



*Sveriges lantbruksuniversitet*  
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för Kliniska Vetenskaper

# Vaccination mot mastit orsakad av *Staphylococcus aureus*

Maria Larsson

*Uppsala*

*2011*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet*  
*ISSN 1652-8697*  
*Examensarbete 2012:34*

SLU  
Sveriges lantbruksuniversitet

# Vaccination mot mastit orsakad av *Staphylococcus aureus*

Maria Larsson

*Handledare: Karin Persson Waller, Institutionen för kliniska vetenskaper, SLU,*

*samt Enheten för djurhälsa och antibiotikafrågor, SVA*

*Bitr handledare: Håkan Landin, Svensk Mjök*

*Examinator: Bernt Jones*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2011  
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för Kliniska Vetenskaper  
Kurskod: EX0239, Nivå X, 30hp*

*Nyckelord: (Staphylococcus aureus, mastit, vaccin)*

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>  
ISSN 1652-8697  
Examensarbete 2012:34*

## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

FÖRORD.....	
SAMMANFATTNING.....	1
SUMMARY.....	2
INLEDNING.....	3
LITTERATURÖVERSIKT.....	4
Mastit orsakad av <i>S. aureus</i> .....	4
Etiologi och patogenes.....	4
Variation mellan stammar.....	4
Prevalens.....	4
Klinik.....	5
Diagnostik.....	5
Behandling på individnivå.....	5
Kontrollåtgärder på besättningsnivå.....	6
Ekonomiska konsekvenser.....	7
Virulensegenskaper hos <i>S. aureus</i> .....	7
Adherens.....	8
Uppförökning och spridning.....	8
Virulensegenskaper kopplade till förmågan att undvika immunförsvaret.....	9
Vaccination – en möjlig väg i kampen mot <i>S. aureus</i> ?.....	10
Hur uppnås immunisering?.....	10
Stimulering av det humerala immunförsvaret.....	11
Stimulering av det cellulära immunförsvaret.....	11
Adjuvanter - ett sätt att öka immunsvaret.....	12
Administrationssätt.....	12
Uppbyggnad av vaccin.....	12
Studier av vaccination mot <i>S. aureus</i> exklusive studier rörande Startvac®.....	13
Vaccination mot <i>S. aureus</i> med Startvac ®.....	16

SYFTE.....	19
MATERIAL OCH METODER .....	19
Beskrivning av försöksgårdarna.....	19
Vaccinationsmetod .....	20
Datainsamling.....	20
Databearbetning och statistisk analys .....	20
RESULTAT .....	22
Andel kor med mastit på grund av <i>S. aureus</i> -infektion.....	22
Andel kor med celltal över 200 000/ml efter kalvning .....	22
Celltal vid första till fjärde provmjölkningen efter kalvning .....	23
Geometriskt medelcelltal för provmjölkning 1-3 och 2-4 efter kalvning .....	26
DISKUSSION .....	26
Andel kor med mastit på grund av <i>S. aureus</i> -infektion.....	26
Effekter på celltalet .....	28
Praktiska aspekter på vaccinationsförsöket.....	28
KONKLUSION.....	29
LITTERATURFÖRTECKNING .....	30
Internet: .....	34

## **FÖRORD**

Jag vill börja med att rikta ett stort tack till de två gårdar som ställde upp i försöket. Tack för er tid och ert engagemang. Jag vill även tacka min biträdande handledare Håkan Landin som hjälpt mig vid besöken av dessa gårdar. Jag vill slutligen rikta ett stort tack till min huvudhandledare Karin Persson Waller för stöd, hjälp och all tid hon har lagt ner för att handleda mig i arbetet av detta examensarbete.

## SAMMANFATTNING

*Staphylococcus aureus* är den främsta orsaken till klinisk och subklinisk mastit i svenska mjölkbesättningar och medför därmed ekonomiska förluster för en stor andel av Sveriges mjölkproducenter. *S. aureus* har förmåga att uttrycka egenskaper som medför etablering i juvret och möjlighet att undvika värdens immunförsvar. *S. aureus* har visat sig vara svår att eliminera från en besättning och denna typ av mastit är i en del fall svår att behandla med antibiotika varför ett verksamt vaccin efterfrågas. För första gången finns nu ett vaccin mot *S. aureus* tillgängligt på den svenska marknaden, Startvac®, men då inga studier har utförts gällande vaccinetts effekt under svenska förhållanden startades en fältstudie på två svenska mjölkgårdar i Svensk Mjölks regi år 2010. Syftet med detta examensarbete var dels att genomföra en litteraturstudie om *S. aureus* mastit med tonvikt på möjligheter till vaccination samt att sammanställa preliminära resultat från ovannämnda fältstudie. Kor med udda öronnummer vaccinerades intramuskulärt med tre doser utifrån beräknat kalvningsdatum, medan kor med jämna öronnummer utgjorde ovaccinerad kontrollgrupp. Kliniska och subkliniska mastiter under de första fyra månaderna efter kalvning rapporterades och mjölkprov från dessa kor analyserades bakteriologiskt. Även kocelltalen vid de fyra första provmjölkningarna efter kalvning jämfördes mellan vaccinerad och ovaccinerad grupp inom besättning. Resultaten visade inga signifikanta skillnader avseende förekomst av mastit orsakad av *S. aureus* mellan grupperna på gård A medan en signifikant högre andel kor med mastit orsakad av *S. aureus* fanns i den vaccinerade gruppen på gård B. På gård A var kocelltalen signifikant lägre i den vaccinerade gruppen än i den ovaccinerade kontrollgruppen vid tredje provmjölkningen efter kalvning. På gård B däremot tenderade kocelltalen att vara högre i den vaccinerade gruppen än i den ovaccinerade kontrollgruppen vid samma tidpunkt. Sammantaget visar de preliminära resultaten på en positiv effekt av vaccination på gård A. På gård B däremot var juverhälsan sämre i den vaccinerade gruppen vilket är svårtolkat. Resultaten är dock preliminära då endast en dryg tredjedel av det totala antalet kor som ingår i fältstudien innefattades i denna analys. I den slutliga statistiska analysen kommer hänsyn även tas till faktorer som t.ex. ras, dagar efter kalvning och celltal vid sinläggning.

## SUMMARY

*Staphylococcus aureus* is the most common cause for mastitis in Swedish dairy farms and causes great economic losses for a large proportion of Swedish milk producers. *S. aureus* has the ability to express properties, which lead to establishment in the udder and evasion of the immune system of the host. *S. aureus* is often difficult to eliminate from a herd, and this type of mastitis is sometimes difficult to treat with antimicrobials. Thus, an effective vaccine is warranted. For the first time, a vaccine against *S. aureus* mastitis, Startvac®, is now available in Sweden, but as no studies have been made regarding its efficacy under Swedish conditions a field study was initiated by the Swedish Dairy Association on two Swedish dairy farms in 2010. The aim of this graduate project was to do a review on mastitis caused by *S. aureus* with emphasis on the possibilities for vaccination, and to put together preliminary results from the field study mentioned above. Cows with uneven numbers were immunized intramuscularly three times according to their expected date of parturition, while cows with even numbers were included in the unvaccinated control group. Cases of clinical and subclinical mastitis during the first four months after parturition were reported, and milk samples from such cows were analysed bacteriological. In addition, cow milk somatic cell counts (SCC) at the first four test milkings after calving were compared between vaccinated and unvaccinated groups within each herd. The results showed no significant differences regarding the incidence of mastitis caused by *S. aureus* between the groups in farm A, while a significantly higher proportion of mastitis caused by *S. aureus* were detected in the vaccinated group in farm B. In farm A, the cow SCC were significantly lower in the vaccinated group than in the unvaccinated control group at the third test milking after calving. In farm B, however, the SCC tended to be higher in the vaccinated group than in the control group at the same time point. In conclusion, the preliminary results show a positive effect of vaccination in farm A. In farm B, the udder health was worse in the vaccinated group, which is difficult to interpret. The results are, however, preliminary as only slightly more than a third of the total number of cows included in the field study was included. In the final statistical evaluation, other factors like breed, days in milk and SCC before drying off will also be considered.

## INLEDNING

*Staphylococcus (S.) aureus* är den juverpatogen som ger upphov till flest subkliniska och kliniska mastiter i svenska mjölkbesättningar. Denna patogen medför därmed stora ekonomiska förluster för en stor andel av Sveriges mjölkproducenter i form av nedsatt mjölkproduktion och mjölkqualität, ökade arbetskostnader, ökade veterinärkostnader samt rekryteringskostnader p.g.a. för tidig utslagning. *S. aureus* har förmåga att uttrycka egenskaper som medför etablering i juvret och möjlighet att undvika värdens immunförsvar. *S. aureus* har därför visat sig vara svår att eliminera från en besättning. Många *S. aureus* mastiter är dessutom svåra att behandla med antibiotika varför ett verksamt vaccin efterfrågas. Omfattande forskning har med skiftande resultat gjorts under åren för att utveckla ett vaccin riktat mot *S. aureus*. Inget vaccin mot denna typ av mastit har tidigare använts kommersiellt i svenska besättningar. Nu finns dock det första vaccinet mot *S. aureus* tillgängligt på svenska marknaden. Före introduktionen i Sverige hade inga studier utförts gällande vaccinets effekt under svenska förhållanden. Därför startades en fältstudie på två svenska mjölkgårdar i oktober 2010 i Svensk Mjölks regi. Studien kommer att pågå till februari 2012. Syftet med detta arbete var dels att genomföra en litteraturstudie om *S. aureus* mastit med tonvikt på möjligheter till vaccination samt att sammanställa preliminära resultat från ovan nämnda fältförsök.



## LITTERATURÖVERSIKT

### Mastit orsakad av *S. aureus*

#### *Etiologi och patogenes*

*S. aureus* är en grampositiv, koagulaspositiv bakterie som normalt finns på juver och spenhud (Sutra & Poutrel 1994). Den anses framförallt vara en smittsam juverbunden bakterie som främst sprids vid mjölkning (Sutra & Poutrel 1994), men kan även återfinnas i strömmaterial, foder och utrustning (Biggs 2009, Radostits et al. 2007). *S. aureus* är en bakterie som även ofta återfinns i sår t.ex. på hasen (Capurro et al. 2010<sub>a</sub>).

För att *S. aureus* ska kunna etablera sig i juvret och orsaka en infektion måste bakterien kunna fästa till och invadera juvervävnad samt undvika immunförsvaret (Middleton 2008). Om *S. aureus* lyckas ta sig in i juvret via spenkanalen fäster bakterien till epitelceller genom att uttrycka s.k. adhesiner på ytan varefter en uppförökning sker. *S. aureus* producerar därefter toxin för att underlätta vävnadspenetration och fortsatt spridning. Slutligen har *S. aureus* möjlighet att undvika immunförsvaret genom t.ex. kapselproduktion och uttryck av protein A.

#### *Variation mellan stammar*

Det finns ett flertal genetiskt skilda stammar av *S. aureus* (Barkema et al. 2006, Capurro et al. 2010<sub>b</sub>, Zecconi et al. 2006). Enligt Capurro et al. (2010<sub>b</sub>) finns det många skilda genotyper av *S. aureus* i våra svenska besättningar. Dock var ett antal genotyper vanligare, och tre av dessa stod för cirka 50 % av de svenska isolaten, vilket tyder på en spridning mellan besättningar. Dessa genotyper kunde återfinnas i hela landet. Skillnader mellan stammar av *S. aureus* avseende virulensegenskaper kopplade till etablering och spridning av bakterien är troligtvis orsaken till varför vissa genotyper dominerar.

#### *Prevalens*

*S. aureus* är i stora delar av världen den juverpatogen som i störst utsträckning isoleras vid mastit (Haveri 2008). I Sverige är *S. aureus* den juverpatogen som orsakar både flest subkliniska och kliniska mastiter. Enligt Ericsson Unnestad et al. (2009) kunde *S. aureus* isoleras i 21,3 % av fallen vid akut klinisk mastit, medan Persson et al. (2011) fann *S. aureus* i 19 % av de subkliniska mastiterna. Orsaken till varför just denna bakterie är den vanligaste mastitpatogenen i våra svenska besättningar är inte helt klarlagd. Ett visst samband kan dock iakttas mellan *S. aureus* och driftsform (Ericsson Unnestad et al. 2009). *S. aureus* påvisades oftare från uppbundna besättningar, vilket är vanligare i Sverige än i många andra europeiska

länder. En förklaring till detta kan vara att uppbundna besättningar i större utsträckning behåller kroniskt infekterade djur än lösdrifter (Haveri 2008).

