo ve ark 1999, Karahan ve Çetinkaya 2004). *S. epidermidis*, *Str. agalactiae*, *C. bovis* ve *T. pyogenes* izolatları kültürel ve biyokimyasal özelliklerine göre seçildi (Erganiş ve ark 1995, Devriese ve ark 1999, Hommez ve ark 1999). *T. pyogenes* izolatu plo geni spesifik primerler kullanılarak PCR ile doğrulandı (Hadimli ve ark 2010).

Aşı antijenlerinin üretilmesi

S. aureus ve *S. epidermidis*'in üretilmesi: *S. aureus* ve *S. epidermidis* suşları Brain-Heart Infusion Broth'a (BHI) ekildi ve 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Üreyen kültür 5000 rpm'de 30'ar dk santrifüjle toplandı ve FTS ile 3 kez yıkandı. Bakteriyel konsantrasyonları 1.2x10⁹ bakteri/mL dozunda hazırlandı ve formalin (%0.5) katılarak inaktive edildi (Nickerson





ve ark 1993, Calzolari ve ark 1997, Hadimli ve Erganiş 2001, Hadimli ve ark 2005).

Str. agalactiae, *C. bovis* ve *T. pyogenes*'in üretilmesi: *Str. agalactiae*, *C. bovis* ve *T. pyogenes* suşları Todd-Hewitt Broth'a ekildi ve 37 °C'de 48 saat inkübe edildi. Üreyen kültürler 10000 rpm'de 30 dk santrifüjle toplandı ve FTS ile 3 kez yıkandı. Bakteri konsantrasyonları 1.2×10^9 bakteri/mL dozunda hazırlandı ve formalin (%0.5) katılarak inaktive edildi (Devriese ve ark 1999, Hommez ve ark 1999, Hadimli ve ark 2010).

Etkenlerin patojenitelerinin belirlenmesi

Seçilen *S. aureus* (10 adet), *S. epidermidis* (1 adet), *Str. agalactiae* (1 adet), *C. bovis* (1 adet) ve *T. pyogenes* (1 adet) izolatlarının farklı konsantrasyonları (1×10^7 , 1×10^8 ve 1×10^9 bakteri/mL) 10'ar fareye kas içi yolla verildi. Fareler, farklı klinik semptomlar (artrit, halsizlik, vb) ve ölüm yönünden 20 gün boyunca gözlemlendi (Honkonen-Buzalski ve ark 1985, Leitner ve ark 2003a).

Aşıların hazırlanması

S. aureus, *S. epidermidis*, *Str. agalactiae*, *C. bovis* ve *T. pyogenes* aşı antijenleri eşit oranlarda karıştırıldı. Kombine mastitis antijenleri %4 alüminyum hidroksit jeli veya eşit oranda mineral yağlı adjuvantla (Montanid ISA 50) ile karıştırıldı (Hadimli ve Erganiş 2001, Hadimli ve ark 2005). Ayrıca, alüminyum hiksoksit jelli aşıya 4 mg/mL Ginseng ekstraktı ilave edildi.

Hazırlanan aşıların saflık ve sterilite testleri

Kombine mastitis aşı materyalleri (1 mL) kanlı agar, MacConkey agar, sabouroud dextrose agar, mikoplazma agara ekimleri yapıldı. Aşıların mikrobiyolojik saflık ve sterilite (aerobik, mikroaerofilik ve anaerobik bakteriler ile mikoplazma ve mantar yönünden) kontrolleri yapıldı (Hadimli ve Erganiş 2001, Hadimli ve ark 2005).

Hazırlanan aşıların zararsızlık testi

Kombine mastitis aşısı 8'er fareye periton içi ve deri altı yolla verildi ve aşılamadan sonraki 10 gün boyunca hastalık (lokal reaksiyon, ateş, apse, anafilaksi, vb) ve ölüm yönünden gözlemlendi (Hadimli ve Erganiş 2001, Hadimli ve ark 2005).

İndirek ELISA

Aşı antijenlerine karşı şekillenen antikorlar, her etken (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *Str. agalactiae*, *C. bovis*, *T. pyogenes*) için ayrı ayrı geliştirilen modifiye ELISA kitleri ile ölçüldü. Ön çalışmalarda antijen, serum ve konjugatın optimal sulandırılmalarının standardizasyonu yapıldı. Farelerin kan serumları 1/200 oranında sulandırıldı. Mikropleytlere *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Str. agalactiae*, *C. bovis* ve *T. pyogenes* anti-

