

Pregledni rad

ZNAČAJ VAKCINACIJE U PREVENCIJI STAFILOKOKNIH MASTITISA KRAVA

Slobodanka Vakanjac, Milan Maletić, Miloš Pavlović, Sonja Obrenović, Jovan Bojkovski, Vladimir Magaš*

Kratak sadržaj

Zapaljenje vimena ili mastitis kod krava je akutno ili hronično zapaljenje izvodnih kanala, parenhima ili intersticijuma jedne ili više četvrti vimena krava. Mastitis se definiše kao odgovor mlečne žlezde na prisustvo mikroorganizama. Mastitisi predstavljaju veliki zdravstveni i ekonomski problem u zapatima visokomlečnih krava, a mogu se javiti u kliničkoj formi (klinički mastitis) sa raširenošću 1–3% i u subkliničkoj formi (subklinički mastitis) sa raširenošću više od 30%. *Staphylococcus aureus* izaziva teške akutne mastitise veoma često sa promenom opšteg stanja, ali i subkliničke forme mastitisa. Terapija ovog mastitisa ne daje uvek zadovoljavajuće rezultate, pa je vakcinacija jedan od mogućih pristupa u rešavanju ovog problema. Stafilokoke su veoma slabi antigeni, što dodatno onemogućava i otežava pronalazak efikasne vakcine. U literaturi su opisani različiti pristupi pripreme vakcine protiv mastitisa izazvanog *S. aureusom*. Vakcina može da sadrži inaktivisane bakterije *S. aureus*, alfa i beta toksoide, proteina A i fibronectin-binding protein kao moguće antigene u aktivaciji aktivnog imunološkog odgovora. Imunizovanje mlečne žlezde gde se kao antigen koristi inkorporisan lizat *S. aureus* u biodegradabilne parikule koje imaju funkciju stimulacije produkcije i opsonizacije antitela, još je jedan od načina pripreme vakcine. Vakcina pripremljena od ekstracelularne komponente *S. aureus* SA2H (*slime associated antigen complex SAAC*) pokazala je zadovoljavajuće rezultate. Noviji pristupi pripremi vakcine ukazuju da se kao antigen može koristiti *clamping faktor A* (ClfA) *Staphylococcus aureus*, kao i deo membrane površinskog proteina koji se zove rTRAP (rekombinantni Target RNAIII Activating Protein) koji je sastavni deo proteina 167 AA patogenih sojeva stafilokoka. Imunoprofilaksa omogućava moderan pristup u rešavanju mastitisa izazvanih sa *S. aureus*, smanjenu upotrebu antibiotika u terapiji, a samim tim i smanjeno odbacivanje mleka zbog rezidua antibiotika.

Ključne reči: mastitis, vakcina, *Staphylococcus aureus*

* Prof.dr Slobodanka Vakanjac, Prof.dr Milan Maletić, Prof.dr Miloš Pavlović, Prof.dr Sonja Obrenović, Prof.dr Jovan Bojkovski, Prof.dr Vladimir Magaš
Fakultet veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, Republika Srbija
Korespondentni autor: Prof.dr Slobodanka Vakanjac: vakanjac@vet.bg.ac.rs

DOI: 10.7251/VETJ1702170V

UDK 619:618.19-002-084:636.2

Review paper

IMPORTANCE OF VACCINATION IN PREVENTION STAPHYLOCOCCAL MASTITIS

Slobodanka Vakanjac, Milan Maletić, Miloš Pavlović, Sonja Obrenović, Jovan Bojkovski, Vladimir Magaš*

Abstract

Inflammation of the udder and mastitis in cows is an acute or chronic inflammation duct, parenchymal or interstitial one or more udder quarters. Mastitis is defined as the response of the mammary gland in the presence of microorganisms. Mastitis represent a major health and economic problem in herds of high yielding dairy cows but may occur in clinical form (clinical mastitis) the prevalence of 1-3% and in the subclinical form (sub-clinical mastitis) and the prevalence of more than 30%. *Staphylococcus aureus* causes severe acute mastitis often with a change in general condition, as well as subclinical mastitis. Treatment of mastitis does not always produce satisfactory results, but vaccination is one of the possible approaches to solving this problem. Staphylococci are very poor antigens, which further prevents and hinders the present invention effective vaccines. In the literature are described different approaches to the preparation of a vaccine against mastitis caused by *S. aureus*. The vaccine may also comprise inactivated *S. aureus*, beta and alpha toxoid, protein A and fibronectin-binding protein as a possible antigen in the activation of the active immune response. Immunization of the mammary gland which is used as an antigen is incorporated in the lysate of *S. aureus* biodegradable microspheres which is beneficial for production and stimulation of opsonization of an antibody is one of the ways of preparing vaccines. The vaccine was prepared from the extracellular components of *S. aureus* SA2H (slime-associated antigen complex SAAC) showed satisfactory results. Recent approaches in the preparation of vaccines indicate that the antigen can be used as a clamping factor A (ClfA) of *Staphylococcus aureus*, as well as part of the membrane protein called rTRAP (recombinant Target RNAPIII Activating Protein) which is a constituent part 167 AA protein of pathogenic strains of staphylococci. Immunoprophylaxis to modern approach to the solution of mastitis caused by *S. aureus*, reduced use antibiotics in therapy, and reduced rejection milk because of the antibiotic residues.

