

FARMISPETSIIFILINE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*'e BAKTERIIN LEHMADELE

1. *Staphylococcus aureus*'e kasvutiheduse ja alfa-hemolüsiini moodustumise optimeerimine komplekssoötmes

R. Lindjärv, T. Schattschneider, J. Kumar, T. Saar, E. Klaassen, M. Kuus

ABSTRACT. *A farmspecific Staphylococcus aureus' bacterin against mastitis of cows. 1. Optimizing of the growth rate and alpha-hemolysin formation by S. aureus in complex medium.* For the elaboration of the farmspecific bacterins production against *S. aureus* mastitis of cows, the growth medium for *S. aureus* was optimized. Three similar experiments with four different medium in 1000 ml Erlenmeyer flasks were performed. The volume of cultivating medium was 500 ml and volume of inoculum was 25 ml OD 0.9 by 650 nm. The basic medium was similar to Feist medium (Arch. Exp. Vet. Med., 1976, 30, 49–57), which was used for cultivating of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. In experiments two intensively alpha-hemolytic strains of *S. aureus* were used.

The results indicated that the modification of Feist medium had good growth density and alpha-hemolysin formation of *S. aureus*. In the optimized complex medium percentage of peptone was increased up to 2 and the supplement of microelements Fe-Mg-Mn sulphates were added. During 24 h at 37 °C, OD 2.98 (1.79×10^9 CFU) by aerobic growth was achieved.

The alpha-toxin content of culture supernatant was estimated by the method of Bernheimer (1988). The culture supernatant tested with sheep erythrocytes and the best result was 12.13 ± 1.85 Hu/ml.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, growth, bacterin medium, alpha-hemolysin formation.

Sissejuhatus

Piimatootmises põhjustavad suurimat majanduslikku kahju lehmade udarapõletikud. Kahjud kajastuvad piimatoodangu languses, kulutustes ravimitele, raviperioodi piima praakimises ja pöördumatute udarakahjustustega lehmade sagedases karjast väljaviimises (Yancey, 1999).

Mastiite tekitavate mikroobide seas on kõige problemaatilisem *Staphylococcus aureus* kui ekstreemselt patogeense potentsiaaliga bakter (Archer, 1998). *S. aureus* on võimeline produtseerima hulgaliselt ja suure varieeruvusega virulentseid produkte, mis jaotatakse kolme rühma:

- a) antifagotsütaarsed faktorid (kapsel ja proteiin A),
- b) eksotoksiinid (hemolüsiinid, enterotoksiinid, leukotoksiin ja eksfoliatiivne toksiin),
- c) ekstratsellulaarsed ensüümid (koagulaas, hüaluronidaas, nukleasid ja fibrinolüsiin).

S. aureus'e vastane ravi on tihti vähese efektiivsusega. Selle põhjuseks on piimanäärmete alveoolidesse moodustuvad fibriinikiududega kaetud mikroabstssid. Nii on ravimite pääsemine infitseeritud koldesse takistatud. Antibakteriaalsete preparaatide laialdane kasutamine on põhjustanud *S. aureus*'e populatsioonides väga ravimresistentsete (multiresistentsete) tüvede teket (Erskine *et al.*, 1993).

S. aureus on enim levinud patogeen ka inimeste hulgas, põhjustades tavaliselt raskeid abstsesse ja nekrootilisi põletikke nii pindmiselt kui ka siseelundites. *S. aureus*'e põhjustatud toidumürgistused inimestel on esinemissageduselt juhtival kohal paljudes maades (Jay, 1996). *S. aureus*'e tekitatud mastiidi profülaktika meetmete seas ei ole levinud immunoprofülaktika. See on tingitud *S. aureus*'e tüvede virulentsuse faktorite suurest varieeruvusest, mis teeb võimatuks efektiivselt toimiva vaktsiini valmistamise suurtes biovabrikutes. Probleemi lahendamiseks on kasutatud farmispetsiifilisi bakteriine e surmatud bakterivaktsiine (Nordhaug *et al.*, 1994; Watson *et al.*, 1996; Giraud *et al.*, 1997; Nickerson *et al.*, 1999; Leitner *et al.*, 2003). Eestis on *S. aureus*'e surmatud vaktsiini lehmadele valmistanud ja katsetanud prof K. Peterson, kuid vaktsiini valmistamiseks ei kasutatud farmispetsiifilisi *S. aureus*'e tüvesid (Peterson jt, 1997). Eesti mastaabis oleks farmispetsiifiliste *S. aureus*'e bakteriinide valmistamine probleemsetele farmidele täiesti võimalik.