jenleri ile kaplandı. Immulon II mikropleytlere (Nunc C bottom Immunplate 96 well, 446612) karbonat-bikarbonat buffer solüsyonda (pH 9.6) homojenize edilen 100 µL antijen (her bir antijenin protein miktarları belirlendi) konuldu, 37 °C'de 1 saat ve +4 °C'de 24 saat inkübe edildi. Mikropleytlere fosfat buffer solüsyonu (PBS-T; 0.15 M NaCl, %0.05 Tween 20, pH 7.2) ile 3 kez yıkandı. Daha sonra spesifik olmayan bağlanmaları önlemek amacıyla 100 µL %3'lük sığır serum albümin (BSA) kondu, 37 °C'de 1 saat inkübe edildi ve 3 kez PBS-T ile yıkandı (Leitner ve ark 2003a, Leitner ve ark 2004b). Sulandırılmış kontrol ve test serumlarından 100 µL alınarak mikropleyitin ilgili gözlemlere ilave edilerek 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Pleytlere 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı. Anti-mouse IgG HRP0 ile işaretlenmiş konjugat (goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugate, 1:8000, whole molecule, Sigma A 4416, St. Louis, MO, USA) 1/10000 oranında örnek sulandırma solüsyonu ile sulandırıldı, mikropleyitin tüm gözlemlere 100 µL ilave edildi ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Pleytlere 3-5 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı. Tüm gözlemlere 100 µL fosfat-sitrat buffer (phosphate-citrate buffer with sodium perborate capsules, Sigma, St. Louis, MO, USA)'da taze hazırlanan δ-Fenildiamin (δ-Phenylenediamine Tablets, Sigma, St. Louis, MO, USA) kondu. Stop solüsyonundan (2M H2SO4) 100 µL ilave edilerek ELISA okuyucusunda 450 nm'de mikropleytlere optik dansite değerleri (OD) okutuldu (Leitner ve ark 2003a, Leitner ve ark 2003b, Hadimli ve ark 2005).

Farelerin aşılınması

Stafilokokkal ve kombine mastitis aşısının immünolojik etkinlikleri gebe farelerde (12-14 haftalık) belirlendi. Her bir mastitis aşısı için 10'ar (40 fare) ve kontrol grubu için 10 fare kullanıldı. Gebe fareler doğum öncesi 5'er gün arayla deri altı veya kas içi yolla 0.1 mL dozunda 2 kez aşılandı (Leitner ve ark 2003b).

Hazırlanan aşıların koruma/çelinc denemeleri

Patojenitesi bilinen ve aşı antijenleri olarak kullanılan canlı *S. aureus* (1×10^7 bakteri/mL), *S. epidermidis* (1×10^7 bakteri/mL), *Str. agalactiae* (1×10^8 bakteri/mL), *C. bovis* (1×10^9 bakteri/mL) ve *T. pyogenes* (1×10^7 bakteri/mL) izolatlarının farklı konsantrasyonları ile aşıları fareler doğumları takiben çelinc yapıldı. Fareler, farklı klinik semptomlar (artrit, halsizlik, mastitis, vb) ve ölüm yönünden 20 gün boyunca gözlemlendi (Leitner ve ark 2003a).

Mikrobiyolojik muayene

Aşılanan ve canlı etkenlerle çelinc yapılan fareler öldükten veya uyutulduktan sonra iç organlarından ekimler yapılarak, çelinc denemeleri yapılan mikroorganizmaların tekrar izolasyon oranları tespit edildi (Hadimli ve ark 2005).

İstatistiksel analizler



SPSS ile gruplar arasındaki farklılığın belirlenmesinde varyans analizi, farklılıkların önem düzeyinin belirlenmesi için Tukey çoklu karşılaştırma testi yapıldı. İstatistiki önem sınırı olarak $p < 0.05$ değeri kabul edildi.

Bulgular

Aşılı farelerin kan serumlarındaki antikor titreleri

Aşısız farelere göre mastitis aşları ile aşıl原因an farelerin kan serumlarının 1/200 sulandırılmalarında her bir aşı antijenine karşı antikorlar şekillendiği tespit edildi. OD değerleri karşılaştırıldığında, en yüksek değer mineral yağ adjuvantlı kombine mastitis aşısında ve *S. aureus* antijenlerine karşı şekillendiği gözlemlendi (Tablo 1).

Aşılı farelerde mastitis aşlarının koruma düzeyleri

Kontrol grubunda mastitis antijenleri verilen farelerin iç organlarından tüm etkenler tekrar izole edildi. Bununla birlikte, her iki kombine aşı ile aşıl原因an ve çelinc yapılan farelerin iç organlarından *S. epidermidis* ve *C. bovis* geri izolasyonu yapılmazken, *Str. agalactiae* sadece Al(OH₃)'li kombine aşılı bir farenin akciğerinden tekrar izole edildi. Ayrıca, kontrol grubundaki farelere göre düşük olmakla birlikte, aşılı gruplarda-

ki farelerin iç organlarından *S. aureus*'un geri izolasyonu yapıldı. Her iki kombine aşı ile aşıl原因an farelerin iç organlarından *T. pyogenes*'in tekrar izolasyonu yapılırken, kontrol grubundaki hayvanlara göre mineral yağlı mastitis aşı grubunda daha düşük bulunurken alüminyum hidroksit grubu farelerde ise daha yüksek tespit edildi (Tablo 2).