Key words: mastitis, vaccines, *Staphylococcus aureus*

* Prof.dr Slobodanka Vakanjac, Prof.dr Milan Maletić, Prof.dr Miloš Pavlović, Prof.dr Sonja Obrenović*, Prof.dr Jovan Bojkovski, Prof.dr Vladimir Magaš
Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade, Serbia
Correspondent Author: Prof.dr Slobodanka Vakanjac: vakanjac@vet.bg.ac.rs

Zapaljenje vimena ili mastitis kod krava je akutno ili hronično zapaljenje izvodnih kanala, parenhima ili intersticijuma jedne ili više četvrti vimena krava. Mastitis se definiše kao odgovor mlečne žlezde na prisustvo mikroorganizama. Mastitisi predstavljaju veliki zdravstveni i ekonomski problem u zapaštima visokomlečnih krava, a mogu se javiti u kliničkoj formi (klinički mastitis) sa raširenošću 1–3% i u subkliničkoj formi (subklinički mastitis) sa raširenošću više od 30%. *Staphylococcus aureus* izaziva teške akutne mastitise veoma često sa promenom opšteg stanja, ali i subkliničke forme mastitisa. Terapija ovog mastitisa ne daje uvek zadovoljavajuće rezultate, pa je vakcinacija jedan od mogućih pristupa u rešavanju ovog problema. Stafilokoke su veoma slabi antigeni, što dodatno onemogućava i otežava pronalazak efikasne vakcine. U literaturi su opisani različiti pristupi pripreme vakcine protiv mastitisa izazvanog *S. aureusom*. Vakcina može da sadrži inaktivisane bakterije *S. aureus*, alfa i beta toksoide, proteina A i fibronectin-binding protein kao moguće antigene u aktivaciji aktivnog imunološkog odgovora. Imunizovanje mlečne žlezde gde se kao antigen koristi inkorporisan lizat *S. aureus* u biodegradabilne partikule koje imaju funkciju stimulacije produkcije i opsonizacije antitela je još jedan od načina pripreme vakcine. Vakcina pripremljena od ekstracelularne komponente *S. aureus* SA2H (*slime associated antigen complex SAAC*) pokazala je zadovoljavajuće rezultate (Prenafeta 2010). Noviji pristupi pripremi vakcine ukazuju da

se kao antigen može koristiti *clamping faktor A* (ClfA) *Staphylococcus aureus*, kao i deo membrane površinskog proteina koji se zove rTRAP (rekombinantni Target RNAIII Activating Protein) koji je sastavni deo proteina 167 AA patogenih sojeva stafilokoka (Leitner 2011). Imunoprofilaksa omogućava moderan pristup u rešavanju mastitisa izazvanih sa *S. aureus*, smanjenu upotrebu antibiotika u terapiji, a samim tim i smanjeno odbacivanje mleka zbog rezidua antibiotika.

Zapaljenje mlečne žlezde izazvano *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), predstavlja jedan od aktuelnih problema u intenzivnoj proizvodnji mleka, nanoseći velike gubitke. *Staphylococcus aureus* je mikroorganizam koji može da izazive teške akutne mastitise, veoma često sa promenom opšteg stanja, kao i subkliničke forme mastitisa. Profilaksa mastitisa kod krava podrazumeva niz aktivnosti koje treba preduzeti da se ne bi pojavio mastitis. Obavezna je svakodnevna kontrola vimena, kao i ispunjenje osnovnih zoonoznih i zootehničkih uslova (Vakanjac i sar. 2006). Terapija ovog mastitisa ne daje uvek zadovoljavajuće rezultate (Vakanjac i sar. 2013) i to je još jedan razlog zbog kojeg se rešenje problema ovog mastitisa traži u kvalitetnoj vakcini. U svetskoj literaturi veliki broj radova posvećen je pripremi eksperimentalne vakcine protiv mastitisa izazvanog *S. aureusom*. Stafilokoke su veoma slabi antigeni, što dodatno onemogućava i otežava pronalazak efikasne vakcine. Iz tih razloga, još uvek nije pronađena komercijalna efikasna vakcina protiv mastitisa izazvanog

Staphylococcus aureus, ali primena autohtonih vakcina u preveniranju mastitisa može dati zadovoljavajuće rezultate. Vakcina može da se aplikuje intramamarno, parenteralno i direktno u supramamarni limfni čvor ili u njegovu okolinu. Aplikacija vakcine direktno u mlečnu žlezdu uglavnom je napuštena, zbog velikog otoka i reakcije same mlečne žlezde na nosače u vakcini. Podeljena su mišljenja o aplikaciji vakcine u supramamarni limfni čvor, zbog jakog lokalnog zapaljenja limfnog čvora, koji otiče i veoma je bolan (Nordhaug, 1994; Hoedermaker, 1999). Zbog toga se sve više istraživača opredeljuje za davanje vakcine parenteralno-subkutano u regiju vrata ili subkutano u regiju limfnog čvora, jer je takav način jednostavan za aplikaciju, a izbegnute su i lokalne reakcije tkiva na vakcinu (Giraud, 1997; Watson, 1996).