### **Klinik**

Infektion till följd av *S. aureus* kan yttra sig på många olika sätt. En intramammär infektion av *S. aureus* kan orsaka allt från subklinisk mastit till höggradig akut klinisk mastit (Radostits et al. 2007). En akut klinisk mastit ger ofta generella kliniska symptom som feber och nedsatt aptit. Den drabbade juverdelen kan i det akuta stadiet vara varm och hård samt smärtsam vid beröring. Mjölken är vid en akut klinisk mastit orsakad av *S. aureus* ofta varblandad och flockig. Infektionen kan även i vissa fall orsaka gangränösa förändringar i den drabbade juverdelen. Vanligare är dock en subklinisk form av sjukdomen med förhöjt celltal i varierande grad och nedsatt mjölkproduktion (Radostits et al. 2007). Celltalen i mjölken orsakas av en ökning av antalet vita blodkroppar till följd av inflammationsreaktionen (Rainard & Riollet 2006).

Den akuta juverinflammationen övergår i många fall i en kronisk form (Divers & Peek 2008). En kronisk mastit ger ofta upphov till ett hårt fibrotiskt juver som kan identifieras vid palpation. En kronisk infektion kan under perioder återigen akutiseras och ge kliniska symptom.

### **Diagnostik**

Mastit diagnostiseras, på individnivå, både genom anamnes, klinisk undersökning och bakteriologisk odling av mjölk (Radostits et al. 2007). En svårighet vid bakteriologisk undersökning är dock att *S. aureus* utsöndras intermittent vilket kan leda till falskt negativt resultat. Det kan därför krävas upprepade provtagningar för att friförklara ett djur från smitta eller hitta en individ med *S. aureus* infektion. Genom att analysera mjölkcelltal och använda sig av California Mastitis Test kan man identifiera djur utan kliniska symptom som bör provtas.

### **Behandling på individnivå**

#### **Antibiotikakänslighet**

De flesta svenska stammar av *S. aureus* isolerade i samband med mastit är känsliga för bencyclenpenicillin. Enligt Bengtsson et al. (2009) var dock 7,1 % av *S. aureus* stammarna från fall av akut klinisk mastit resistenta mot penicillin genom att producera  $\beta$ -lactamas. Enligt Persson et al. (2011) uppvisade endast 3,7 % av *S. aureus* från fall av subklinisk mastit

resistens mot penicillin. Trots flitigt antibiotikaanvändande har resistensläget hållit sig relativt stabilt under de senaste 25 åren och resistens mot andra antibiotika än penicillin är ovanligt. (Bengtsson et al. 2009, Persson et al. 2011).

### **Behandlingsrekommendationer**

Enligt svenska riktlinjer för användning av antibiotika till produktionsdjur (SVF 2011) ska i normalfallet antibiotika endast användas under laktation vid akut klinisk mastit. Då de flesta stammar av *S. aureus* är känsliga för bensylpenicillin rekommenderas detta preparat för behandling. Det är dock viktigt att undersöka förekomst av  $\beta$ -lactamas produktion. Antibiotikabehandlingen ska alltid kombineras med understödjande behandling, som t.ex. vätska och NSAID-behandling, efter behov. Vid behandling av stammar resistenta mot penicillin rekommenderas inte antibiotikabehandling utan endast understödjande åtgärder.

Subklinisk mastit orsakad av penicillinkänsliga *S. aureus* kan enligt svenska riktlinjer för produktionsdjur behandlas med långtidsverkande intramammarier vid sinläggning (SVF 2011). Eventuell behandling baseras på juverhälsoklass och resultat från bakteriologisk provtagning. Förstahandsvalet bör vara bensylpenicillin. Kor med kronisk subklinisk *S. aureus* mastit och kor som bär på penicillinresistenta stammar av *S. aureus* bör dock slås ut ur besättningen.

### **Kontrollåtgärder på besättningsnivå**

*S. aureus* är främst en juverbunden bakterie och sprids ofta vid mjölkning varför riskfaktorer för denna typ av mastit därför ofta är kopplade till mjölkningsrutinerna (Sutra & Poutrel 1994). Kontrollåtgärder för mastit orsakad av *S. aureus* baseras främst på att identifiera och eliminera smittkällor (Bulletin 2006). En viktig del i denna kontroll är att tidigt identifiera kor och kvigor som bär på infektionen (Barkema et al 2006). Genom att upptäcka dessa djur i ett tidigt skede och gruppera eller slå ut drabbade djur kan smittspridning och nyinfektion förhindras. Inköp av djur från besättningar med juverhälsoproblem orsakade av *S. aureus* bör även undvikas för att minska risken för introduktion av nya stammar (Capurro 2009). Om besättningen måste rekrytera nya djur från smittade besättningar bör kvigor väljas då denna grupp i mindre utsträckning bär på juverinfektioner. En viktig del av kontrollen är även behandling av kor med klinisk mastit till följd av *S. aureus* och sintidsbehandling av subkliniska *S. aureus* infektioner (Bulletin 2006).

Viktiga åtgärder för att kontrollera smittspridningen är god hygien vid mjölkning. En mjölkningsordning där kor som bär på smittan mjölkas sist är en av de viktigaste åtgärderna i

drabbade besättningar. Andra hygienåtgärder innefattar bland annat att mjölkaren använder sig av handskar och engångsstrasor vid avtorkning och förstimulering av juvret. Spenspetskador, t.ex. p.g.a. felaktigt vacuum, och bristande spendoppning/sprayning innebär också en ökad risk för infektion varför underhåll av mjölkningsanordning och spendoppning/sprayning efter mjölkning är viktiga åtgärder.

I många fall räcker inte kontrollåtgärder som god hygien vid mjölkning, mjölkningsordning och utslagning av kroniskt infekterade kor till för att eliminera smittan (Sutra & Poutrel 1994). Eftersom olika stammar av *S. aureus* kan finnas i olika besättningar måste hänsyn tas till stammens specifika virulensegenskaper för att lyckas med kontrollen av bakterien (Capurro et al. 2010<sub>a</sub>). En del stammar har t.ex. större benägenhet att återfinnas på hud och i miljön varför åtgärderna i dessa besättningar även bör riktas mot dessa extramammära smittreservoarer. Ofta baseras kontrollåtgärder mot *S. aureus* enbart på åtgärder kring mjölkning vilket i vissa besättningar kan vara otillräckligt för att eliminera smittan. Vaccination riktat mot *S. aureus* kan vara en del av de åtgärder som måste tillämpas för att bekämpa sjukdomen (Sutra & Poutrel 1994, Denis et al 2009).

### **Ekonomiska konsekvenser**

Mastit innebär inte enbart ett djurlidande utan medför även allvarliga ekonomiska konsekvenser för mjölkproducenten. Både klinisk och subklinisk mastit leder till avsevärt minskad mjölkproduktion (Radostits et al 2007). En mastit som kräver antibiotikabehandling under laktation leder även till att stora volymer mjölk inte kan levereras till mejeriet. Även behandlingskostnaderna och rekryteringskostnaderna på grund av för tidig utslagning ökar. Ett djur med mastit bidrar även till merarbete. Kostnaden för en klinisk mastit var enligt Nielsen (2009) 2800 kronor och en subklinisk mastit uppskattades kosta cirka 600 kronor. Den största kostnaden vid mastit är enligt Nielsen kopplad till minskad mjölkavkastning.

### **Virulensegenskaper hos *S. aureus***

*S. aureus* har, som tidigare nämnts, förmågan att uttrycka ett antal virulensegenskaper. Dessa egenskaper är viktiga för patogenesen och *S. aureus* förmåga att persistera i juvret. Olika stammar skiljer sig dock mycket i uttrycket av dessa virulensegenskaper (Zecconi et al 2006). Många virulensegenskaper verkar för att möjliggöra en snabb adherens till juvervävnad (Middleton 2008). Uttryck av vissa ytproteiner är egenskaper som bidrar till denna vidfästning. För att infektionen ska kunna utvecklas till en mastit måste bakterierna uppförökas och spridas i juvret. Detta underlättas genom uttryck av specifika toxiner och

enzymer. För att infektionen sedan ska kunna persistera krävs att *S. aureus* kan undvika immunförsvaret. Antikroppar och komplementfaktorer är viktiga komponenter i immunförsvaret som båda har en förmåga att binda till ytan av mikroorganismer (Tizard 2004). Antikroppar och komplementfaktorer verkar opsoniserande och lockar till sig fagocyter varpå en eliminering av bakterien kan ske. Vissa virulensegenskaper hos *S. aureus* är kopplade till uttryck av kapsel eller ytprotein, som protein A, vilket förhindrar sådan fagocytos.

Nedan följer ett urval av virulensegenskaper hos *S. aureus* uppdelat på ovan nämnda viktiga delar i patogenesen.

### **Adherens**

Ett sätt för *S. aureus* att effektivt undvika urmjölkning är att snabbt adherera till juvervävnad (Sandholm et al. 1995). Enligt Hensen et al. (2000) koloniserar *S. aureus* juvarepitel inom 24 timmar vid experimentell inokulation. *S. aureus* uttrycker ofta proteiner, som är associerade med adhesion, på cellytan (Middleton 2008). Exempel på sådana molekyler är clumping factor A (ClfA), fibronectinbindande protein och collagenbindande protein. *S. aureus* fäster gärna till komponenter i extracellulärt matrix som t.ex. kollagen. Det är därför lättare för *S. aureus* att adherera om en epitelskada blottar dessa ytor.

### **Uppförökning och spridning**

*S. aureus* kan producera olika typer av toxiner som bryter ner celler i vävnaden och därmed ökar bakteriens näringsupptag och underlätta spridning av infektionen (Middleton 2008). *S. aureus* producerar varierande mängd toxiner under olika faser av infektionen (Bharathan & Mullarky 2011). Fyra olika typer av hemolytiska toxin kan produceras. Två av dessa,  $\alpha$  och  $\beta$ -hemolysin, verkar genom att lysa sekretoriska epitelceller (Radostits et al. 2007). Stammar som uttrycker  $\alpha$ -toxin kan ge upphov till en allvarlig form av mastit med omfattande vävnadsdöd (Sandholm et al. 1995). De flesta stammar av *S. aureus* producerar dessutom leukocidiner (Sutra et Poutrel 1994). Denna typ av toxin har cytolytisk effekt på bovina neutrofiler. De flesta stammar producerar även enzymer som proteas, collagenas, lipas och nukleas vilka underlättar bakteriespridning genom att bryta ner vävnaden (Middleton 2008).

## Virulensegenskaper kopplade till förmågan att undvika immunförsvaret

### Kapsel, slem och biofilmsproduktion

De flesta stammar av *S. aureus* omges av en kapsel som består av polysackarider (Haveri 2008). Det finns 11 subtyper av dessa kapselpolysackarider (CP), av vilka de vanligaste är CP5 och CP8 (Schaffer & Lee 2008). Genom att bilda kapsel kan *S. aureus* undvika fagocytos och aktivering av komplementsystemet (Wilkinson & Holmes 1978; Middleton 2008).

Många stammar är även biofilmsproducerande. Biofilm kan beskrivas som ett antal bakterier som är omslutna av polysackarider med förmåga att adherera till levande vävnad eller dött material (Costerton et al. 1999). Biofilmformationen sker i tre steg där det första är adherens av bakterien till juvarepitel (Melchior et al. 2006). Primär adherens sker genom en attraktion mellan mikroorganismen och ytan mot vilken den ska fästa (Dunne 2002). Hydrofoba interaktioner och skillnader i elektrisk laddning är exempel på krafter som kan orsaka primär adherens. En sekundär adherens sker därefter med hjälp av ytmolekyler, s.k. adhesiner. Mikroorganismerna producerar sedan extracellulära polysackarider, poly-N-acetyl  $\beta$ -1,6-glucosamin (PNAG), vilket leder till adherens av ytterligare bakterier (Prenafeta et al. 2010). Därefter förökar sig cellerna och bildar en struktur av celler i flera lager. Då biofilmen nått en kritisk nivå börjar bakterier frigöra sig från strukturen vilket möjliggör spridning av mikroorganismerna (Melechior et al 2006).