Mastitis aşı etkenleri ile çelinc yapılan farelerde hastalık ve ölüm gözlenirken her iki kombine mastitis aşları ile aşıl原因an farelerde aşıl原因a sonrası 20 gün boyunca herhangi bir hastalık ve ölüm gözlenmedi (Tablo 3). Sadece alüminyum hidroksit adjuvantlı mastitis aşısı ile aşıl原因an ve çelinc yapılan farelerin 2'sinde canlı etkenlerin verilmesinden kısa bir süre sonra ölüm gözlemlendi ve aşırı duyarlılık reaksiyonu olarak değerlendirildi.

Tartışma

Mastitis, bir veya daha fazla mikroorganizma ile meme bezinin yangısının sebep olduğu klinik semptomların bir kombinasyonudur (Barkema ve ark 2006, Nyman 2007). Mastitislere karşı aşıl原因a üzerine iyimser raporlar olmasına rağmen, süt ineklerini mastitislerden bütünüyle koruyan hem hücresel hem de humoral cevap oluşturan bir aşı yoktur (Nicker-son ve ark 1993, Calzolari ve ark 1997, Hadimli ve Erganiş

Tablo 1. Kombine mastitis aşları ile aşıl原因an farelerin serumlarında antikor titreleri.

	Mineral Yağlı	Al(OH) ₃ Adj.	Kontrol
<i>S. aureus</i>	2.443±0.111 ^{a,A}	2.195±0.224 ^{a,A}	0.192±0.230 ^{b,A}
<i>S. epidermidis</i>	1.700±0.259 ^{a,B}	1.336±0.180 ^{a,C}	0.145±0.016 ^{b,A}
<i>Str. agalactiae</i>	1.928±0.067 ^{a,AB}	1.698±0.236 ^{a,B}	0.122±0.017 ^{b,A}
<i>C. bovis</i>	2,136±0.128 ^{a,A}	1.829±0.278 ^{a,AB}	0.147±0.028 ^{a,A}
<i>T. pyogenes</i>	1.224±0.085 ^{a,C}	0.835±0.070 ^{b,D}	0.135±0.019 ^{c,A}

Aynı satır (a, b, c) ve sütundaki (A, B, C, D) farklı harf taşıyan gruplar arası farklılıklar önemlidir ($P < 0.01$).

Tablo 2.

Patojen *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. agalactiae*, *C. bovis* ve *T. pyogenes* suşları ile çelinc yapılan aşılı farelerde mikrobiyolojik sonuçları.

İç organlar	Mineral Yağlı					Al(OH) ₃ Adj.					Kontrol				
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Str. agalactiae</i>	<i>T. pyogenes</i>	<i>C. bovis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Str. agalactiae</i>	<i>T. pyogenes</i>	<i>C. bovis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Str. agalactiae</i>	<i>T. pyogenes</i>	<i>C. bovis</i>
Karaciğer	0/10*	0/10	0/10	1/10	0/10	4/10	0/10	0/10	3/10	0/10	6/10	7/10	3/10	4/10	5/10
Dalak	4/10	0/10	0/10	2/10	0/10	3/10	0/10	0/10	5/10	0/10	4/10	3/10	4/10	5/10	5/10
Kalp	4/10	0/10	0/10	1/10	0/10	3/10	0/10	0/10	4/10	0/10	2/10	1/10	0/10	1/10	0/10
Böbrek	2/10	0/10	0/10	2/10	0/10	3/10	0/10	0/10	4/10	0/10	1/10	0/10	0/10	2/10	1/10
Akciğer	2/10	0/10	0/10	2/10	0/10	3/10	0/10	1/10	4/10	2/10	5/10	4/10	1/10	2/10	2/10
Toplam	12/50	0/50	0/50	8/50	0/50	16/50	0/50	1/50	20/50	0/50	18/50	15/50	8/50	14/50	13/50

*Etken tespit edilen fare sayısı/incelenen fare sayısı.



Tablo 3.

Patojen *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Str. agalactiae*, *C. bovis* ve *T. pyogenes* suşları ile çelinc yapılan aşıli farelerde ölüm ve hastalık düzeyleri.

	Mineral Yağlı					Al(OH) ₃ Adj.					Kontrol				
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Str. agalactiae</i>	<i>T. pyogenes</i>	<i>C. bovis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Str. agalactiae</i>	<i>T. pyogenes</i>	<i>C. bovis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Str. agalactiae</i>	<i>T. pyogenes</i>	<i>C. bovis</i>
Ölüm ^a	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	*2/10	0/10	0/10	0/10	0/10	5/10	5/10	4/10	5/10	4/10
Hastalık ^b	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	5/10	5/10	4/10	4/10	4/10

*Ölümler *S. aureus* suşları verildikten sonraki 1 saat içerisinde şekillendi, aKas içi bakteri verilmesi sonrası 20 gün boyunca ölen hayvan sayısı,
bKas içi bakteri verilmesi sonrası 20 gün boyunca enfekte olan hayvan sayısı.