Pre skoro četrdeset godina, Brock i saradnici su 1975. godine proizveli eksperimentalnu vakcinu sastavljenu od formalinom inaktivisanih ćelija tri soja *S. aureus*: BB, Mexi i *S. aureus* 3528. Nisu dobili povećanje nivoa ukupnih imunoglobulina ni u serumu, niti u mleku u odnosu na kontrolnu nevakcinisanu grupu. Tako da su autori zaključili da na ovaj način nije moguće prevenirati pojavu mastitisa (Brock, 1975). Radovi koji posle toga slede, ipak pokazuju suprotne rezultate.

Bivalentnu vakcinu protiv stafilokoknog i streptokoknog mastitisa pripremio je Opdebeeck 1982. godine, a vakcina je bila pripremljena od inaktivisanog soja *S.aureus*, *Str. agalactiae* i stafilokoknog alfa toksoida. Krave su vakcinisane u

supramamarni limfni čvor, a ELISA test je pokazao značajno povećanje nivoa antitela u mleku vakcinisane grupe.

Liofilizirani bakterin, resuspendovan u Freund-ovom adjuvansu, još je jedan način pripreme vakcine (Opdebeeck, 1985). Vakcina je sadržavala formalinom inaktivisane mikroorganizame *S. aureus* i aplikovana u regiju ingvinalnog limfnog čvora. Nivo specifičnih antitela u serumu i mleku vakcinisanih krava pokazao je veće vrednosti nego kod kontrolnih krava. Ovaj rad pokazuje da je dobro pripremljena vakcina, kao i odabrani antigen, presudan za dobre efekte vakcine.

Watson (1992) u svom radu opisao je pripremu monovalentne vakcine, ali od dva soja *S. aureus*, koji su izolovani iz mleka krava sa kliničkim mastitisom. Vakcina se sastojala od tri komponentne. Komponenta C sadržavala je inaktivisane bakterijske ćelije, komponenta T se sastojala od toksoida istog soja kao i komponenta C, a komponenta G je pripremljen toksoid drugog soja *S. aureus*. U prvom eksperimentu vakcina je aplikovana 21 dan posle telenja u količini od 1 ml, subkutano sa medijalne strane levog buta i 1 ml komponente T u medijalnu stranu desnog buta. Revakcina je ponovljena posle dve nedelje. Nije bilo značajnijeg porasta imunoglobulina posle primarne vakcinacije, ali posle sekundarne vakcinacije nivo antitela pokazivao je značajno povećanje kod vakcinisanih jedinki u odnosu na kontrolne. Broj somatskih ćelije (SCC) nije pokazao značajne razlike između grupa. U drugom eksperimentu vakcina se sastojala od kombinacije komponente

C i T u količini od po 1ml, kao kod prvog eksperimenta. Preparat je aplikovan u levu i desnu medijalnu stranu buta, dva meseca pred telenje krava u prvoj eksperimentalnoj grupi i nivo specifičnih antitela bio je veći kod vakcinisane, u odnosu na nevakcinisanu grupu. Kod trećeg eksperimenta aplikovane su komponente C 1 ml i po 0,5 ml komponente T i G, ali je vakcinisanje krava bilo dva meseca pre teljenja, duboko intramuskularno u glutealnu muskulaturu i revakcinisana su posle tri meseca na isti način. Nivo specifičnih antitela vakcinisanih grupa pokazao je znatno povećanje u odnosu na kontrolne jedinice.

Veoma zanimljive rezultate dobio je Nickerson (1993), kada je vakcinu protiv infekcije vimena izazvane *S. aureus* aplikovao na dva različita načina u periodu zasušanja krava. Jedna grupa krava primila je vakcinu intramuskularno, a druga subkutano u regiju supramamarnog limfnog čvora, dok treća grupa nije vakcinisana. Četiri nedelje kasnije pokušana je veštačka infekcija sa intramamarnom aplikacijom *S. aureus*. Rezultati intramamarnih infekcija su pokazali da se u kontrolnoj grupi kod 92% krava javio mastitis. U eksperimentalnim grupama bolji rezultati su dobijeni u grupi kojoj je vakcina aplikovana intramuskularno, gde je svega 36% krava pokazalo znake mastitisa, u odnosu na grupu kojoj je vakcina data u regiju limfnog čvora, gde je 60% krava obolelo od mastitisa. Intramuskularni način davanja vakcine bi imao, na osnovu ovog rada, prednost kod izbora mesta aplikacije vakcine.

Slično prethodnim vakcinama, Guidry (1994) je vakcinu pripremio tako što je *S. aureus* inaktivisao 1% formalinom, ispirao fosfatnim puferom i dodao dekstran sulfat, i aplikovana je u supramamarni limfni čvor. Nivo specifičnih stafilocoknih antitela IgG₁ u serumu pokazao je značajni porast) u odnosu na kontrolnu grupu i održavao se na visokom nivou i preko 120 dana.