Vissa stammar bildar en kraftig biofilm *in vitro*, medan andra bildar en tunn biofilm med få cellager (Cramton et al. 1999). Vissa stammar bildar ingen biofilm alls *in vitro*. Förmågan att bilda biofilm är troligtvis kopplat till en *ica*-gen, som är vanligt förekommande hos *S. aureus*. Produktionen av biofilm påverkas dock av den omgivande miljön (Götz 2002). *S. aureus* kan välja att uttrycka denna egenskap t.ex. då tillgången på syre och järn är begränsad eller vid låga koncentrationer av vissa antibiotika. Biofilm skyddar även mot antikroppsmedierad fagocytos (Melechior et al 2006). Biofilmsformation kan även påverka utgången av antibiotikabehandling då biofilm gör det svårare för antibiotika att nå fram till mikroorganismerna och utöva sin verkan (Costerton et al.1999; Dunne 2002). Bakterier i biofilm växer långsammare då näringstillförseln till vissa av cellerna i denna struktur är begränsad. De antibiotika som enbart verkar på växande celler fungerar därför inte i bekämpningen av biofilmsbildande bakterier.

Vissa stammar producerar även ett skyddande slimelager som främst består av hydrerade polysackarider (Melechior et al 2006). Enligt en studie av Balselga et al. (1993) hade

slimeproducerande stammar av *S. aureus* bättre förmåga att kolonisera vävnad än stammar utan slimeproduktion. Många gånger används biofilm och slime synonymt i litteraturen. I en undersökning av förmågan att bilda slime i laboriemiljö hos svenska stammar isolerade från fall av mastit bildade mindre än 50 % av isolaten slime (Persson Waller, muntligt meddelande 2011).

#### *Protein A*

*S. aureus* har även andra möjligheter att undvika värdens immunförsvar. Många av stammarna har en förmåga att binda in antikroppar felaktigt vilket medför att *S. aureus* undviker fagocytos (Sandholm et al. 1995). Protein A är ett ytprotein hos *S. aureus* som binder till Fc-delen istället för Fab-delen av IgG<sub>2</sub> och därmed förhindrar den antikroppsmedierade opsoniseringen (Middleton 2008). Därmed kan inte antikroppen binda till fagocyterande celler och undviker effektivt avdödning.

#### *Förmåga till intracellulär invasion*

Enligt Oliveira et al. (2011) har vissa stammar av *S. aureus* även förmåga att invadera epitelceller och därmed undvika immunförsvaret. Även neutrofiler kan fungera som skyddande hölje då fagocyter i vissa fall inte klarar av att avdöda bakterien och patogenen kan leva vidare intracellulärt (Biggs 2009). När neutrofilen efterhand dör har bakterien dessutom potential att återinfektera vävnaden. Bakteriens förmåga att gömma sig i somatiska celler kan även vara en del i förklaringen till varför intermittent bakterieutsöndring är vanligt vid *S. aureus* mastit.

### **Vaccination – en möjlig väg i kampen mot *S. aureus*?**

*S. aureus* har visat sig vara både vanligt förekommande i svenska besättningar och svår att eliminera. Behovet av ett vaccin som kan vara en del i kontrollen av *S. aureus* är stort. Ett optimalt vaccin ska i första hand förhindra uppkomst av nya infektioner. I andra hand ska vaccination reducera kliniska symptom och öka chansen för avläkning. Ett optimalt vaccin ska även fungera på flertalet *S. aureus* stammar och vara kostnads- och arbetseffektivt.

#### *Hur uppnås immunisering?*

Det finns metoder för att uppnå skydd mot en specifik infektion vilka bygger på passiv eller aktiv immunisering (Tizard 2004). Passiv immunisering innebär överföring av antikroppar som ger ett omedelbart men kortvarigt skydd hos individen. Aktiv immunisering bygger

istället på att introducera ett valt antigen vilket individens immunförsvar reagerar mot genom att sätta igång ett immunsvaret. Om individen utsätts för samma antigen igen genom en andra vaccindos initieras ett sekundärt immunsvaret vilket ökar det immunologiska svaret. Aktiv immunisering uppnås genom att utsätta individen för apatogena former eller komponenter från mikroben (Abbas & Lichtman 2004). Kroppen svarar sedan på det främmande antigenet genom aktivering av det humoral och/eller det cellulära immunförsvaret.

### **Stimulering av det humoral immunförsvaret**

Många vacciner verkar genom att stimulera det humoral immunförsvaret att producera antikroppar (Middleton 2008). Antikropparna, vilka produceras och frisätts från B-celler, ska verka opsoniserande på fagocyter samt neutralisera främmande mikroorganismer (Baharathan & Mullarky 2011).

Antikroppar som täcker bakterieytan verkar stimulerande på fagocyterande celler och medverkar därmed till eliminering av mikroorganismer (Abbas och Lichtman 2004). Antikroppsmedierad fagocytos är en viktig del i försvaret mot kapselproducerande mikroorganismer. Immunoglobulinerna IgG<sub>2</sub> och IgM betraktas ha den bästa opsoniserande förmågan (Rainhard & Riollot 2006).

Neutraliserande antikroppar verkar genom att med hjälp av Fab-regionen binda till främmande antigen och därmed förhindra mikroorganismens adhesion till vävnaden vilket leder till att etablering och spridning av bakterien kan undvikas (Abbas och Lichtman 2004).

Antikroppar har även möjlighet att binda till bakterietoxiner och därmed minimera toxineras skadliga effekter (Abbas och Lichtman 2004).

### **Stimulering av det cellulära immunförsvaret**

Många mikroorganismer har, liksom *S. aureus*, möjlighet att invadera värdceller och persistera intracellulärt. Denna strategi gör att mikroorganismerna gömmer sina antigen för omgivningen och omöjliggör en antikroppsmedierad, humoral eliminering (Tizard 2004). Det cellulära immunförsvaret medieras av T-lymfocyter med förmåga att identifiera intracellulära mikroorganismer. Identifieringen sker genom peptidantigen som presenteras på ytan av makrofager och andra antigenpresenterande celler (Abbas & Lichtman 2004). I de fall makrofager misslyckats med avdödningen av mikroorganismer kan det cellulära försvaret öka makrofagens förmåga till avdödning. Makrofagen aktiveras i dessa fall av cytokiner som frisätts från T-lymfocyter.



Mikroorganismer som har invaderat epitelceller elimineras istället genom cytotoxiska T-lymfocyter. Denna typ av T-lymfocyter frisätter cytotoxiska proteiner vilket leder till apoptos av målcellen.

### **Adjuvanter - ett sätt att öka immunsvaret**

För att öka effekten av ett vaccin, framförallt vid användande av avdödade vaccin, används ofta adjuvants (Tizard 2004). Adjuvant är en substans som i kombination med ett antigen ökar kroppens immunsvaret. Adjuvanter är även nödvändigt om långvarigt immunologiskt minne ska uppstå. Det finns tre olika typer av adjuvants som på olika sätt ökar det immunologiska svaret. Freud's incomplete adjuvant, som bygger på mineralolja, tillhör gruppen adjuvants vilka syftar till att förhindra att vaccinantigen degraderas. Genom att förhindra en snabb nedbrytning av vaccinantigen förlängs därmed immunsvaret. Andra adjuvants, som t.ex. lipopolysackarider, syftar istället till att öka T-cells-svaret och cytokinproduktionen genom att aktivera dendritiska celler och makrofager. Vissa adjuvanter har även möjlighet att öka det immunologiska svaret genom att på ett effektivt sätt överföra vaccinantigen till antigenpresenterande celler. ISCOMs, vilket är en immunostimulerande mikropartikel som utgår från lipider, är ett exempel på denna typ av adjuvant.

### **Administrationssätt**

Vaccinet kan administreras på flera olika sätt. Vanligaste vaccinationsmetoden är genom intramuskulär eller subkutan injektion (Tizard 2004). Detta ger upphov till ett systemiskt immunsvaret. I vissa fall krävs dock endast ett lokalt immunsvaret, vilket uppnås genom att administrera vaccinet där det eventuella smittämnet verkar lokalt. Vaccin kan t.ex. administreras på munslemhinnan eller i området för lymfknutor som ligger nära infektionsområdet. Administrationssättet kan påverka det immunologiska svaret. Enligt Carter och Kerr (2003) ökar det immunologiska svaret efter en intradermal vaccinationsmetod. Författarna förklarar detta fynd genom att det finns en hög andel dendritiska celler, vilka är antigenpresenterande, i denna typ av vävnad.

### **Uppbyggnad av vaccin**

#### **Helcellsvaccin**

Vacciner, riktade mot bakterier, kan vara uppbyggda på flera sätt (Abbas & Lichtman 2004). Vaccin som bygger på hela celler är den enklaste typen av vaccin. Denna typ av vaccin bygger på hela bakterier som avdödas med hjälp av formalin eller värme (Tizard 2004). I de fall man istället använder sig av levande vaccin måste dessa försvagas för att inte ge upphov

till infektion. De första vaccinerna som prövades kliniskt var just helcellsvaccin (Denis et al 2009). Denna typ av immunisering ger främst upphov till ett humoralt immunsvär.

#### *Kapsel-, yt- och cellväggsassocierade vaccin*

Det finns även helcellsvacciner där man utgått från *S. aureus* bakterier med uttryck för specifika virulensegenskaper (Denis et al 2009). Ett exempel på detta är helcellsvacciner som baseras på kapselbildande *S. aureus* (Middleton 2008). Vaccin som baseras enbart på delar av bakterien som t.ex. polysackarider stimulerar endast immunförsvaret i en begränsad omfattning (Wood 2006). Konjugerade vaccin där antigenkomponenten istället är kopplad till ett protein ger upphov till ett starkare antikroppssvar.

#### *Toxoider*

Vaccin kan även baseras på inaktiverade toxin från bakterien vilket genererar specifika antikroppar mot toxinet (Wood 2006). Vid infektion oskadliggör dessa antikroppar toxiner producerade av mikroorganismen och de kliniska symtomen minskar.

#### *DNA-vaccin*

En annan typ av vaccin som har prövats i kampen mot *S. aureus* är s.k. DNA-vaccin vilka stimulerar både det cellulära och humoral försvaret (Wood 2006). I denna typ av vaccin introduceras gener som kodar för proteiner hos mikroorganismen i apatogena bakterier eller virus som sedan producerar antigenprotein vilket immunförsvaret försöker eliminera. DNA-vaccin ger enligt experimentella studier upphov till både humoralt och cellulärt försvar.

#### *Kombinationer*

Många vacciner består av en kombination av ovanstående vaccintyper. Helcellsvaccin kombineras ofta både med toxoider och fristående antigenkomponenter av bakterien (Tizard 2004).

#### ***Studier av vaccination mot *S. aureus* exklusive studier rörande Startvac®***

Sedan länge pågår forskning för att framställa ett verksamt vaccin riktat mot juverinfektion med *S. aureus* och påföljande mastit. Vacciner av detta slag testas först genom experimentella studier på ett mindre antal djur, ofta i kombination med experimentell inokulering av *S. aureus* i juvret. Denna typ av experimentella studier kan t.ex. visa hur immunförsvaret svarar på vaccinationen genom att analysera halter av antikroppar i serum och mjölk. För att kunna utvärdera den sanna effekten av ett vaccin krävs dock fältstudier. Fältstudier utgår från djurpopulationer som studeras avseende effekten av vacciner på naturliga infektioner.

Genomgången nedan utgår från experimentella studier och fältförsök som gjorts sedan mitten av 1980-talet. En sammanställning av studierna och deras resultat redovisas i Bilaga 1. Urvalet av dessa studier utgår från en artikel av Pereira et al. (2010) avseende vaccinationsförsök mot *S. aureus*. I den artikeln gjordes en elektronisk sökning på Pubmed där endast *in vivo*-studier på nöt inkluderades och ingen selektion utifrån vaccintyp gjordes. Studier som utvärderar besättningsegna vacciner ingår dock ej i denna genomgång.

### *Experimentella studier*

De flesta vacciner stimulerar det humoral immunförsvaret och ger därmed upphov till en ökning av antikropps-koncentrationen i serum och mjölk. Många av de redovisade studierna medförde signifikant högre antikropps-nivåer hos vaccinerade grupper än i ovaccinerade kontrollgrupper (Bilaga 1).