2001). Bağışıklık oluşturularak sürü dirençliliğini artırmak ve mastitisin klinik etkilerini azaltmak için çeşitli tipte aşılarda geliştirilmiştir (Nickerson ve ark 1993, Calzolari ve ark 1997, Leitner ve ark 2003b, Buzzola ve ark 2006). Mastitislerin kontrolü için etkili aşı ve metodlarının geliştirilmesinde maliyetin/zararların azaltılması ve verimin artırılması ön planda tutulmalıdır (Philpot 1984).

Mastitisin kontrolünde; teşhis, ayırma, hijyen ve tedavi uygulamaları ile vaka sayısında tedrici bir azalma sağlanabilmektedir. Bununla birlikte, bu tür uygulamalar her zaman pratik olmayabilir ve maliyeti de pahalı olabilmektedir (Philpot 1984, Degraives ve Fetrow 1993). Bundan dolayı mastitise mücadelede alternatif uygulamalar (antibiyoterapi ve aşılama gibi) aranmaktadır. Antibiyotikler ve dezenfektanlar streptokokkal mastitislerin kontrolünde çok etkili olmasına rağmen *S. aureus*, *Arcanobacterium* ve Gram negatif bakterilerin kontrolünde daha az etkinliğe sahiptirler (Ziv 1995).

Son dönemlerde, *S. aureus*, *Str. agalactiae*, *Str. uberis*, *Str. dysgalactiae* ve *E. coli* mastitislerinin önlenmesi için birçok aşı üretilmiştir. Yapılan çalışmalar ümit verici olsa da sınırlı bir etkiye sahip oldukları belirtilmiştir (Gonzales ve ark 1989, Nickerson ve ark 1993, Calzolari ve ark 1997, Hadimli ve Erganiş 2001, Hu ve ark 2003, Leitner ve ark 2003b, Buzzola ve ark 2006, Pereira ve ark 2011). Moleküler biyoloji ve genetik alanındaki ilerlemeler, sığır immün sistemi ve meme bezinin savunma mekanizmalarındaki yeni gelişmeler aşı ve aşılama lehine yeni çalışmalara sevk etmektedir. Aşılama karşı oluşan bağışıklık tür spesifik olabilmekle beraber işletme spesifik yada bölgesel farklılıklar aşının etkinliğinde önemli olabilmektedir (Barkema ve ark 2006). Otojen aşılarda, bireysel, kronik yada tekrarlayan enfeksiyonlarda sürünün tedavisi için hastalığa sebep olan mikroorganizma(lar) dan hazırlanan aşılardır. Otojen aşılarda veteriner hekimlikte yaygın kullanılmasına rağmen, verilmelerinden sonra aktive olan immünolojik etki mekanizması gibi aksiyon mekanizmaları yeterince incelenmemiştir (Hadimli ve ark 2012).

Fare ve diğer sığırlarda klinik semptomlar arasında farklılıklar olmasına rağmen fare modeli hastalık vakalarından izole edilen izolatlarının virulenslerinin değerlendirilmesinde faydalı olabilmektedir (Leitner ve ark 2003a, Hadimli ve ark 2011). Sığır mastitis vakalarından izole edilen etkenler fare modelinde çelinc denemelerinde kullanıldığı gibi bir aşıda aşı tohumu olarak ta kullanılabilirler (Leitner ve ark 2003b). Leitner ve ark (2003a) sığır mastitislerinden izole edilen *S. aureus* ve KNS suşlarının virulensini değerlendirmek için farelerde septik artritisi bir model olarak kullanmışlardır. Ayrıca, aynı modeli heterolog antikorlar ile çapraz korumayı değerlendirmek için de değerlendirmişlerdir. Virulenslerini belirlemek için *S. aureus* ve KNS suşlarının seri bakteriyel dozları farelere kas içi verilmiş ve 20 gün boyunca artritisi, gangren ve ölüm yönünden gözlenmiştir. Test edilen suşlardan α -hemoliz yapan *S. aureus* suşunun en patojen olarak belirlendiğini, en az patojen olarak ta hemolizsiz *S. aureus* suşunun (test edilen KNS suşlarına göre daha patojen) olduğunu ve *S. aureus* izole edilen farelerin hepsinde 3 *S. aureus* suşuna karşı da ELISA ile antikor tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Homolog ve heterolog suşlar ile çelinc öncesi α veya $\alpha+\beta$ pozitif suşların düşük dozda inokulasyonu farelerde koruma sağladığını ifade etmişlerdir. Ancak 2 β suşların kısmi koruma sağladığını da bildirmişlerdir. Bununla birlikte, hemolizsiz *S. aureus* ve KNS suşları herhangi bir koruma gerçekleştirememişlerdir. Sonuçlar göstermiştir ki, çelinc öncesi farelere *S. aureus* suşlarının düşük dozlarının inokulasyonu bile koruma sağlayabilmekte ve üretilen antikorlar önemli bir koruyucu rola sahip olabilmektedir.