S. aureus'e bakteriinide valmistamisel on kasutatud virulentseid ja tugevalt alfa-hemolüütilisi *S. aureus*'e tüvesid. Alfa-hemolüsiin on *S. aureus*'e antigeenses kompleksis üheks olulisemaks immunogeenseks komponendiks (Gammel *et al.*, 1982; Bhakdi, Tranum-Jensen, 1991; Onogava, 2002), seetõttu on püütud *S. aureus*'e kultiveerimise soõtmed koostada nii, et saavutada võimalikult rohket alfa-hemolüsiini produktsiooni.

Käesoleva uurimuse eesmärgiks oli välja töötada optimaalne komplekssoõde, mis sobiks *S. aureus*'e bakteriinide valmistamiseks.

Materjal ja meetodid

Uurimistööd alustati OÜ Tartu Agro Vorbuse piimafarmis. Valiku tegemisel oli määravaks mastiitide probleemi olemasolu.

S. aureus'e tüved.

Uurimistöös kasutati OÜ Tartu Agro Vorbuse piimafarmist isoleeritud *S. aureus*'e kahte tüve: 1) *S.a.V1* tugevalt alfa-hemolüütiline tüvi ja 2) *S.a.V2* topelthemolüütiline (alfa- + beeta-hemolüütiline) tüvi. Isoleeritud tüved olid intensiivselt koagulaaspositiivsed ja moodustasid veriagaril S-vormi kolooniaid. Mõlemad isoleeriti kliinilist mastiiti põdenud lehmadel 2000. a. Bakterioloogiliseks uurimiseks vajalik veriagar valmistati Columbia II Agar Base (Becton Dickinson) baasil, millele lisati 10% defibrineeritud veiseverd. Isoleeritud *S. aureus*'e tüvede biokeemilised omadused selgitati poolautomaatse identifitseerimissüsteemi "Crystal" (Becton Dickinson) abil. Tüvede virulentsete omaduste selgitamisel hinnati hemolüütilisust veriagaril 24 h inkubeerimise järgselt 37 °C ja pärast sellele järgnevat 24 h inkubeerimist toatemperatuuril. Koagulaasitest tehti katseklaasides küüliku vereplasmaga (Becton Dickinson).

Kultiveerimise tingimused.

Komplekssöötme optimeerimise katsed tehti üheliitrites kolbides perioodilises kultiveerimisrežiimis kestusega 30 h. Komplekssöötme erinevate variantide retseptid on toodud uurimise tulemustes. Komplekssöötmed steriiliti autoklaavimisega 30 min 115 °C. Glükoos lisati Kochi aparaadis steriilituna komplekssöötmesse pärast selle autoklaavimist. Söötmete pH reguleeriti alati 7,6-ni. Kahele komplekssöötme variandile lisati enne autoklaavimist 1 ml järgmist mikroelementide segu: 2 g $MgSO_4 \times 7H_2O$; 0,1 g $FeSO_4 \times 7H_2O$; 0,3 g $MnSO_4$, lahustatuna 50 ml destilleeritud vees. Kõigis komplekssöötme retseptides kasutati ühe ja sama partii peptooni ja pärmiekstrakti (Lab M Bacteriological Peptone ja Lab M Yeast Extract). Aminohape L-arginiin oli firma Merck toode. Söötmete pH mõõtmiseks kasutati pH-meetrit ELWRO (Poola). Bakterikultuuri kasvutihedus määrati spektrofotomeetriga Spekol (VEB Carl Zeiss Jena), mille näitudele eelkatsete tulemusena väljakülvide meetodit kasutades töötati välja paralleelne kalibreerimisgraafik, näitamaks optilise tiheduse näidule vastavat bakterite arvu 1ml söötmes. Optiline tihedus määrati lainepikkusel 650 nm. Eelsoojendatud (37 °C) komplekssöötmetesse (500 ml) lisati *S. aureus*'e starterkultuuri 25 ml (kummagi tüve suspensiooni 12,5 ml), optiline tihedus (OD) mõlemal näiduga 0,9. Starterkultuurid kasvatati eraldi veriagaritel 24 h. Vältimaks külmašokki valmistati kasvanud kolooniatest komplekssöötmesse lisatavad starterkultuuride suspensioonid 37 kraadini soojendatud füsioloogilise lahusega. OD määramised komplekssöötme optimeerimise katsetes tehti pärast 10–24 – 30 h kultiveerimist.