Nickerson et al. (1993) visade på fem gånger högre titrar av specifika antikroppar i serum hos djur vaccinerade med ett avdödat helcellsvaccin vid jämförelse med djur i kontrollgruppen. Trots höga antikropps-nivåer påvisades *S. aureus* i mjölk hos 48,1 % av de vaccinerade djuren efter experimentell inokulering i juvret vilket dock var signifikant lägre än i kontrollgruppen där *S. aureus* påvisades hos 91,7 %. Ingen skillnad i mjölkens celltal kunde ses mellan grupperna. Vid experimentella vaccinationsförsök av Leitner et al. (2003<sub>a</sub>) påvisades *S. aureus* hos en signifikant lägre andel av de vaccinerade korna efter försöksinokulation i juvret.

Även i experimentella studier av Watson (1984), Nordhaug et al. (1994<sub>b</sub>) och Pellegrino et al. (2008) påvisades signifikant högre koncentrationer av antikroppar i serum hos vaccinerade djur än hos kontroldjur. Inte heller i dessa studier, där helcellsvaccin användes, kunde signifikanta skillnader i celltal påvisas vid jämförelse med kontrollgruppen.

I försöken ovan utvärderas effekten av helcellsvaccin vilka främst stimulerar det humoral immunförsvaret. En studie av Shkreta et al. (2004) utgick istället från ett DNA-vaccin som i högre utsträckning stimulerar det cellulära försvaret. I det försöket hade kor i den vaccinerade gruppen signifikant lägre bakterieförekomst i mjölk jämfört med den ovaccinerade kontrollgruppen.

Vissa experimentella studier hade även för avsikt att utvärdera effekten av adjuvants. I en studie av Hu et al. (2003) immuniserades grupper av kor med helcellsvaccin eller ovalbumin med en tillsats av antingen aluminiumhydroxid, ginsengextrakt eller en specifik immunogen komponent av ginseng, R<sub>b1</sub>. I studien visade det sig att R<sub>b1</sub> gav upphov till det högsta

antikroppssvaret men även att denna komponent signifikant ökade det cellmedierade försvaret jämfört med grupper utan adjuvants.

### *Fältförsök*

Många av de experimentella vaccinationsförsöken gav upphov till ett specifikt antikroppssvar. De efterföljande fältstudierna visade dock att höga halter antikroppar inte alltid medför ett ökat skydd mot *S. aureus* infektion.

Vid fältförsöken som följde ovan nämnda experimentella studier av Nordhaug et al. (1994<sub>a</sub>) sågs inga signifikanta skillnader i varken mastitförekomst eller celltal mellan vaccinerade och ovaccinerade djur. I den vaccinerade gruppen fanns dock inga kliniska mastiter, till skillnad från tre fall i den ovaccinerade gruppen, vilket kan tyda på att de specifika antikropparna riktade mot  $\alpha$ -toxin reducerade de kliniska symptomen.

I ett fältförsök av Giraudo et al. (1997) påvisades däremot signifikant lägre frekvens *S. aureus* infektion i den vaccinerade gruppen. Materialet i denna studie var dock relativt litet och inga signifikanta skillnader avseende celltal kunde påvisas. Även i en studie av Watson et al. (1996) sågs en signifikant lägre andel kliniska såväl som subkliniska mastiter i den vaccinerade gruppen vid jämförelse med den ovaccinerade kontrollgruppen.

I en fältstudie av Leitner et al. (2003<sub>b</sub>) kunde inte vaccinerade och ovaccinerade grupper jämföras avseende mastitförekomst till följd av *S. aureus* då incidensen *S. aureus* infektion generellt var för låg. Den vaccinerade gruppen hade dock signifikant lägre celltal vid jämförelse med kontrollgruppen.

Många av ovan beskrivna vaccinationsstudier visade på stimulering av det humoral immunförsvaret med antikroppsproduktion som följd. Ingen av studierna visade dock på ett fullständigt skydd mot infektion av *S. aureus*. En förklaring till en begränsad vaccinationseffekt är *S. aureus* förmåga att uttrycka olika virulensfaktorer och därmed undvika immunförsvaret. Om en virulensfaktor elimineras genom vaccination och antikroppsproduktion, har *S. aureus* i många fall möjlighet att kompensera för detta bortfall genom uttryck av en annan typ av virulensfaktor (Schaffer & Lee 2008). Att vaccinförsök som bygger på att stimulera det humoral försvaret misslyckas kan t.ex. förklaras genom att *S. aureus* förmåga att uttrycka protein A och därmed undvika antikroppsmedierad fagocytos. Vissa bovina antikroppar har dessutom en mycket begränsad opsoniserande effekt (Denis et al 2009).

*S. aureus* har även en förmåga att invadera epitelceller (Almeida et al. 1996) och persistera i celler som tillhör immunförsvaret, som t.ex. neutrofiler (Biggs 2009). Ett vaccin riktat mot bakterier med potential att persistera intracellulärt bör därför stimulera både det humoral och det cellulära immunförsvaret vilket endast ett fåtal vaccin i vår genomgång gör (Baharathan & Mullarky 2011; Denis et al 2009).

### **Vaccination mot *S. aureus* med Startvac®**

Ovanstående resultat från vaccinationsförsök visar att många vaccin minskar de kliniska symptomen av mastit, främst till följd av ett humoralt immunsvär. Det är dock få studier som tyder på att vaccination verkligen förhindrar uppkomsten av *S. aureus* infektion. Behovet av ett verksamt vaccin är stort men inget vaccin mot denna typ av mastit har tidigare använts kommersiellt i svenska besättningar. Nyligen introducerades Startvac® (Laboratorios Hipra, Spanien) på den svenska marknaden, vilket är det första vaccinet i Sverige riktat mot *S. aureus*.

Startvac® är ett avdödat helcellsvaccin som utgår från *S. aureus* SP140 (EMEA 2011). Denna stam av *S. aureus* har förmåga att uttrycka Slime Associated Antigen Complex (SAAC). Vaccinet innehåller även inaktiverade *E. coli* bakterier och en adjuvant i form av mineralolja. Enligt fabrikanten behövs tre immuniseringar. Den första ska ske 45 dagar innan förväntad kalvning, den andra 35 dagar senare och den tredje och sista 62 dagar efter den andra dosen. Om immuniseringen följer detta protokoll ska vaccinet vara verksamt från 13 dagar efter första dosen till 130 dagar efter kalvning.

Vaccinet har prövats både i experimentella studier och i fältförsök. Många av studierna redovisar den samlade effekten av Startvac® mot alla infektionsagens. Genomgången nedan inriktar sig dock på de studier som presenterat resultat specifika för *S. aureus*.

### **Experimentella försök**

En studie av Prenafeta et al. (2010) gjordes i syfte att utvärdera produktionen och betydelsen av SAAC-specifika antikroppar i samband med *S. aureus* infektion. I försöket använde man sig av ett flertal stammar av *S. aureus*, varav några slimeproducerande. Dessa stammar var utgångspunkten för att skapa två typer av helcellsvaccin som utgick från bakterier med hög (grupp A) respektive begränsad (grupp B) förmåga att producera slime. Efter inokulation av *S. aureus* uppvisade grupp A högre serumtitrar mot specifika SAAC- antikroppar vid jämförelse med grupp B och ovaccinerad kontrollgrupp. Då mjölken även analyserades med avseende på bakterieförekomst under 16 dagar efter inokulation med *S. aureus* konstaterades

att grupp A hade lägre förekomst av bakterier vid jämförelse med grupp B och ovaccinerad kontrollgrupp.

### *Fältförsök*

Flera fältstudier följde det experimentella försöket av Prenafeta et al. (2010). Inga av dessa studier är publicerade i vetenskapliga tidskrifter, men ett flertal har publicerats som konferenspublikationer.

En studie av March et al. (2010) genomfördes på sex spanska gårdar. Gårdarna inkluderades i försöket då de alla hade problem med mastit till följd av stafylokocker och/eller *E. coli*. Denna studie innefattade totalt 386 dräktiga kor och kvigor där 198 stycken vaccinerades och 188 stycken utgjorde kontrollgrupp. Djuren var konstaterat infektionsfria innan försöket med hjälp av bakteriologisk provtagning (Läkemedelsverket 2011). Immuniseringen utfördes enligt ovan beskrivet vaccinationsprotokoll. Efter kalvning togs mjölkprov från hela gruppen i syfte att genom bakteriologisk odling identifiera kor med intramammära infektioner. Resultaten visade att den vaccinerade gruppen hade signifikant lägre andel både klinisk och subklinisk mastit till följd av *S. aureus* vid jämförelse med den ovaccinerade kontrollgruppen (March et al. 2010). Celltalet var också signifikant lägre i den vaccinerade gruppen än i kontrollgruppen. Den vaccinerade gruppen uppvisade även en högre spontan avläkningsgrad från intramammär infektion vid jämförelse med ovaccinerad kontrollgrupp. Detta resultat bygger dock på avläkningsgraden utan behandling oavsett bakterieagens.

Ännu ett spanskt fältförsök genomfördes av Jiménez och Romero (2011) för att utvärdera effekten av Startvac®. Försöket gjordes på en gård med 650 mjölkkor varav 275 stycken ingick i försöket. Av dessa vaccinerades 140 stycken kor och kvigor och 133 stycken utgjorde ovaccinerad kontrollgrupp. Djuren immuniserades enligt vaccinationsprotokoll rekommenderat av fabrikanten. Båda grupperna provtogs inför sinläggning och vid kalvning för att fastställa mjölkens celltal och kor med celltal över 200 000 ansågs infekterade. Mjölksproverna analyserades även bakteriologiskt efter kalvning. Resultaten visade på en signifikant lägre andel kor och kvigor med *S. aureus* infektion i den vaccinerade gruppen än i den ovaccinerade kontrollgruppen.

Effekten av Startvac® har även utvärderats i ett fältförsök från Österrike (Hofer 2011). I detta försök studerades 18 mjölkkor med kända *S. aureus* problem. Alla kor immuniserades enligt rekommenderat vaccinationsprotokoll. Ett år efter försökets start sågs en signifikant minskning i celltalet jämfört med innan vaccination. Även förekomsten av subklinisk mastit

till följd av *S. aureus* hade minskat kraftigt från 58 juverdelar som urskiljde *S. aureus* vid försökets början till endast en juverdel vid försökets slut.

#### *Fältförsök med alternativa vaccinationsprotokoll*

Vaccinationsprotokollet som rekommenderas av fabrikanten bygger på immunisering utifrån kalvningsdatum. I många besättningar är det svårt att följa detta protokoll då det inte är praktiskt genomförbart att vaccinera djuren vid separata tidpunkter. Fälstudier av Startvac® som bygger på andra typer av vaccinationsprotokoll har därför genomförts.

I ett fältförsök av Ortega Ariel de Valesco (2011) på en spansk mjölkgård med 50 mjölkkor utfördes den första immuniseringen samtidigt på alla djur följt av en andra dos tre veckor senare. Alla kor vaccinerades därefter var tredje månad. Resultaten visade en lägre andel kor med celltal över 400 000 celler/ml sju månader efter försökets start jämfört med vid försökets början. Resultaten visade även en större andel kor med celltal under 200 000 celler/ml. Dessutom var prevalensen *S. aureus*-infekterade kor signifikant lägre vid försökets slut än vid dess början.

Även i en studie av Schmitt et al. (2011) på 10 franska mjölkgårdar användes en annan typ av vaccinationsprotokoll. I det försöket immuniserades alla djur med tre doser, dag 1, dag 21 och dag 111. Preliminära resultat tyder på sänkta celltal och en lägre andel infekterade kor efter vaccination, men det fanns en stor variation mellan gårdarna.

Ovanstående studier visar relativt goda resultat avseende reduktion av *S. aureus* infektion, och celltal efter vaccination med Startvac®. Inga av fältförsöken är dock publicerade i vetenskapliga tidskrifter vilket gör det svårt att värdera resultaten av studierna. Inga studier är heller gjorda i Sverige eller något annat nordiskt land vilket gör det svårt att bedöma effekten av Startvac® i svenska besättningar då komaterial, bakterieagens och skötselrutiner skiljer sig åt mellan länder. Studier rörande vaccinetts effekt bör därför studeras under svenska förhållanden.

## **SYFTE**

Syftet med arbetet var dels att genomföra en litteraturstudie om *S. aureus* mastit med tonvikt på användning av vaccination som en kontrollåtgärd och dels att sammanställa preliminära resultat från en fältstudie som pågår i Svensk Mjölks regi i två svenska mjölkbesättningar med juverhälsoproblem med *S. aureus* avseende effekten av ett nyligen introducerat mastitvaccin (Startvac®).