Bu çalışmada, antijen kaynağı olarak seçilen subklinik mastitis vakalarından izole edilen bakterilerin hepsinin farelerde yapılan patojenite denemelerinde patojen oldukları tespit edildi. Mastitis etkenlerinin farklı konsantrasyonları ile yapılan denemelerinde *S. aureus*'ün %80-100, *S. epidermidis*'in %90, *Str. agalactiae*'nin %60, *C. bovis*'in %40 ve *T. pyogenes*'in %90 oranlarında ölüm yaptıkları gözlemlendi. Patojenite denemelerinde belirlenen yaklaşık LD50 değerlerine göre masti-



tis etkenleri ile çelınç denemeleri yapılmıştır. Fare modeli, etkenlerin patojenitelerinin belirlenmesi ve çelınç denemelerinin yanı sıra aşı denemelerinde (spesifik antikor üretiminin ve korumanın değerlendirilmesinde) de kullanılabilir. *S. aureus* suşundan hazırlanan mastitis aşısı ile aşılama farelerin homolog ve heterolog *S. aureus* suşları ile çelınç denemelerinde geniş spektrumlu antijenik ve immünojenik özellikleri gösterdiği belirtilmektedir (Leitner ve ark 2003b, Hadimli ve ark 2007). Leitner ve Krifucks (2007) koyun ve keçi sürülerinde sporadik olarak *Pseudomonas aeruginosa* mastitis vakaları ile karşılaştıklarını ve seçtikleri izolatlardan monovalan ve bivalan bakterin aşı hazırladıklarını bildirmişlerdir. Monovalan bakterin aşılama ile aşılama farelerde sadece homolog çelınca karşı koruma gerçekleşirken, bivalan aşı ile aşılama farelerde hem homolog hem de heterolog koruma gözlemlendiği ifade edilmiştir. Ayrıca, seçtikleri izolatların patojenitelerini ve LD50 değerlerini belirlediklerini ve keçiden izole edilen suşun daha patojen olduğunu bildirmişlerdir. Monovalan ve bivalan bakterin aşılama sonrasında antikorlar sentezlendiği, monovalan aşılama ile aşılama farelerde iki izolat arasında çapraz reaksiyonların düşük olduğu ve monovalan aşılama ile aşılama farelerde izolatlar karşı şekillenen antikorlar ile bivalan aşılama ile aşılama farelerdeki antikor değerleri arasında fark olmadığı belirtilmiştir. Ayrıca, bivalan aşılama ile aşılama farelerde mortalite oranı %0-30 iken, farklı izolatlardan herhangi biri ile yapılan çelınç sonrasında ise ölüm oranı %75'in üzerinde olduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada, mineral yağlı ve alüminyum hidroksit jelli kombine mastitis aşısı ile aşılama farelerde patojen *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Str. agalactiae*, *C. bovis* ve *T. pyogenes* suşları ile yapılan çelınç denemelerinde; ölüm ve hastalık düzeylerine karşı %100 bir koruma elde edildi. Alüminyum hidroksitli kombine mastitis aşısı ile aşılama farelerde, *S. aureus* suşu ile çelınç sonrası 1 saat içerisinde 2'sinin ölmesi, mikroorganizma kaynaklı olmasından ziyade bir aşırı duyarlılık reaksiyonu olduğu kanaatine varıldı. İnaktif *T. pyogenes* aşısının deney hayvanlarında tam koruma sağlamasına (Hadimli ve ark 2012) rağmen konakçılarda yeterli koruma sağlandığı belirtilmektedir (Jost ve Billington 2005).

Farelerdeki zararsızlık ve toksisite kontrollerinde aşılama herhangi bir yan etkilerinin olmadığı görüldü. Hayvan davranışları dikkate alındığında, gözlem ve bulgulara göre aşılama ve adjuvantların hayvanlarda kullanılmasının sakıncası olmadığı kanaatine varıldı. Farelerde aşılama sonrası homolog mastitis etkenlerine yüksek titrede antikorların belirlenmesi ve koruma oranlarının yüksek olması aşılama etkinliklerinin bir sonucudur.

Aşılama sonrası şekillenen immün bağışıklığın daha yüksek ve uzun sürdürülmesi için aşı antijenler çeşitli adjuvantlar ile birlikte verilmektedir. Mineral yağlı adjuvantların aşı antijenlerinin daha geç emilimini ve kan/süt serum örneklerinde antikorların daha uzun süre kalmasını sağladıklarını bildirilmektedir (Guidry ve ark 1991, Watson ve Davies 1993).