Nordhaug-ova (1994) monovakcina sastojala se od formalinom inaktivisanih ćelija *S. aureus*, i inaktivisanog alfa i beta toksina. Kao adjuvans je korišćeno mineralno ulje i deterdžent (Montanide 103, Francuska), kao gotov i zaštićen dodatak. Jedna doza od 2,5 ml ove vakcine je sadržavala je inaktivisane bakterijske ćelije i β toksoid, a aplikovana je u regiju supramamarnog limfnog čvora. Rezultati su pokazali da su u kontrolnoj grupi tri krave imale znake kliničkog mastitisa izazvanog *S. aureus*-om, za razliku od vakcinisane grupe, gde nije bilo kliničkih mastitisa. Subklinički mastitisi javili su se kod 14% životinja u kontrolnoj i 8,6% u vakcinisanoj grupi. Broj SCC u mleku tokom celog perioda laktacije, statistički nije značajno povećan između kontrolne i vakcinisane grupe.

Watson (1996) je vakcinu aplikovao dva meseca pred očekivano teljenje, a zatim je data revakcina mesec dana pred teljenje, duboko intramuskularno, u regiju vrata. Broj subkliničkih mastitisa vakcinisanih krava nije značajno smanjen u odnosu na kontrolnu grupu, ali je broj kliničkih mastitisa značajno smanjen. Vakcina može da se koristi kao profilaksa

subkliničkih mastitisa, kao i za smanjenje kliničkih mastitisa u stadima sa ozbiljnim problemima sa mastitisom.

Polivalentna vakcina Girauda i sar. (1997) sastojala se od inaktivisanih ćelija *S. aureus* RC-1v, *S. aureus* RC-2, *Streptococcus uberis* RC-3 i *Streptococcus agalactiae* RC-4. Svaka doza od 5 ml vakcine sadržavala je *S. aureus*, *Streptococcus sp.* i čvrstog dela kapsule *S. aureus*, a kao adjuvans dodat je aluminijum hidroksid. U radu su opisani različiti protokoli vakcinacije i oba protokola prepartalne i postpartalne vakcinacije pokazao je viši nivo specifičnih antitela u mleku nego kod kontrolne grupe. Nije nađeno da je broj somatskih ćelija (SCC) značajno povećan kod vakcinisanih u odnosu na kontrolnu grupu, što autor tumači kao dobru osobinu vakcine, jer je broj SCC u mleku manji od 500.000, što ukazuje da je mleko higijenski ispravno za upotrebu.

Ispitivanjem efikasnosti vakcine protiv *S. aureus*, u kojoj je kao adjuvans korišćen rekombinovani bovini interleukin-2 (rBoIL-2), pratili su u svom radu Derosa i sar. (1997). Bovini rekombinovani interleukin kao adjuvans pokazao je znatno veći titar specifičnih antitela u mleku u odnosu na ostale ispitane grupe koje su kao adjuvans imale fiziološki rastvor i Freund-ov nekompletni adjuvans, a pokazale su viši titar antitela u serumu.

Specifična štalska vakcina, koja je napravljena u Tornau, prvi put je upotrebljena za imunizovanje stada u Nemačkoj (Hoedemaker, 1999). Jedna doza vakcine sadržavala je formalinom inaktivisanih ćelija *S. aureus*-a, međutim nije nađe-

na statistička značajnost između grupa u smanjenju pojave mastitisa i u broju SCC u mleku.

Jedan sasvim nov pristup imunizovanju mlečne žlezde dao je O'Brien (2000, 2001) koji je od *S. aureus* izdvojio polisaharide serotipa 5, 8, i 336 i njih konjugovao u biodegradabilne partikule koje su po sastavu poly-DL-lactid-co-glikolid. Partikule (zrnca) imaju funkciju stimulacije produkcije i opsonizacije antitela. Konjugovani polisaharid je emulgovao sa Freund-ovim adjuvansom. Posle jednokratne aplikacije obe vakcine, kod svih ogleđnih životinja je ustanovljen značajno visok nivo antitela IgG₁ i IgG₂ bez povećanja nivoa IgM klase imunoglobulina. Ovaj pristup rešavanju problema mastitisa, jednokratnim aplikovanjem antigena koji osigurava dug period imunosti mlečne žlezde, otvara novi put rešavanju problematike mastitisa.

Opsežna ispitivanja obavio je Edinger (2000) ispitujući vakcinu pripremljenu od dva soja *S. aureus*, pri čemu je uzročnik inaktivisan formalinom. Vakcina je aplikovana u prepartalnom periodu i u toku tri meseca praćenja nije nađena značajna razlika između grupa u pojavi mastitisa izazvanih *S. aureus* dok je broj SCC u mleku bio niži kod vakcinisane grupe u odnosu na kontrolnu.