## **MATERIAL OCH METODER**

Fältstudien startade i oktober 2010 och beräknas pågå till februari 2012. Denna resultatsammanställning bygger på preliminära data från perioden oktober 2010 till och med augusti 2011.

### **Beskrivning av försöksgårdarna**

#### **Gård A**

Nedanstående data grundar sig på information inhämtad med hjälp av webbrapporten Signaler djurvälstånd i maj 2011.

Besättningen består av en varm lösdrift med 206 kor (årsmedeltal, 75 % SRB, 25 % Holstein) vilka mjölkas i karusell. Årsmedelproduktionen i besättningen var 10 732 kg ECM. Det beräknade tankcelltalet för de senaste 12 månaderna var 149 000 celler/ml och 28 % av korna behandlades för mastit under perioden.

Totalt ingår 258 kor och kvigor i försöket men endast 95 av dessa inkluderades i denna preliminära sammanställning (se urvalskriterier nedan). Av dessa 95 kor vaccinerades 49 stycken medan 46 stycken ingick i den obehandlade kontrollgruppen.

#### **Gård B**

Nedanstående data grundar sig på information inhämtad med hjälp av webbrapporten Signaler djurvälstånd i maj 2011.

Besättningen är en varm lösdrift med 630 kor (årsmedeltal, 25 % SRB, 75 % Holstein) vilka mjölkas i mjölkgrup. Årsmedelproduktionen i besättningen var 11 925 kg ECM. Det beräknade tankcelltalet under de senaste 12 månaderna var 232 000 celler/ml och 0,8 % av korna rapporterades vara behandlade för mastit under perioden. Den låga behandlingsincidensen är troligtvis orsakad av underrapportering.



Totalt ingår 474 kor i försöket. Av dessa inkluderades 174 stycken i denna preliminära undersökning varav 104 stycken tillhörde den vaccinerade gruppen och 70 tillhörde kontrollgruppen.

### **Vaccinationsmetod**

I bägge besättningarna fördelades de kor som ingick i försöket slumpmässigt i vaccinerad eller ovaccinerad grupp beroende på deras öronnummer. Kor med udda öronnummer, försöksgruppen, vaccinerades intramuskulärt med Startvac® medan kor med jämna öronnummer ingick i den ovaccinerade kontrollgruppen. Korna i försöksgruppen vaccinerades fortlöpande med hänsyn till kalvningsdatum. Enligt fabrikantens rekommendation ska en första immunisering ske 45 dagar före förväntad kalvning. En andra dos ska ges 35 dagar senare och en tredje 62 dagar efter den andra immuniseringen. Av praktiska skäl följdes inte detta schema exakt i besättningarna. Gård A vaccinerade grupper av djur två gånger i veckan medan Gård B vaccinerade grupper av djur en gång i veckan.

### **Datainsamling**

Ansvarig för respektive gård dokumenterade datum för vaccinationer och inkalvningsdatum för alla djur liksom för mastitbehandlingar, provtagning av mjölk för bakteriologisk undersökning samt utslagning av kor. Behandlande veterinär rapporterade behandlingar under försöksperioden och var även ansvarig för att skicka in mjölkprover från kor med klinisk eller subklinisk mastit under första till tredje laktationsmånaden till SVA för bakteriologisk undersökning.

Data insamlades från vaccinationsprotokoll, behandlingsprotokoll samt bakteriologiska provsvar. Information om okorrigerat celltal för individuella kor inhämtades från Svensk Mjölks provmjölkkningsredovisning.

### **Databearbetning och statistisk analys**

I denna preliminära resultatbearbetning inkluderades endast kor som deltagit, eller skulle kunnat ha deltagit, vid fyra provmjölkningar efter kalvning under perioden oktober 2010 till augusti 2011.

Följande utkomstvariabler ingick i denna bearbetning; 1) andel kor med mastit på grund av *S. aureus* infektion under de fyra första månaderna efter kalvning, 2) andel kor med celltal >200 000 celler/ml vid de fyra första provmjölkningarna efter kalvning, 3) kocelltal vid första

till fjärde provmjölkningen efter kalvning, samt 4) geometriskt medeltal av celltalet vid de första tre provmjölkningarna respektive provmjölkning 2 till 4 efter kalvning,

Skillnader i ovan nämnda variabler mellan den vaccinerade och ovaccinerade gruppen jämfördes inom besättning dels för alla kor, dels för förstakalvare respektive äldre kor. De kategoriska variablerna (variabel 1 och 2 ovan) analyserades med hjälp av Chi2-test eller Fisher exact test. De kontinuerliga variablerna (variabel 3 och 4 ovan) analyserades med hjälp av Students t-test. Celltalen logaritmerades ( $\log_{10}$ ) innan analys.

## RESULTAT

### Andel kor med mastit på grund av *S. aureus*-infektion

Resultaten från jämförelsen mellan vaccinerade och ovaccinerade grupper avseende mastitförekomst till följd av *S. aureus* infektion från kalvning och 4 provmjölkningar framåt presenteras i Tabell 1 och 2. På gård A sågs inga signifikanta skillnader mellan vaccinerade och ovaccinerade kor men på gård B sågs en signifikant högre andel *S. aureus*-mastiter i den vaccinerade gruppen än i kontrollgruppen då alla kor inkluderades. En liknande tendens sågs även bland de äldre korna men inte hos förstakalvarna.

Tabell 1: Antalet (%) kor med mastit på grund av *S. aureus* infektion bland vaccinerade och ovaccinerade kor på Gård A.

Laktation	Vaccinerade		Ovaccinerade	
	Alla	Antal (%) infekterade	Alla	Antal (%) infekterade
1	22	1 (5)	21	2 (10)
>1	27	5 (19)	25	8 (32)
Alla	49	6 (12)	46	10 (22)

Tabell 2: Antalet (%) kor med mastit på grund av *S. aureus* infektion bland vaccinerade och ovaccinerade kor på Gård B.

Laktation	Vaccinerade		Ovaccinerade	
	Alla	Antal (%) infekterade	Alla	Antal (%) infekterade
1	61	7 (11)	41	2 (5)
>1	43	8 (19)	29	1 (3) (*)
Alla	104	15 (14)	70	3 (4) *

(\*) = Skillnaden mellan vaccinerad och ovaccinerad grupp tenderade att vara signifikant ( $0,05 < p < 0,1$ )

\* = Skillnaden mellan vaccinerad och ovaccinerad grupp var signifikant ( $p < 0,05$ )

### Andel kor med celltal över 200 000/ml efter kalvning

En signifikant skillnad mellan vaccinerade och ovaccinerade kor avseende antal kor över 200 000 celler/ml mjölk sågs på gård A (Tabell 3) men inte på gård B (Tabell 4). På gård B saknades dock provmjölkningssuppgifter vid den första provmjölkningen från en signifikant ( $p < 0,05$ ) högre andel kor i den ovaccinerade gruppen än i den vaccinerade gruppen vilket kan ha påverkat resultaten.

På gård A tenderade andelen kor med celltal över 200 000/ml vara lägre i den vaccinerade gruppen än i kontrollgruppen vid första provmjölkningen efter kalvning både när alla kor inkluderades och när endast förstakalvarna studerades. Vid tredje provmjölkningen var

andelen kor över 200 000/ml signifikant lägre i den vaccinerade gruppen när alla kor inkluderades. Vid övriga provmjölkningar sågs inga signifikanta skillnader.

Tabell 3: Antal (%) kor med över 200 000 celler/ml mjölk vid de första fyra provmjölkningarna efter kalvning på gård A för vaccinerade och ovaccinerade kor

Laktation	Provmjölkning							
	1		2		3		4	
	Vacc n (%)	Ovacc n (%)	Vacc n (%)	Ovacc n (%)	Vacc n (%)	Ovacc n (%)	Vacc n (%)	Ovacc n (%)
1	1 (5)	5 (24) (*)	1 (5)	3 (14)	1 (5)	4 (19)	1 (5)	1 (5)
>1	3 (11)	5 (20)	8 (30)	5 (20)	4 (15)	9 (36)	5 (19)	8 (32)
Alla	4 (8)	10 (22) (*)	9 (18)	8 (17)	5 (10)	13 (28)*	6 (12)	9 (20)

(\*) =skillnaden mellan vaccinerad och ovaccinerad grupp tenderade att vara signifikant ( $0,05 < p < 0,1$ )

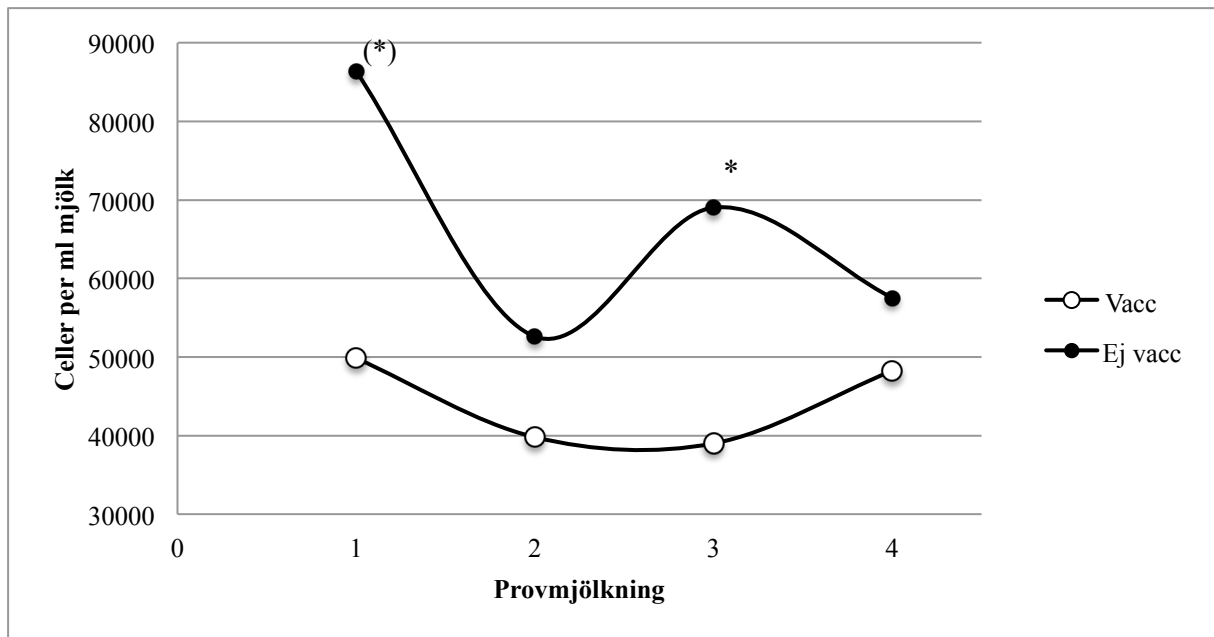
\* = Skillnaden mellan vaccinerad och ovaccinerad grupp var signifikant ( $p < 0,05$ )

Tabell 4: Antal (%) kor med över 200 000 celler/ml mjölk vid de första fyra provmjölkningarna efter kalvning på gård B för vaccinerade och ovaccinerade kor

Laktation	Provmjölkning							
	1		2		3		4	
	Vacc n (%)	Ovacc n (%)	Vacc n (%)	Ovacc n (%)	Vacc n (%)	Ovacc n (%)	Vacc n (%)	Ovacc n (%)
1	13 (21)	8 (19)	11 (18)	6 (15)	10 (16)	6 (15)	13 (21)	8 (20)
>1	7 (16)	7 (24)	7 (16)	5 (17)	9 (21)	8 (28)	12 (28)	10 (34)
Alla	20 (19)	15 (21)	18 (17)	11 (16)	19 (18)	14 (20)	25 (24)	18 (26)