Bununla birlikte, aşı antijenlerinin alüminyum hidroksit ve mineral yağ adjuvantları ile kombine edilmesinin şekillenen antikor titreleri arasında istatistiksel bir farklılık oluşturmamakla birlikte, mineral yağ adjuvantın antikorların daha uzun süre yüksek titrede kalmasını sağladığı belirtilmektedir (Hadimli ve Erganiş 2001).

Aşılar ginseng ekstraktı ilave edilmesinin, aşılama sonrası daha yüksek titrede antikorların oluşturduğunu ve alüminyum hidroksitli aşılama IgG1'in sentezini uyarırken, Ginseng ilaveli aşılama IgG2'nin sentezini sağladığını belirtmişlerdir (Hu ve ark 2003, Rivera ve ark 2003, Hadimli ve ark 2007). Süt ineklerinde Ginseng ekstraktı ve Rb1 ginsenoidini ile kombine edilen *S. aureus* bakterin ve ovalbuminin; tek başlarına verilmelerine göre daha yüksek titrede antikor belirlenmişlerdir. Sonuçta, saha denemelerinde, Ginseng ekstraktı ve Rb1 ginsenoidini adjuvant olarak mastitis aşılama katılması meme içi enfeksiyonlara karşı korunmada etkili olduklarını ifade etmişlerdir (Hu ve ark 2003).

Bu çalışmada, kombine mastitis aşısı ile aşılama fare kan serumlarında aşısız hayvanlara göre aşı antijenlerine karşı şekillenen antikorlar yüksek titrede tespit edildi. Alüminyum hidroksit jelli aşılama kontrol grubuna göre *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Str. agalactiae*, *C. bovis* ve *T. pyogenes*'e karşı oluşan antikorlar sırasıyla 11, 9,5, 14, 13 ve 6 kat daha yüksek bulundu. Mineral yağlı adjuvantlı aşılama ise kontrol grubuna göre *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Str. agalactiae*, *C. bovis* ve *T. pyogenes*'e karşı oluşan antikorlar sırasıyla 12, 12, 16, 15 ve 9 kat daha yüksek bulundu. Mineral yağlı adjuvantlı aşı ile oluşan antikor titrelerinin alüminyum hidroksit jelli aşı ile oluşan titreler göre daha yüksek olduğu gözlemlendi.

Öneriler

Klinik ve subklinik mastitislerden izole edilen *S. aureus*, *S. epidermidis*, *St. agalactiae*, *C. bovis* ve *T. pyogenes* izolatlarının patojen oldukları, hastalık ve ölüm oluşturdukları farelerde gösterilmiştir. Aynı suşlardan hazırlanan mineral yağlı ve ginseng ekstraktı ilaveli alüminyum hidroksit jelli kombine mastitis aşısı ile immünize edilen farelerde, homolog etkenlere karşı yüksek titrede antikor şekillendiği ve koruma sağlandığı belirlenmiştir. Fare modeli baz alındığında hedef hayvan olarak süt ineklerinde de kombine mastitis aşılama değerlendirilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

Teşekkür

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından desteklenen projenin (TÜBİTAK-TBAG 1050245) bir bölümüdür.

Kaynaklar

Alaçam E, Tekeli T, Erganiş O, İzgi C, 1989. İnek ve mandalarda subklinik mastitislerin tanısı, etkenlerin izolasyonu ve