Visoko specifičnu štalsku vakcinu protiv mastitisa izazvanog *S. aureus* napravili su Tenhagen i sar. (2001). Kao i kod prethodnog autora u toku prva tri meseca eksperimenta između grupa nije nađena statistička značajnost pojave mastitisa izazvanog *S. aureus*. Broj SCC u mleku

је био нижи код вакцинисане групе у односу на контролне. Visoko specifična štalska vakcina koja je ovde upotrebljena nije pokazala zadovoljavajući efekat smanjenja IMI i SCC u mleku na ovoj oglednoj farmi.

Poseban prilaz ovom problemu i načinu pripreme i davanja vakcine, prikazuje Carter (2003) u svom radu. Osnovu vakcine čini humani citomegalovirus, na čiji plazmid DNA je izvršio direktnu ekspresiju Green Fluorescent protein-GFP stafilocoka (zeleni fluorescein protein koji je obeležen kao pc/DNA3/GFP i proteina A). Ova vakcina je aplikovana pomoću injektora, koji omogućavaju ubacivanje materija pod određenim pritiskom (Ped-o-Jet). Vakcina je aplikovana 6, 4 i 2 nedelje pred očekivani partus u intravulvarnu mukozu. Fosfatni nosač je povećao titar antitela na protein A koji ostaje dugo povećan u cirkulaciji. Na ovaj način pripremljena vakcina može biti efikasni stimulator imunološkog odgovora u borbi sa upornim intramamarnim infekcijama izazvanih *S. aureus*, ali specifična priprema i aplikacije vakcine ograničava njenu širu upotrebu.

Efekti vakcine protiv *S. aureus*-a koja je u svom sastavu imala polisaharid kapsule tipa 5 (T5), 8 (T8) i 336 (T336), opisao je Lee (2005) u svom radu. Nivo specifičnih IgG₁ i IgG₂ je bio značajno povećan kod vakcinisanih grupa krava, u odnosu na krave koje su primile samo FICA.

Keskin i saradnici (2007) ispitali su komercijalnu vakcinu (Hipramastivac, HipraLaboratorios S.A. Spain) koja je bila pripremljena od inaktivisanog soja *S. aureus* TC5, inaktivisanog soja *S. aureus* TC8, *E. coli*, *Str. agalactiae*, *Str. ube-*

ris, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* i *A. pyogenes*, u dozi od 3 ml. Krave su vakcinisane intramuskulano u mišić vrata, 4 nedelje pred očekivani partus. Na osnovu rezultata koje su Keskin i saradnici dobili nije bilo statističke značajnosti u povećanju titra antitela i broju SCC kontrolne i vakcinisane grupe.

U svom radu Vakanjac i saradnici (2008) opisuju pripremu vakcine čija je doza 5 ml i koja je u svom sastavu imala inaktivisane bakterijske ćelije *S. aureus* (I deo vakcine) i kapsule *S. aureus* (II deo vakcine). Krave su vakcinisane dva meseca pred teljenje i revakcinisane mesec dana pred očekivani partus. Srednja vrednost broja SCC kontrolne grupe i vakcinisane grupe ukazuje da ne postoji značajno povećanje broja somatskih ćelija. Tokom celog oglada vrednosti nivoa antitela vakcinisane grupe bile su više od vrednosti nivoa antitela kontrolne grupe. Srednja vrednost nivoa antitela kontrolne grupe iznosila je 0,438 OD, a eksperimentalne 0,697 OD.

Posle jednokratne vakcinacije sa inaktivisanim sojem *Staphylococcus aureus* Middleton i sar. (2008) nisu dobili značajnije povećanje nivoa specifičnih antitela u mleku, niti smanjenje pojave novih infekcija. Krave su vakcinisali jednokratno dve nedelje pred očekivani partus. Ispitivana vakcina nije smanjila broj novih stafilocoknih mastitisa u oglednoj i kontrolnoj grupi. Broj SCC ćelija u ispitivanim grupama nije pokazao statističku značajnost.

Iste godine Pellegrino (2008) je ispitao vakcinu pripremljenu od liofiliziranog

promenjenog soja *S. aureus*. Vakcina je aplikovana subkutano u dozi od 3 ml 30 dana pred očekivano teljenje, a revakcinacija je izvršena 10 dana pred partus. Broj SCC vakcinisane grupe krava je bio niži od kontrolne grupe, mada nije postojala statistička značajnost. Za razliku od broja SCC, nivo specifičnih antitela IgG u mleku vakcinisane grupe bio je statistički značajno povećan u odnosu na kontrolnu grupu krava.

Tempelman (2009) je u svom radu dobio značajno povećanje IgA u mleku vakcinisanih krava u odnosu na nevakcinisane. Koristio je vakcinu pripremljenu od *S. aureus* koji je izolovan od krava sa mastitisom, a vakcinu je aplikovao u nazalnu mukozu i to u dozi od 4 ml (0,2 mg/ml ukupnih proteina celih ćelija *S. aureus*), svake dve nedelje. Rezultati rada ukazuju da antitela iz mleka posle imunizacije krava mogu potencijalno da obezbede dovoljan titar antitela protiv infekcije sa *S. aureus*.