### Celltal vid första till fjärde provmjölkningen efter kalvning

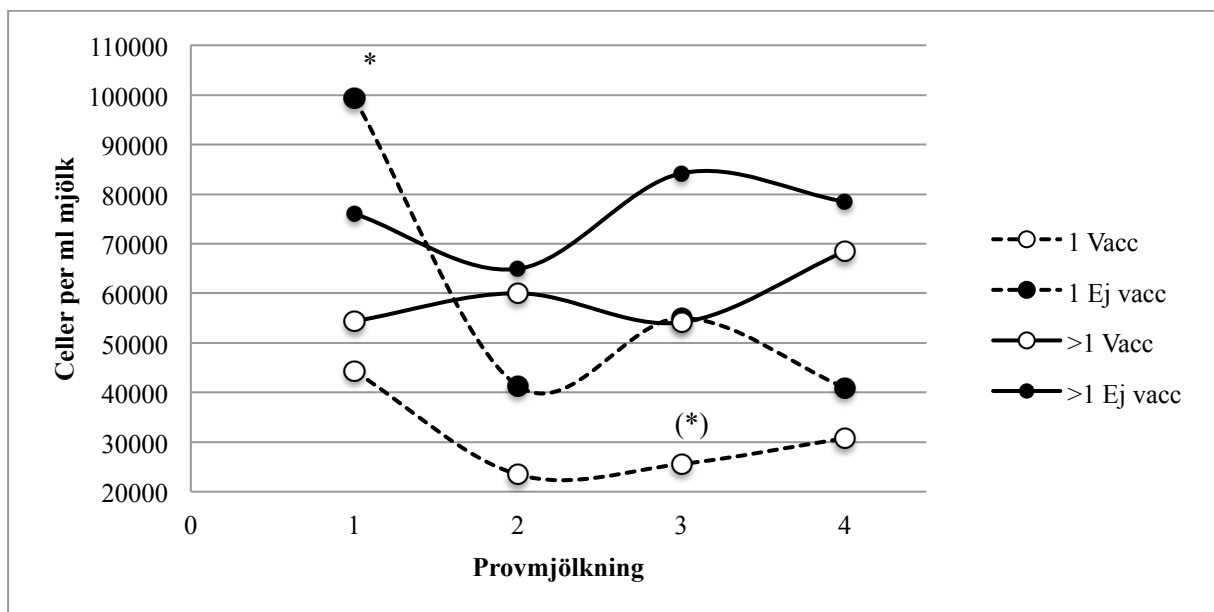
Resultaten för celltal i mjölken under fyra månader efter kalvning redovisas i Figur 1-4. På gård A var celltalen signifikant lägre i den vaccinerade jämfört med den ovaccinerade gruppen vid tredje provmjölkningen när alla kor inkluderades (Figur 1). En liknande tendens sågs även vid första provmjölkningen. Hos förstakalvarna var celltalet signifikant lägre i vaccingruppen vid första provmjölkningen och en liknande tendens sågs även vid tredje provmjölkningen (Figur 2). På gård B tenderade celltalet att vara högre i den vaccinerade gruppen än i kontrollgruppen när alla kor inkluderades (Figur 3) och då förstakalvarna studerades separat (Figur 4) vid tredje provmjölkningen.



Figur 1: Mjölakens celltal (geometriskt medelvärde) för alla vaccinerade och ovaccinerade kor vid de fyra första provmjölkningarna efter kalvning på gård A

.(\*) = Skillnaden mellan vaccinerad och ovaccinerad grupp tenderade att vara signifikant ( $0,05 < p < 0,1$ )

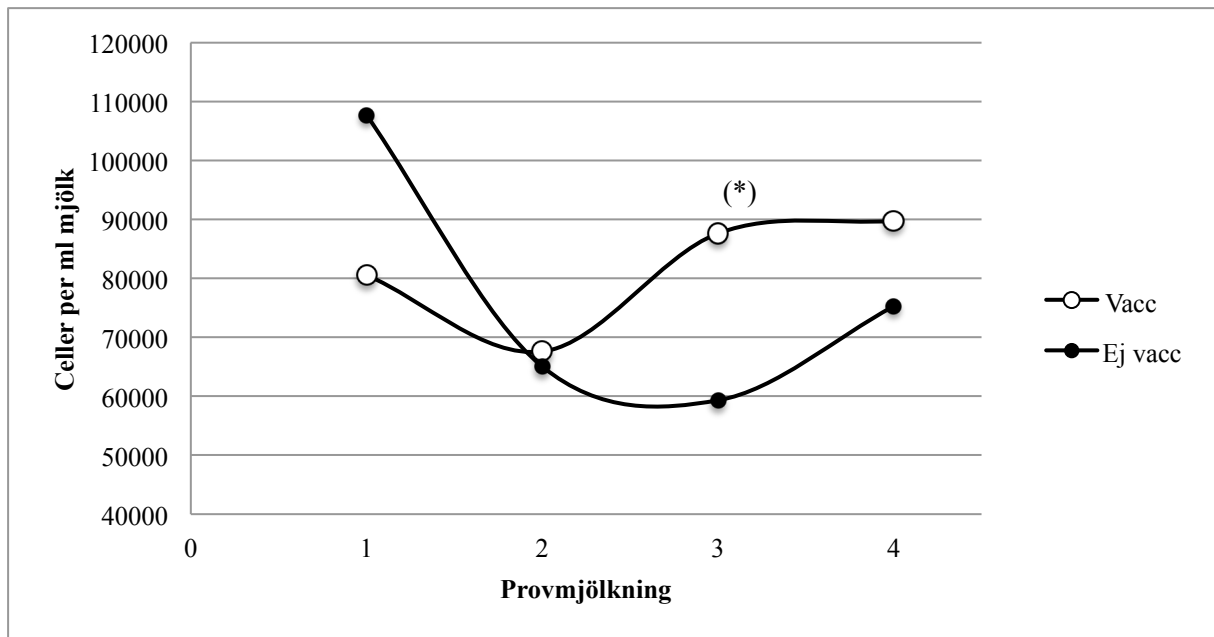
\* = Skillnaden mellan vaccinerad och ovaccinerad grupp var signifikant ( $p < 0,05$ )



Figur 2: Mjölakens celltal (geometriskt medelvärde) för vaccinerade och ovaccinerade grupper av förstakalvare (1) respektive äldre kor (>1) vid de fyra första provmjölkningarna efter kalvning på gård A

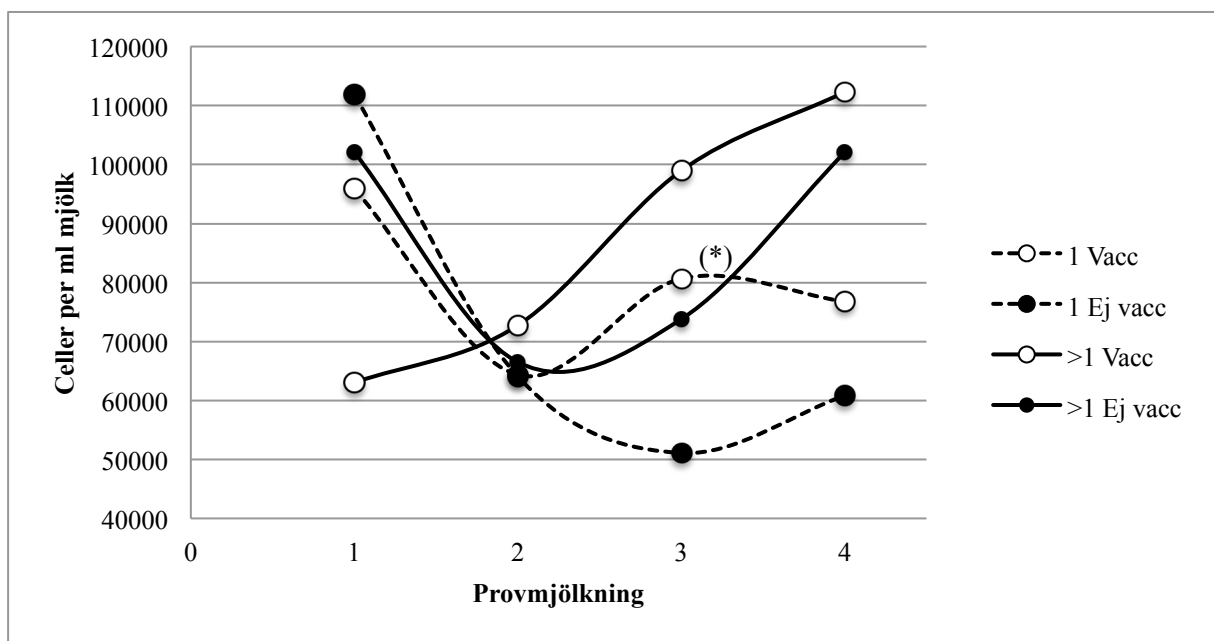
(\*) = Skillnaden mellan vaccinerad och ovaccinerad grupp inom laktation tenderade att vara signifikant ( $0,05 < p < 0,1$ )

\* = Skillnaden mellan vaccinerad och ovaccinerad grupp inom laktation var signifikant ( $p < 0,05$ )



Figur 3: Mjölks celltal (geometriskt medelvärde) för alla vaccinerade och ovaccinerade kor vid de fyra första provmjölkningarna efter kalvning på gård B.

(\*) = Skillnaden mellan vaccinerad och ovaccinerad grupp tenderade att vara signifikant ( $0,05 < p < 0,1$ )



Figur 4: Mjölks celltal (geometriskt medelvärde) för vaccinerade och ovaccinerade grupper av förstakalvare (1) respektive äldre kor (>1) vid de fyra första provmjölkningarna efter kalvning på gård B.

(\*) = Skillnaden mellan vaccinerad och ovaccinerad grupp inom laktation tenderade att vara signifikant ( $0,05 < p < 0,1$ )

## Geometriskt medelcelltal för provmjölkning 1-3 och 2-4 efter kalvning

Vissa skillnader mellan vaccinerade och ovaccinerade kor sågs för det geometriska medelvärdet för provmjölkning 1-3 i gård A. Medelvärdet var signifikant ( $p = 0,04$ ) lägre bland vaccinerade förstakalvare (29 259 celler/ml) än bland motsvarande kontrollgrupp (59 379 celler/ml) och en liknande tendens ( $p = 0,07$ ) sågs när alla kor inkluderades (43 010 celler/ml respektive 66 569 celler/ml). Inga signifikanta skillnader mellan försöks- och kontrollgrupp sågs i gård B. Det geometriska medelvärdet för provmjölkning 2-4 skiljde sig inte signifikant mellan vaccinerade och ovaccinerade kor på någon av gårdarna.

## DISKUSSION

### Andel kor med mastit på grund av *S. aureus*-infektion

På Gård A kunde inga signifikanta skillnader mellan vaccinerade och ovaccinerade djur påvisas avseende incidensen *S. aureus*-mastit och på gård B var andelen *S. aureus*-mastit störst i den vaccinerade gruppen. Resultaten från studien är preliminära men tyder på att immunisering med Startvac® inte gav tillräckligt skydd för att förhindra uppkomst av mastit orsakad av *S. aureus* infektion i de studerade gårdarna. Detta resultat skiljer sig från tidigare fältförsök som utförts för att utvärdera effekten av Startvac®. Studier av March et al. (2010), Ortega Arial de Valesco (2011) och Hofer (2011) visade alla på lägre andel juverinfektioner till följd av *S. aureus* efter vaccination. Det kan dock vara svårt att jämföra resultaten av dessa studier då infektionsstatus innan vaccination skiljer sig åt mellan studierna. I vår studie togs ingen hänsyn till om djuren redan bar på infektionen vid immunisering till skillnad från Marchs studie som endast utgick från *S. aureus*-fria djurgrupper. I vår studie gjordes dessutom endast bakteriologisk undersökning på kor med subklinisk eller klinisk mastit. Vid immunisering av infektionsfria djur ska Startvac® förhindra uppkomsten av biofilm och kan därmed försvåra uppkomsten av en infektion. Resultaten från Hofers studie (2011) grundar sig däremot på en studie av djur varav de flesta redan hade en känd *S. aureus* infektion. Trots att immunisering gjordes på redan infekterade djur kunde *S. aureus* påvisas från färre antal juverdelar ett år efter försökets början. I Hofers studie fanns dock ingen ovaccinerad kontrollgrupp vilket gör det svårt att utvärdera effekten av vaccinet. Definitionen av mastit skiljer sig även åt mellan studierna vilket gör det svårt att jämföra resultaten.

En anledning till att vi inte såg någon minskad incidens av mastit på grund av *S. aureus*-infektion kan vara att Startvac® inte lyckades stimulera det humoral immunförsvaret i tillräckligt hög grad. Felaktig förvaring av vaccin som t.ex. bruten kylkedja, kan påverka

effekten. Även felaktig administration kan bidra till sämre vaccinationseffekter. Dock finns inga rapporter om sådant i denna studie.