- bunlara karşı etkili antibiyotiklerin belirlenmesi. Eurasian J Vet Sci, 5, 81-91.
- Annemüller C, Lammler C, Zschock M, 1999. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. Vet Microbiol, 69, 217-224.
- Ateş M, Erganiş O, Çorlu M, Serpek B, 1991. Konya yöresindeki mastitisli ineklerden elde edilen süt örneklerinin mikrobiyel florası ve LDH aktivitesi. Doğa. Tr Vet Animal Sci, 47, 152-157.
- Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN, 2006. Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. J Dairy Sci, 89, 1877-1895.
- Buzzola FR, Barbagelata MS, Caccuri RL, Sordelli DO, 2006. Attenuation and persistence of and ability to induce protective immunity to a *Staphylococcus aureus* aroA mutant in mice. Infect Immun, 74, 3498-3506.
- Calzolari A, Giraud JA, Rampone H, Odiern L, Giraud AT, et al., 1997. Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 1. Evaluation in two commercial dairy herds. J Dairy Sci, 80, 854-858.
- Degraves FJ, Fetrow J, 1993. Economics of mastitis and mastitis control. Vet Clin North Am Food Animal Pract, 9, 421-434.
- Devriese LA, Hommez J, Laeven H, Pot B, Vandamme P, Haesebrouck F, 1999. Identification of aesculin-hydrolyzing streptococci, lactococci, aerococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. Vet Microbiol, 70, 87-94.
- Diñç DA, Erganiş O, Acet A, Deme Ö, Traş B, Baş AL, 1992. Tardomyocel-L ile tedavi edilen subklinik mastitisli inek sütlerinde penisilin ve kloramfenikol kalıntılarının tespiti. Veterinarium, 3, 21-25.
- Duijkeren EV, Box ATA, Heck MEOC, Wanner WJB, Fluit AC, 2004. Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. Vet Microbiol, 103, 91-97.
- Erganiş O, Kaya O, Kuyucuoğlu Y, 1993. İnek mastitislerine sebep olan mikroorganizmalar ve antibiyotiklere duyarlılıkları. Türk Vet Hek Bir Derg, 5, 49-50.
- Erganiş O, Kuyucuoğlu Y, Ok Ü 1995. İnek ve koyun mastitislerine sebep olan koagulaz negatif ve pozitif stafilokokların biyotiplendirilmesi. Veterinarium, 6, 23-27.
- Fox LK, Gay JM, 1993. Contagious mastitis. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 9, 475-487.
- Gonzales RN, Cullor JS, Jasper DE, Farver TB, Bushnell RB, Oliver MN, 1989. Prevention of clinical coliform mastitis in dairy cows by a mutant *Escherichia coli* vaccine. Can J Vet Res, 53, 301-305.
- Guidry AJ, Oliver SP, Sguiggums KS, Erke EF, Dowlen HH, Hambleton CN, Berming M, 1991. Effect of anticapsular antibodies on neutrophil phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. J Dairy Sci, 74, 3360-3369.
- Guler L, Ok U, Gunduz K, Gulcu Y, Hadimli HH, 2005. Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. J Dairy Sci, 88, 3149-3154.
- Hadimli HH, Erganiş O, 2001. Süt ineklerinde stafilokokkal mastitisler için aşı çalışmaları. Eurasian J Vet Sci, 17, 9-19.
- Hadimli HH, Erganiş O, Kav K, Sayın Z, 2005. Evaluation of a combined vaccine against staphylococcal mastitis in ewes. Bulletin Vet Res Ins Pulawy, 49, 165-167.
- Hadimli HH, Erganiş O, Kav K, Sayın Z, 2006. Mastitisli inek sütlerinden izole edilen *Corynebacterium* türleri ve antibiyotik duyarlılıkları. Eurasian J Vet Sci, 22, 15-19.
- Hadimli HH, Erganiş O, Kav K, Sayın Z, 2010. Koyun ve sığır örneklerinden *Arcanobacterium pyogenes* izolasyonu ve polimeraz zincir reaksiyonu ile identifikasyonu. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 16, 611-616.
- Hadimli HH, Erganiş O, Kav K, Sayın Z, Sakmanoğlu A, Pınarkara Y, 2011. Determination of pathogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in mice. 3th East Mediterranean ICLAS Symposium & XV. ICLAS General Assembly, June 13-15, pp 71, Istanbul, Turkey
- Hadimli HH, Erganiş O, Sayın Z, Yıldırım B, 2007. Fare ve koyunlarda ginseng katılmış inaktif *Salmonella Typhimurium* aşılarının etkinliği. Eurasian J Vet Sci, 23, 17-24.
- Hadimli HH, Sayın Z, Pınarkara Y, Sakmanoğlu A, Temimhan MS, Erganiş O, 2012. Farelerde inaktif *Arcanobacterium pyogenes* aşılarının etkinliği. Eurasian J Vet Sci, 28, 133-137.
- Hommez J, Devriese LA, Vaneechoutte M, Riegel P, Butaye P, Haesebrouck F, 1999. Identification of nonlipophilic *Corynebacteria* isolated from dairy cows with mastitis. J Clin Microbiol, 37, 954-957.
- Honkonen-Buzalski T, Anderson JC, Bramley AS, 1985. The virulence of strains of *Corynebacterium bovis* in the mammary gland of the mouse and the effect of bacterial mastitis on subsequent infection with *Staphylococcus aureus*. British Vet J, 141, 519-528.
- Hu S, Concha C, Lin F, Waller KP, 2003. Adjuvant effect of ginseng extract on the immune responses to immunisation against *Staphylococcus aureus* in dairy cattle. Vet Immunol Immunopathol, 91, 29-37.
- Huxley JN, Gren MJ, Bradley AJ, 2003. *Corynebacterium bovis*-Friend or Foe? Proceedings of the British Mastitis Conference, Garstang, p: 23-34.
- Jones TO, 1993. Bovine mastitis bacteriology: Problems and pitfalls. Cattle Practice, 4, 55-57.
- Jost BH, Billington SJ, 2005. *Arcanobacterium pyogenes*: Molecular pathogenesis of an animal opportunist. Antonie van Leeuwenhoek, 88, 87-102.
- Karahan M, Çetinkaya B, 2004. Subklinik sığır mastitislerinden izole edilen koagulaz pozitif *Staphylococcus aureus* suşlarının moleküler tiplendirilmesi. VI. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, 14-16 Eylül, Elazığ.
- Leitner G, Krifucks O, 2007. *Pseudomonas aeruginosa* masti-