Veliki broj eksperimentalnih grupa postavio je i opisao Perez (2009) u svom radu. Ogled se sastojao od 9 eksperimentalnih i jedne kontrolne grupe. Eksperimentalne grupe od 1 do 5 su primile inaktivisanu bakterijsku ćeliju *S. aureus* (10^{10} bakterija u dozi), nosač vakcine je bio aluminijum hidroksohid (grupe 1, 2, 4, 5) i komercijalni nosač vakcine (grupa 3). Eksperimentalne grupe 6, 7, 8 i 9 u sastavu vakcine su primile površinski polisaharid *S. aureus*-a u dozi od 2 mg, a nosači su bili liposomal (6, 7, 9) i mikropartkule u grupi 8. Kontrolna grupa nije primila vakcinu, već samo

fosfatni pufer. Eksperimentalne grupe 1, 2 i 3 pokazuju statistički značajan titar antitela (OD 0,400 – 0,600) u odnosu na sve ostale grupe u ogledu (od < OD 0,400).

Vakcina pripremljena od ekstracelularne komponente *S. aureus* SA2H (*slime associated antigen complex SAAC*) pokazala je zadovoljavajuće rezultate. Vakcina je pripremljena od 2×10^{10} bakterija po dozi, sa uljnim nosačem. Ogledne grupe su vakcinisane 45 dana i revakcinisane 35 dana pre očekivanog partusa, dok kontrolna grupa nije primila vakcinu. Rezultati vakcinacije ukazuju da vakcina nije sprečila nastajanje mastitisa izazvanog *S. aureus*, ali je značajno redukovala njegovo pojavljivanje u oglednim grupama. Broj SCC u oglednim i kontrolnoj grupi nije pokazao statističku značajnost (Prenafeta 2010).

Vakcina koju je Leitner (2011) pripremio, sadrži deo membrane površinskog proteina koji se zove rTRAP (*rekombinantni Target RNAlII Activating Protein*) i sastavni je deo proteina 167 AA koji je odlika patogenih sojeva stafilokoka. Eksperiment odlikuje veliki broj eksperimentalnih grupa, u cilju utvrđivanja adekvatne doze antigena i odabira odgovarajućeg nosača. Doza antigena koja je pokazala imunogenost kod svih eksperimentalnih grupa kretala se od 54 μg do 100 μg . Nivo antitela u prva tri meseca posle vakcinacije bio je statistički značajno viši kod eksperimentalnih grupa krava, za razliku od broja SCC koji je bio viši u kontrolnoj, nego u eksperimentalnoj grupi.

Xu i saradnici (2011) pripremili su bivalentnu vakcinu protiv stafilokoknog i streptokoknog mastitisa, i ispitili njenu efikasnost na miševima. Cheng (2012) je pripremio rekombinantnu stafilokoknu vakcinu enterotoksina A (rSEA), a kao nosač je koristio mikropartikule od polylastic-co-glycolic acid (PLGA) koje je ispitao na miševima. U oba ova rada vakcinisane grupe su imale povećanje specifičnog antitela u serumu u odnosu na kontrolnu grupu.

Magaš i sar (2013) u radu opisuju pripremu autohtone vakcine koja je pripremljena od *S. aureus* i *Str. agalactiae*, izolovanih iz mleka kржава sa ogleadne farme. Eksperimentalnoj grupi 1 aplikovana je vakcina dva meseca i revakcina mesec dana pred telenje, a eksperimentalnoj grupi 2, vakcina je aplikovana mesec dana pred porođaj, a revakcina dva meseca posle porođaja. Vakcina je data subkutano u dozi od 5 ml, a sastojala se od inaktivisanih bakterijskih ćelija *S. aureus* i *Str. agalacti*. Ovaj način vakcinisanja kржава protiv mastitisa izazvanog *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus agalactiae* doveo je do aktivacije humoralnog i ćelijskog imunološkog odgovora, a mastitisi se pojavljuju u manjem procentu u poređenju sa kontrolnom grupom kржава. Aktivacija humoralnog imunskog odgovora kod kржава koje su vakcinisane antepartalno, a revakcinisane postpartalno je daleko izraženija nego kod kржава koje su vakcinisane i revakcinisane u antepartalnom periodu.

Camussone (2014) je opisao upotrebu vakcine koja se sastojala od inaktivisane

cele bakterijske ćelije *S. aureus* u obliku lizata i adjuvansa ISCOM Matrix koji dovode do povećanja specifičnih antitela u krvi i mleku u vidu jakog humoralnog odgovora organizma.

Bradley (2015) ispituje komercijalnu vakcinu Startvac (Hipra UK Ltd, Nottingham UK) koja sadrži inaktivisane ćelije *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. Prva grupa kржава je vakcinisana po upustvu proizvođača, a druga na svakih 90 dana i kontrolna nije primila vakcinu. Nije utvrđen značajan statistička razlika u pojavi mastitisa kod sve tri grupe, ali je zabeležen manji broj kliničkih mastitisa kod vakcinisanih grupa kржава.