Otillräcklig stimulering av det humoral försvaret kan även vara en följd av bristande immuniseringsrutiner. Av praktiska orsaker följde till exempel ingen av gårdarna helt det rekommenderade immuniseringsprotokollet. Inte heller i studien av Ortega Arial de Valesco (2011) följde man det rekommenderade protokollet. Där immuniserades istället hela besättningen först med två grunddoser och därefter var tredje månad. Detta vaccinationsprotokoll skiljer sig betydligt från vårt försök varför det är svårt att jämföra resultaten från denna studie med vår fältstudie. I studien av Ortega Arial de Valesco vaccinerades dessutom alla djur i besättningen till skillnad från vår studie där endast hälften av djuren vaccinerades. Genom att vaccinera alla individer i en besättning, vilket Startvac® rekommenderar, kan man minska det totala smittrycket. Det är dock svårt att utvärdera effekten av Startvac® vid immunisering av hela besättningen då ingen kontrollgrupp finns att tillgå.

En annan orsak till utebliven vaccinationseffekt är möjligheten att vaccinet har en begränsad effekt på de stammar av *S. aureus* som dominerar på dessa gårdar. Immunisering med Startvac® leder enligt Prenafeta et al. (2010) till höga serumtitrar av specifika SAAC antikroppar. Dessa antikroppar syftar till att binda till komponenter i det slimlager som omger bakterien och förhindra vidare uppkomst av biofilm. Vi har ingen kunskap om vilka stammar som dominerar på de två försöksgårdarna och vet därmed inte om de har förmåga att bilda slime och biofilm eller saknar SAAC-komponenten. I en undersökning av förmågan att bilda slime i laboriemiljö hos svenska stammar isolerade från fall av mastit bildade mindre än hälften av isolaten slime (Persson Waller, muntligt meddelande 2011).

På gård B sågs en högre andel mastiter med *S. aureus*-infektion i den vaccinerade gruppen. Detta resultat är svårtolkat och en slutgiltig bedömning kan ej göras innan allt material är bearbetat. Det går dock inte att utesluta att misstag i dokumentationen har gjorts. Även fel i urvalet av djur för provtagning är möjligt. En teori som eventuellt skulle kunna förklara varför vaccination skulle kunna ha en negativ effekt är att korna immuniserades i mjölkgruppen. Injektion i samband med mjölkning skulle kunna orsaka stress vilket kan påverka mjölknedsläppet. Om en ko är mer trögmjölkad kan det predisponera för skador på spene och spenspets och därmed öka risken för *S. aureus*-infektion.



## Effekter på celltalet

Resultaten från gård A tyder på att vaccination hade en positiv effekt på celltalet både i form av sänkt individuellt celltal och lägre andel kor med celltal över 200 000/ml vid vissa provmjölkningar. Dessa resultat överensstämmer med tidigare studier av Ortega Arial de Valesco (2011), March et al. (2010) och Hofer (2011) som syftade till att utvärdera effekten av Startvac®. Det är dock inte möjligt att avgöra om den positiva effekten på celltalen uteslutande är orsakat av en reduktion av *S. aureus* då Startvac® även är riktat mot *E. coli* och KNS.

Vaccinationseffekten var större bland förstakalvarna än i gruppen av äldre kor. Detta kan vara en följd av att kvigor i större utsträckning är fria från infektion vid inkalvning än äldre kor som i många fall redan bär på *S. aureus* sedan tidigare laktation. Immunisering av djur som ej bär *S. aureus* infektion, vilket rekommenderas av Startvac®, innebär större möjligheter för vaccinet att utföra sin verkan.

Till skillnad från gård A visade resultaten från Gård B på högre celltal i den vaccinerade gruppen. Tendensen till högre celltal hos vaccinerade kor ligger i linje med fyndet att andelen kor med mastit orsakad av *S. aureus* infektion var högre bland vaccinerade kor på gård B. Resultaten är svårtolkade och en slutlig bedömning kan ej göras förrän allt material är bearbetat. Variation i vaccinationseffekt mellan gårdar har dock konstaterats även i andra studier. I en studie av Schmitt (2011) där tio franska gårdar ingick sågs stora skillnader mellan gårdarna avseende förändringar i celltal före och efter vaccination av hela besättningen. På två av gårdarna ökade celltalen efter vaccination.

## Praktiska aspekter på vaccinationsförsöket

Båda försöksgårdarna upplevde att immuniseringsförsöket med Startvac® innebar mycket extraarbete t.ex. med att identifiera djur för korrekt immunisering utifrån kalvningsdatum. Båda gårdarna frångick det rekommenderade vaccinationsprotokollet då de inte upplevde det praktiskt genomförbart att vaccinera varje djur på exakt rätt dag. Ett vaccinationsprotokoll där alla djur istället vaccineras samtidigt med jämna mellanrum kan vara enklare att genomföra i stora besättningar.

Gård A upplevde dessutom att vaccinationen tog betydligt längre tid under betessäsongen då de vid ett flertal tillfällen vaccinerade i hagen. En del av kvigorna utgick ur försöket på gård B då de hade svårt att få hem djuren.

## KONKLUSION

Sammantaget visar de preliminära resultaten av fältstudien på en positiv effekt av vaccination med Startvac® på celltalet på gård A. På gård B var däremot juverhälsan sämre i den vaccinerade gruppen än i den ovaccinerade. Det är dock viktigt att påpeka att resultaten är preliminära och endast innefattar en del av det totala antalet kor som ingår i studien. I den slutgiltiga statistiska analysen kommer hänsyn också tas till andra faktorer som celltal före sinläggning, ras, vaccinationstidpunkt, variation i mjölkavkastning och dagar efter kalvning vid provmjölkning. Kor med ofullständig dokumentation kommer att uteslutas ur den slutliga bearbetningen.

Eftersom de preliminära resultaten av studien är motstridiga är det svårt att ta ställning till om Startvac® är ett bra komplement i våra svenska mjölkbesättningar för att reducera juverhälsoproblem på grund av *S. aureus*. En slutbedömning bör vänta tills hela materialet har bearbetats. I slutbedömningen bör även en analys av kostnad relativt nytta göras.

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Abbas A., Lichtman A. (2004) *Basic immunology- Functions and disorders of the immune system*, 2:a uppl. Saunders, Philadelphia, USA
- Almeida R., Matthews K., Cifrian E., Guidry A., Oliver S. (1996) *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science* 79: 1021-1026
- Baselga R., Albizu I., de la Cruz M., del Cacho E., Barberan M., Amorena B. (1993) Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. *Infection and Immunity* 61:4857-4862
- Barkema, H.W., Schukken Y.H., Zadoks R.N. (2006) *Invited review*: The role of cow, pathogen and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science* 89:1877-1895
- Bengtsson B., Ericsson Unnestad H., Ekman T., Artursson K., Nilsson-Öst M., Persson-Waller K. (2009) Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. *Veterinary Microbiology* 136:142-149
- Bharathan M., Mullarky I. (2011) Targeting mucosal immunity in the battle to develop a mastitis vaccine. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 16:409-419
- Biggs A. (2009) *Mastitis in cattle*. Crowood Press: Marlborough, UK
- Bulletin of the International Dairy Federation (2006) *Staphylococcus aureus* intramammary infections. 408/2006, ISSN 02505118
- Calzolari A., Giraud J., Rampone H., Odierna L., Giraud A., Frigerio C., Bettera S., Raspanti C., Hernandez J., Wehbe M., Mattea M., Ferrari M., Larriestra A., Nager R. (1997) Field trials of a vaccine against bovine mastitis 2: Evaluation in two commercial dairy herds. *Journal of Dairy Science* 80:854-858
- Capurro A. (2009) Diagnostic and epidemiological studies of staphylococci in bovine mastitis. Academic Dissertation. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, ISBN 978-91-86195-52-6
- Capurro A., Aspan A., Ericsson Unnestad H., Persson Waller K., Artursson K. (2010<sub>a</sub>) Identification of potential sources of *Staphylococcus aureus* in herds with mastitis problems. *American Dairy Science Association* 93:180-191
- Capurro A., Aspan A., Artursson K., Persson Waller K., (2010<sub>b</sub>) Genotypic variation among *Staphylococcus aureus* isolates from cases of clinical mastitis in Swedish dairy cows. *The Veterinary Journal* 185:188-192
- Carter E.W., Kerr D.E. (2003) Optimization of DNA-based vaccination in cows using green fluorescent protein and protein A as a prelude to immunization against staphylococcal mastitis. *Journal of Dairy Science* 86:1177-1186
- Chang B., Moon J.S., Kang H-M., Kim Y-I., Lee H-K., Kim J-D., Lee B-S., Koo H C., Park Y.H. (2008) Protective effects of recombinant staphylococcal enterotoxin type C mutant vaccine against experimental bovine infection by a strain of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical mastitis in dairy cattle. *Vaccine* 26: 2081-2091

- Cramton S., Gerke C., Schnell N., Nichols W., Götz F. (1999) The intercellular adhesion (ica) lokus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infection and immunity* 67:5427-5433
- Costerton J. W., Stewart P.S., Greenberg E. P. (1999) Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 284:1318-22.
- Denis M., Wedlock D.N., Lacy-Hulbert S.J., Hillerton J.E., Buddle B.M. (2009) Vaccines against bovine mastitis in the New Zealand context: what is the best way forward? *New Zealand Veterinary Journal* 57:132-140
- Derosa D.C., Sordillo L.M. (1997) Efficacy of a bovine *Staphylococcus aureus* vaccine using interleukin-2 as adjuvant. *J Vet Med* 44: 599-607
- Divers T. & Peek S. (2008) *Diseases of dairy cattle*. 2:a uppl. Elsevier: St. Louis. Missouri, USA.
- Dunne M. (2002) Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clinical microbiological reviews* 15:155–166
- Ericsson Unnestad H., Lindberg A., Persson Waller K., Ekman T., Artursson K., Nilsson-Öst M., Bengtsson B. (2009) Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. *Veterinary Microbiology* 137: 90-97
- Götz F. (2002) *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiology* 43:1367–1378
- Giraud J., 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. *Journal of Dairy Science* 80: 845-853
- Haveri M. (2008) *Staphylococcus aureus* in bovine intramammary infection – molecular, clinical and epidemiological characteristics. Academic Dissertation. University of Helsinki, Finland
- Hensen S., Pavicic M., Lohuis J., de Hoog J., Poutrel B. (2000) Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ. *Journal of Dairy Science* 83:1966-1975
- Hofer J., Gigler K.H., Mansfeld D. (2011) Efficacy of the vaccine Startvac in an Austrian dairy herd. Proceedings of *EBF European Buiatrics Forum* Palais du Pharo, Marseille 16-18 november 2011, p. 219
- Hu S., Concha C., Lin F., Persson Waller K. (2003) Adjuvant effect of ginseng extracts on the immune response to immunization against *Staphylococcus aureus* in dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 91:29-37
- Jimenez L.M., Romero C. (2011) Efficacy of vaccination on mastitis epidemiology: Field study. *NMC Annual Meeting Proceedings*, Arlington, Vi, USA, 171-172
- Kauf A., Vinyard B., Bannerman D. (2007) Effect of intramammary infusion of bacterial lipopolysaccharide on experimentally induced *Staphylococcus aureus* intramammary infection. *Research in Veterinary Science* 82:39-46