- tis outbreaks in sheep and goat flocks: Antibody production and vaccination in a mouse model. *Vet Immunol Immunopathol*, 119, 198-203.
- Leitner G, Krifucks O, Glickman A, Younis A, Saran A, 2003a. *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis: Virulence, antibody production and protection from challenge in a mouse model. *FEMS Immun. Med Microbiol*, 35, 99-106.
- Leitner G, Lubashevsky E, Trainin Z, 2003b. *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows, composition and evaluation of its immunogenicity in a mouse model. *Vet Immun Immunopathol*, 93, 159-167.
- Lipman LJA, Nijs A, Lam TJGM, Rost JA, Dijk LV, Schukken YH, Gastra W, 1996. Genotyping by PCR, of *Staphylococcus aureus* strains, isolated from mammary gland of cows. *Vet Microbiol*, 48, 51-55.
- Meiri-Bendek I, Lipkin A, Friedmann A, 2001. A PCR-based method for the detection of *Streptococcus agalactiae* in milk. *J Dairy Sci*, 85, 1717-1723.
- Merl K, Abdulmawjood A, Lammmler C, Zschock M, 2003. Determination of epidemiological relationship of *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. *FEMS Microbiol. Letters*, 226, 87-92.
- Nickerson SC, Owens WE, Boddie RL, 1993. Effect of a *Staphylococcus aureus* bacterin on serum antibody, new infection and mammary histology in nonlactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 76, 1290-1297.
- Nizamloğlu M, Tekeli T, Erganiş O, Başpınar N, 1989. İneklerde subklinik mastitislerin biyokimyasal ve mikrobiyolojik yönden incelenmesi. *Eurasian J Vet Sci*, 5, 135-143.
- Nyman AK, 2007. Epidemiological Studies of Risk Factors for Bovine Mastitis, Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences.
- Pengov A, 2001 The role of coagulase negative *Staphylococcus* spp. and associated somatic cell counts in the ovine mammary gland. *J Dairy Res*, 84, 572-574.
- Pereira UP, Oliveria DGS, Mesquita LR, Costa GM, Pereira LJ, 2011. Efficacy of *S. aureus* vaccines for bovine mastitis: A systematic review. *Vet Microbiol*, 148, 117-124.
- Philpot WN, 1984. Economics of mastitis control. Symposium of Bovine Mastitis. *Vet Clin North Am Large Anim Prac*, 6, 233-245.
- Philpot WN, Nickerson SC, 1991. Mastitis: Counter attack, Babson Bros Co. 1880, Country Farm Driv, Naperville, Illinois 60563, USA.
- Pyölä S, Taponen S, 2009. Coagulase-negative staphylococci-Emerging mastitis pathogens. *Vet Microbiol*, 134, 3-8.
- Raimundo O, Deighton M, Capstick J, Gerraty N, 1999. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymorphisms of the coagulase gene. *Vet Microbiol*, 66, 275-284.
- Rivera E, Hu S, Concha C, 2003. Ginseng and aluminium hydroxide act synergistically as vaccine adjuvant. *Vaccine*, 21, 1149-1157.
- Silva E, Gaiva M, Leita S, Jost BH, Carneiro C, Vilela CL, Lopes da Costa L, Mateus L, 2008. Genomic characterization of *Arcanobacterium pyogenes* isolates recovered from the uterus of dairy cows with normal puerperium or clinical metritis. *Vet Microbiol*, 25, 111-118.
- Watson DL, Davies HI, 1993. Influence of adjuvants on the immune response of sheep to a novel *Staphylococcus aureus* vaccine. *Vet Microbiol*, 34, 139-153.
- Watts JL, Lowery DE, Teel JF, Rossbacht S, 2000. Identification of *Corynebacterium bovis* and other Coryneforms isolated from bovine mammary glands. *J. Dairy Sci*, 83, 2373-2379.
- Watts JL, Rossbach S, 2000. Susceptibilities of *Corynebacterium bovis* and *Corynebacterium amycolatum* isolates from bovine mammary glands to 15 antimicrobial agents. *Antimicrob Agent Chemother*, 44, 3476-3477.
- Zadoks RN, Watts JL, 2009. Species identification of coagulase-negative staphylococci: Genotyping is superior to phenotyping. *Vet Microbiol*, 134, 20-28.
- Ziv G, 1995. Treatment of mastitis: An overview of progress during the last ten years. *Proceedings, 3rd. IDF International Mastitis Seminar, May 28-June, 1995, Tel-Aviv, Israel.*