Slične rezultate u ispitivanju komercijalne vakcine Startvac (Hipra Spain) dobili su Landin i sar (2015), nakon trokратne vakcinacije ispitivanih kржава nisu ustanovili benefit vakcine na zdravlje vimeana, pojavu mastitisa i produkciju mleka na ispitivanim farmama.

Premda sve ove štalske vakcine pokazuju značajan eksperimentalni uspeh, koji se ogleda u povećanju titra antitela u serumu, ali ne i u mleku, kao i u smanjenju pojave kliničkih i subkliničkih mastitisa među oglednim kржавama ili u vakcinisanim zapačtima, smatra se da je primena imunoprofilakse u lečenju zapačljenja vimeana još uvek nedovoljno istraženo polje naučnog rada. Mnogi naučnici se i dalje bave problematikom proizvodnje vakcine protiv bakterijskih uzročnika mastitisa, ali složenost građe i aktivnosti same mlečne žlezde, kao i specifičnost propustljivosti barijere krv–mleko, smanjuju uspešnost postizanja značajnog us-

peha na polju ovih istraživanja. Ipak, vakcinacija krava protiv *S.aureus* kao jednog od najčešćih patogenih izazivača mastitisa ima svoje prednosti koje se ogledaju u smanjenju kliničkih i subkliničkih mastitisa, ne koriste se antibiotici i mleko se ne odbacuje, lako je za primenu i potpuno neškodljivo za životinje u visokom graviditetu. Na osnovu našeg iskustva štalske vakcine su pokazale uspeh u smanjenju pojave mastitisa izazvanog sa *S. aureus* na manjim farmama, a sličan uspeh je registrovan i u pojedinačnoj primeni kod krava koje su u prethodnim laktacijama imale recidivirajuće stafilokone mastitise. Upotrebom štalskih vakcina pripremljenih od sojeva stafilokoka izolovanih na farmama dovelo bi do smanjenja procenta stafilokoknog mastitisa.

LITERATURA:

1. Bradley AJ, Breen JE, Pazne B, White V, Green MJ (2015): An investigation of the efficacy of a polyvalent mastitis vaccine using different vaccination regimens under field conditions in the United Kingdom. *J Dairy Sci*, 98, (3) 1706–20.
2. Brock JH, Steel ED, Reiter B. (1975): The effect of intramuscular and intramammary vaccination of cows on antibody levels and resistance to intramammary infection by *Staphylococcus aureus*. *Res. Vet. Sci.* 19 (2), 152.8.
3. Camussione CM, Veaute CM, Pujato N, Morein B, Marcipar IS, Calvinho LF. (2013) : Immune response of heifers against a *Staphylococcus aureus* CP5 whole cell and lysate vaccine formulated with ISCOM Matrix adjuvant. *Res Vet Sci*, 96, (1), 86–94.
4. Carter EW, Kerr DE (2003): Optimization of DNA-based vaccination on Cows Using Green Fluorescent protein and Protein A as a Prelude to Immunization Against *Staphylococcal mastitis*. *J. Dairy Sci.* 86, 1177–1186.
5. Derosa DC, Sordillo Lm.(1997): Efficacy of a bovine *Staphylococcus aureus* vaccine using interleukin-2 as an adjuvant. *ZentralblVeterinarmed.* 44,(10), 599–607.
6. Edinger DB, Tenhagen BA, Baumgartner B, Heuwieser W. (2000): Efficacy of a herd specific vaccine against *Staphylococcus aureus* in dairy heifers. *International Symposium on Immunology of Ruminant Mammary Gland.* Stresa 2000.
7. Giraud JA, Calzolari A, Rampone H, Rampone A, Giraud A, Bogni C, Larriestra A, Nagel R. (1997): Field Trial of a Vaccine Against Bovine Mastitis. 1. Evaluation in heifers. *J. Dairy Sci.* 80, 845–853.
8. Guidry AJ, O'Brien CN, Oliver SP, Dowlen HH, Douglass LW. (1994): Effect of whole *Staphylococcus aureus* and mode of immunization on bovine opsonizing antibodies. *J. Dairy Sci.* 77, 10, 2965.
9. Hoedemaker M, Korff B. (1999): Untersuchungen zum Einsatz einer stallspezifischen Vakzine gegen *Staphylococcus aureus* in einem Mi-