- Lee J-W., O'Brien C., Guidry A., Paape M., Shafer-Weaver K., Zhao X. (2005) Effect of a trivalent vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis lymphocyte subpopulations, antibody production, and neutrophil phagocytosis. *The Canadian Journal of Veterinarian Research* 69:11-18
- Leitner G., Lubashevsky E., Glickman A., Winkler M., Saran A., Trainin Z. (2003<sub>a</sub>) Development of a *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows 1. Challenge trials. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 93:31-38
- Leitner G., Yadlin N., Lubashevsky E., Ezra E., Glickman A., Chaffer M., Winkler M., Saran A., Trainin Z. (2003<sub>b</sub>) Development of a *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows 1- Field trials. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 93:153-158
- March R., Foix A., Noguera M., Guix R., Prenafeta A. (2010) Efficacy evaluation of a new vaccine against bovine mastitis: field trials results. Presenterat vid NMSM Skørping Danmark 8-9 juni 2010
- Melchior M.B., Vaarkamp H., Fink-Gremmels J. (2006) Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? *The Veterinary Journal* 171: 398-407
- Middleton, JR (2008) *Staphylococcus aureus* antigen and challenges in vaccine development. *Expert Review of Vaccines* 7:805-815
- Middleton J., Luby C., Adams S. (2009) Efficacy of vaccination against staphylococcus mastitis: A review and new data. *Veterinary Microbiology* 134:192-198
- Nielsen C. (2009) Economic Impact of Mastitis in Dairy Cows. Academic Dissertation. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, ISBN 978-91-86195-76-2
- Nickerson S.C., Owens W.E., Boddie R.L. (1993) Effect of a *Staphylococcus aureus* bacterin on serum antibody, new infection and mammary histology in nonlactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 76:1290-1297
- Nordhaug M.L., Nesse L.L., Norcross N.L., Guddings R. (1994<sub>a</sub>) A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. 1. Antibody response. *Journal Dairy Science* 77:1276-1284
- Nordhaug M.L., Nesse L.L., Norcross N.L., Guddings R. (1994<sub>b</sub>) A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. 1. Clinical parameters. *Journal of Dairy Science* 77:1267-1275
- O'Brien C.N., Guidry A.J., Fattom A., Shepard S., Douglass L.W., Westhoff D.C. (2000) Production of antibodies to *Staphylococcus aureus* serotypes 5, 8 and 336 using poly(DL-Lactide-co-glycolide) microspheres. *Journal of Dairy Science* 83: 1758-1766
- Oliveira, M., Bexiga R., Nunes S.F., Vilela C. L. (2011) Invasive potential of biofilm-forming *Staphylococci* bovine subclinical mastitis isolates. *Journal Veterinary Science* 12:95-97
- Ortega Ariel de Valesco R. (2011) Evaluation of the Startvac® vaccine for preventing mastitis on a farm in the north of Spain. Proceeding of *EBF European Buiatrics Forum* Palais du Pharo, Marseille 16-18 november 2011, p. 227

- Pellegrino M., Giraud J., Raspanti C., Nagel R., Odierno L., Primo V., Bogni C. (2008) Experimental trial in heifers vaccinated with *Staphylococcus aureus* mutant against bovine mastitis. *Veterinary Microbiology* 127: 186-190
- Persson Y., Nyman A.K., Grönlund-Andersson U. (2011) Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica* 53:36
- Pereira U.P., Oliveira D.G.S., Mesquita L.R., Costa G.M., Pereira L.J (2010) Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: a systematic review. *Veterinary Microbiology* 148:117-124
- Prenafeta A., March R., Foix A., Casals 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 exopolysaccharide specific antibody production in the protection from *Staphylococcus aureus* induced mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 134: 208-217
- Radostits O., Gay C., Hinchcliff K., Constable P. (2007) *Veterinary medicine – A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10:e uppl. Saunders: Philadelphia, USA.
- Rainard P., Riollet C. (2006) Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary Research* 37:369-400
- Sandholm M., Honkanen-Buzalski T., Kaartinen L., Pyörälä S. (1995) *The Bovine Udder and Mastitis*. University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine.
- Schaffer A.C., Lee J.C (2008) Vaccination and passive immunisation against *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 325: S71–S78
- Shkreta L., Talbot B., Diarra M., Lacasse P. (2004) Immune response to DNA/protein vaccination strategy against *Staphylococcus aureus* induced mastitis in dairy cows *Vaccine* 23:114-126
- Schmitt E. et. coll. (2011) Startvac® new vaccination protocol., implementation preliminary data in ten different herds in the French northwest region *European College of Bovine Health Management* Liege 2011
- Sutra L. & Poutrel B. (1994) Virulence factors involved on the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology* 40:79-89
- Tizard I. (2004) *Veterinary immunology – an introduction* 7:th uppl. Elsevier: Philadelphia, USA.
- Watson D.L. (1984) Evaluation of attenuated, live staphylococcal mastitis vaccine in lactating heifers. *Journal of Dairy Science* 67:2608-2613
- Watson D.L. (1992) Vaccination against experimental staphylococcal mastitis in dairy heifers. *Research in Veterinary Science* 3: 346-353

- Watson D.L., McColl M.L., Davies H.I. (1996) Field trial of a Staphylococcal mastitis vaccine in dairy herds: clinical, subclinical and microbiological assessments. *Australian Veterinary Journal* 74:447-450
- Wilkinson B.J., Holmes K.M (1979) *Staphylococcus aureus* cell surface: Capsule as a barrier to bacteriophage adsorption. *Infection and Immunity* 23:549-552
- Wood P. 2006. *Understanding Immunology*. 2:a uppl. Pearson Education Limited, Essex, England.
- Yoshida K., Ichiman Y., Narikawa S. (1984) Staphylococcal capsular vaccine for preventing mastitis in two herds in Georgia. *Journal of Dairy Science* 67:620-627
- Zecconi A., Cesaris L., Liandris E., Dapra V., Piccinini R. (2006) Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microbial Pathogenesis* 40:177-183

#### **Internet:**

EMA: European Medicines Agency (2009) Scientific discussion Tillgängligt på internet:

[http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/veterinary/medicines/000130/vet\\_med\\_000187.jsp&murl=menus/medicines/medicines.jsp&mid=WC0b01ac058008d7a8](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/veterinary/medicines/000130/vet_med_000187.jsp&murl=menus/medicines/medicines.jsp&mid=WC0b01ac058008d7a8)

Hipra laboratorie (2011) Finns tillgängligt på internet:

[www.hipra.com](http://www.hipra.com)

Läkemedelsverket (2011) Tillgängligt på internet:

[www.lakemedelsverket.se/malgrupp/Halso---sjukvard/Monografier-varderingar/Veterinara-lakemedel/Startvac/](http://www.lakemedelsverket.se/malgrupp/Halso---sjukvard/Monografier-varderingar/Veterinara-lakemedel/Startvac/) (12 januari 2012)

SVF: (2011) Riktlinjer för användning av antibiotika till produktionsdjur: Nötkreatur och gris  
Tillgängligt på internet:

[www.svf.se/sv/Sallskapet/Specialistutbildningar/Hem/Forbundet/Policydokument/Antibiotika\\_policy](http://www.svf.se/sv/Sallskapet/Specialistutbildningar/Hem/Forbundet/Policydokument/Antibiotika_policy) (5 dec 2011)

Bilaga 1:

Tabell 1 (del 1). Sammanställning av publicerade studier rörande vaccination mot mastit orsakad av *Staphylococcus aureus*

Författare	Gruppstorlek i medeltal	Vaccinets ursprung	Vaccintyp	Adjuvant
Watson 1984	4	<i>S. aureus</i> isolerad vid akut klinisk mastit	Levande försvagat helcellsvaccin	Ej angivet
Yoshida et al. 1984	97	<i>S. aureus</i> och <i>S. epidermis</i>	Helcellsvaccin + kapselkomponent	Ej angivet
Watson 1992	14	<i>S. aureus</i>	Avdödat helcellsvaccin + toxoid	FIA <sup>1</sup> och/eller dextran sulfat
Nickerson 1993	4	<i>S. aureus</i> stam JG80	Avdödat helcellsvaccin + toxoidkomp	FIA
Nordhaug et al. 1994 b	54	<i>S. aureus</i> med förmåga att uttrycka pseudokapsel	Avdödat helcellsvaccin + 2 toxoidkomp	mineralolja
Nordhaug et al. 1994 a	54	<i>S. aureus</i> med förmåga att uttrycka pseudokapsel	Avdödat helcellsvaccin + 2 toxoidkomp	mineralolja
Watson et al. 1996	730	2 stammar av <i>S. aureus</i>	Avdödat celcellsvaccin + toxoid	mineralolja
Calzolari et al. 1997	82	<i>S. aureus</i> och <i>Streptococcus spp.</i>	Avdödat helcellsvaccin + kapselkomponent	Ej angivet
Derosa & Sordillo 1997	3	2 kapselbildande stammar	Helcellsvaccin + toxoid	NaCl, FIA eller rBoILcytokine)
Giraud et al 1997	10	<i>S. aureus</i> kapselbildande + Strept. Spp.+ kapselkomponent	Avdödat helcellsvaccin	Aluminium hydroxid
O'brien et al. 2000	5	<i>S. aureus</i> 336 kapselbildande	Konjugerat kapselvaccin	FIA
Carter & Kerr 2003	5	Protein A gen från <i>S. aureus</i> och plasmid från <i>E. coli</i>	DNA-vaccin med uttryck för protein A samt rent protein A	Aluminium hydroxid

<sup>1</sup> = Freud's incomplete adjuvant



Hu et al. 2003	6	<i>S. aureus</i>	Helcellsvaccin samt albuminprotein	Ginsengextrakt, spec. ginseng komponent och aluminiumhydroxid
Leitner et al. 2003a	10	3 stammar av <i>S. aureus</i>	Helcellsvaccin + toxoid	FIA
Leitner et al. 2003b	226	3 stammar av <i>S. aureus</i>	Helcellsvaccin + toxoid	FIA
Lee et al. 2004	5	3 stammar av <i>S. aureus</i> med uttryck för CP 5, 8 och 336	Avdödat helcellsvaccin	FIA eller Aluminiumhydroxid
Shkreta et al. 2004	4	2 gener kopplade till adhesion	DNA vaccin + rekombinant protein	FIA
Kauf et al 2007	8	<i>E. coli</i>	Lipopolysackarid LPS	Nej
Pellegrino et al. 2008	4	Avirulent stam av <i>S. aureus</i>	Levande helcellsvaccin	Nej
Chang et al. 2008	3	Rekombinant protein	Enterotoxin C	Nej
Middleton et al. 2009	45	5 stammar av <i>S. aureus</i>	Lyserat helcellsvaccin	Nej
Prenafeta et al. 2010	4	<i>S. aureus</i> stammar med hög resp låg förmåga att bilda biofilm	Bacterin	olja-baserad

Tabell 1 (del 2). Sammanställning av publicerade studier rörande vaccination mot mastit orsakad av *Staphylococcus aureus*

<b>Författare</b>	<b>Ident friska innan försök</b>	<b>Administrations-sätt</b>	<b>Antal doser</b>	<b>Försöks-inokulering</b>
Watson 1984	Ej angivet	s.c. <sup>2</sup>	2	Ja
Yoshida et al. 1984	Lika stor andel mastiter i båda grupperna	i.m. <sup>3</sup>	2	Nej
Watson 1992	Ja SCC <sup>4</sup> och bakt	s.c., i.m.	2	Ja
Nickerson 1993	Ja SCC och bakt	4 st s.c. 4 st im	2	Ja
Nordhaug et al. 1994 b	Genom klinisk us.	I området för juverlymfknotor	2	Nej
Nordhaug et al. 1994 a	Genom klinisk us.	I området för juverlymfknotor	2	Nej
Watson et al. 1996	Nej	i.m.	2	Nej
Calzolari et al. 1997	Oklart	s.c.	2	Nej
Derosa & Sordillo 1997	Ej angivet	i.m., s.c.	3	Ja
Giraud et al 1997	Ej angivet	s.c.	2	Nej
O'brien et al. 2000	ELISA	1 ml i området för juverlymfknotor och 1 ml i.m.	1 resp 2	Nej
Carter & Kerr 2003	ELISA	i.m., i.d. <sup>5</sup> samt i vulva slh	3	Nej

<sup>2</sup> = subkutan

<sup>3</sup> = intramuskulärt

<sup>4</sup> = somatic cell count

<sup>5</sup> = intradermalt

Hu et al. 2003	ELISA	i.m.	2	Nej
Leitner et al. 2003a	SCC och bakt	s.c. och i.m.	2 och 3	Ja
Leitner et al. 2003b	ELISA	S.c.	2	Nej
Lee et al. 2004	Klinisk us.	i.m.	3	Nej
Shkreta et al. 2004	SCC och bakt	i.m.	2	Ja
Kauf et al 2007	SCC och bakt	intramammärt	1	Ja
Pellegrino et al. 2008	ELISA	s.c.	2	Ja
Chang et al. 2008	ELISA, SCC och bakt	i.m.	3	Ja.
Middleton et al. 2009	Bakt och snabbtest ak.	s.c.	2	Nej
Prenafeta et al. 2010	ELISA	i.m.	2	Ja

---