- lchviehbetrieb. Der praktische Tierarzt, collegium veterinarium XXIX, 68–71.
10. Keskin A., Seyrek-Intas K., Basri Tak H., Tuna B., Yilmazbas G., Ozakin C., Ertas S (2007): Efficiency of Polyvalent Mastitis Vaccine in Lactating Dairy Cows. *J.Biol.Environ.Sci.* 1,(2), 87–92.
 11. Landin H, Mork MJ, Larsson M, Waller KP (2015): Vaccination against *Staphylococcus aureus* mastitis in two Swedish dairy herds, *Acta Vet Scand*, 57–81
 12. Lee J., O'Brien C., Guidry AJ., Paape MJ., Shafer-Weaver KA., Zhao X. (2005): Effect of a trivalent vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis lymphocyte subpopulations, antibody production, and neutrophil phagocytosis. *Can. J.Vet.Res.* 69, (1),11–18.
 13. Leitner G., Krifucks O., Kiran M., Balaban N.(2011): Vaccine development for the prevention of staphylococcal mastitis in dairy cows. *Veterinary immunology and Immunopathology*, 142, 25–35.
 14. Magaš V, Vakanjac Slobodanka, Pavlović V, Velebit B, Mirilović M, Maletić M, Đurić M, Nedić Svetlana (2013): Efficiency evaluation of a bivalent vaccine in the prophylaxis of mastitis in cows, *Acta veterinaria-Beograd*, 63, 5–6, 525–536.
 15. Middleton JR., Luby CD., Adams S.(2008): Efficacy of vaccination against staphylococcal mastitis: A review and new data. *Veterinary Microbiol*,134, 1–2, 192–198.
 16. 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
 17. Nordhaug ML, Nesse LL, Norcross NL, Gudding R. (1994): A Field Trial with an Experimental Vaccine Against *Staphylococcus aureus* Mastitis in Cattle. 1. Clinical Parameters. *J. Dairy Sci.* 77, 1, 267–1275.
 18. O'Brien CN, Gudry AJ, Fattom A, Shepherd S, Douglass LW, Westhoff DC. (2000): Production of antibodies to *Staphylococcus aureus* serotypes 5, 8, and 336 using poly (DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Dairy Sci.* 83 (8), 1758–66.
 19. O'Brien CN, Guidry AJ, Douglass LW, Westhoff DC (2001): Immunization with *Staphylococcus aureus* lysate incorporated into microspheres. *J. Dairy Sci.* 84 (8), 1791–9.
 20. Opdebeeck JP, Norcross NL (1982): Antibody response in lacteal secretions of cows after immunization with various concentrations of staphylococcal and streptococcal antigens. *Am J Vet Res.* 43, (10), 1770–5.
 21. Opdebeeck JP, Norcross NL (1985): Antibodies in bovine serum and lactal secretions to capsular antigens of *Staphylococcal aureus*. *Am. J. Vet. Res.* 46, 7, 1561.

22. *Pellegrino M., Giraudo., Raspanti C., Nagel R., Odierno L., Primo V., Bogni C.* (2007); Experimental trial in heifers vaccinated with *Staphylococcus aureus* avirulent mutant against bovine mastitis. *Veterinary microbiology* 127. 0186, 190.
23. *Perez MM at al.*(2009): protection from *Staphylococcus aureus* mastitis associated with poly-N-acetyl β glucosamine specific antibody production using biofilm-embedded bacteria. *Vaccine* 27. 2379–2386.
24. *Prenafeta A., March R., Casais I., Costa L* (2010): Study of the humoral immunological response after vaccination with a *Staphylococcus aureus* biofilm-embedded bacterin in dairy cows: Possible role of the exopolysaccharide specific antibody production in the protection from *Staphylococcus aureus* induced mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 134, 3–4, 208–217.
25. *Tenhagen BA at.al.* (2001): Efficacy of a herd-specific vaccine against *Staphylococcus aureus* to prevent post-partum mastitis in dairy heifers. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 48 (10), 601–7.
26. *Tempelmans MJ. Plat-Sinnige, Verkaik NJ., van Wamel JB., de Groot N., Acton DS., van Belkum A.*(2009): Induction of *Staphylococcus aureus*-specific IgA and agglutination potency in milk of cows by mucosal immunisation. *Vaccine* 27, 4001–4009.
27. Vakanjac Slobodanka, Pavlović V, Pavlović M (2006): Profilaksa, imunoprofilaksa i terapija stafilokoknih mastitisa, *Veterinarski glasnik*, 60, 1–2, 71–79.
28. Vakanjac Slobodanka., Pavlović M., Pavlović V., Obrenović Sonja: (2008): Immunoprophylaxis *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows. *Acta Veterinaria* 58, 2, 221 –230.
29. Vakanjac Slobodanka, Pavlović V, Magaš V, Pavlović M, Đurić M, Maletić M, Nedić Svetlana, Sočo I (2013): Ispitivanje efikasnosti intramamarnog alikovanih antibiotika i glukokortikosteroida u lečenju subkliničkih i kliničkih mastitisa kod krava, *Veterinarski glasnik*, 67, 1–2, 15–27.
30. *Watson DL, McColl ML, Davies HI.* (1996): Field trial of a staphylococcal mastitis vaccine in dairy herds: clinical, subclinical and microbiological assessments. *AVJ.* 447.
31. *Watson DL.* (1992): Vaccination against experimental staphylococcal mastitis in dairy heifers. *Research in Veterinary Science.* 53, 346–353.
32. *Xu H., Hu C., Gong R., Chen Y., Ren N., Xiao G., Xie Q., Zhang M., Liu Q., Guo A., Chen H* (2011): Evaluation of a Novel Chimeric B Cell Epitope-Based Vaccine against Mastitis induced by Either *Streptococcus agalactiae* or *Staphylococcus aureus* in Mice. *Clinical and vaccine immunology*, 18, 6, 893–900.

Rad primljen: 18.6.2017.

Rad prihvaćen: 19.10.2017.