Alfa-hemolüsiini aktiivsuse määramine.

Uurimine teostati A. W. Bernheimeri (1988) detailselt kirjeldatud meetodi järgi. Kõigis määramistes kasutati ühe ja sama oina erütrotsüüte. Verd võeti jugulaarveenist 10 ml-sse vaakumkatseklaasi (Venoject Terumo, Belgia). Erütrotsüütide suspensiooni 'standardsuspensioon' 50%-lise hemolüüsi saamiseks valmistati vastavalt kasutatud meetodikale saponiiniga (Merck AG Darmstadt). Tsentrifugimiseks kasutati tsentrifuugi MPW-210 (Poola). Alfa-hemolüsiini sisaldus kultiveerimistel määrati pärast 24 h ja 30 h möödumist spektrofotomeetriga (Spekol) lainepikkusel 545 nm. Tulemus väljendati hemolüütilistes ühikutes (Hü). Üks hemolüütiline ühik on toksiini sisaldava kultiveerimise keskkonna hulk, mis põhjustab 50% erütrotsüütide lüüsumise ja hemoglobiini vabanemise 1%-lises erütrotsüütide lahuses.

Tulemused

Uurimistöös selgitati komplekssöötmes kasutatava peptooni optimaalne kogus ja mikroelementide lisandi vajadus tagamaks *S. aureus*'e tüvede kultiveerimisel suurim bakterite kontsentratsioon ja alfa-hemolüsiini moodustumine kasvukeskkonda. Võrreldi nelja komplekssöödet. Nende koostised on esitatud tabelis 1. Söötmete kasvuomadusi testiti ühtsetes tingimustes ja sama ajavahemiku jooksul. Kokku teostati kolm katset. Tulemused on esitatud joonistel 1 ja 2. Tabel 2 andmed on väljendatud aritmeetiliste keskmistena ja välja on toodud valimite standardhälve.

Tabelis 1 esitatud komplekssöötmetest esimene variant kujutab endast põhisöödet. Variant kaks sisaldab täiendavalt mikroelementide lisandit. Variant number kolm sisaldab põhisöötmelega võrreldes kaks korda rohkem peptooni. Neljas variant erineb põhisöötme kahe komponendiga, sisaldades üheaegselt topelt koguse peptooni ja lisaks mikroelementide lisandit.

Kultiveerimise tulemustest selgus, et *S. aureus*'e intensiivne kasvuperiood jäi kõigis söötmevariantides 10–24 h kultiveerimise ajavahemikku, mille jooksul kasvas nendes kasvukeskkondades praktiliselt valdav osa bakterite koguarvust (joonis 1).

Tabel 1. Komplekssöötme variandid *S. aureus*'ele
Table 1. Variants of complex media for *S. aureus*

Söötme retsept <i>Formula</i>	Söötmevariant ja komponendid / <i>Variant of media and components, g/l</i>			
	nr 1	nr 2	nr 3	nr 4
Na ₂ HPO ₄ × 12H ₂ O	18,0	18,0	18,0	18,0
Glükoos/ <i>Glucose</i>	6,0	6,0	6,0	6,0
Baktopeptoon/ <i>Bactopeptone</i>	10,0	10,0	20,0	20,0
Pärmiekstrakt / <i>Yeast extract</i>	7,0	7,0	7,0	7,0
L-arginiin/ <i>L-arginine</i>	0,5	0,5	0,5	0,5
Mikroelementide lisand, ml/l <i>Supplement of microelements, ml/l</i>	–	2,0	–	2,0

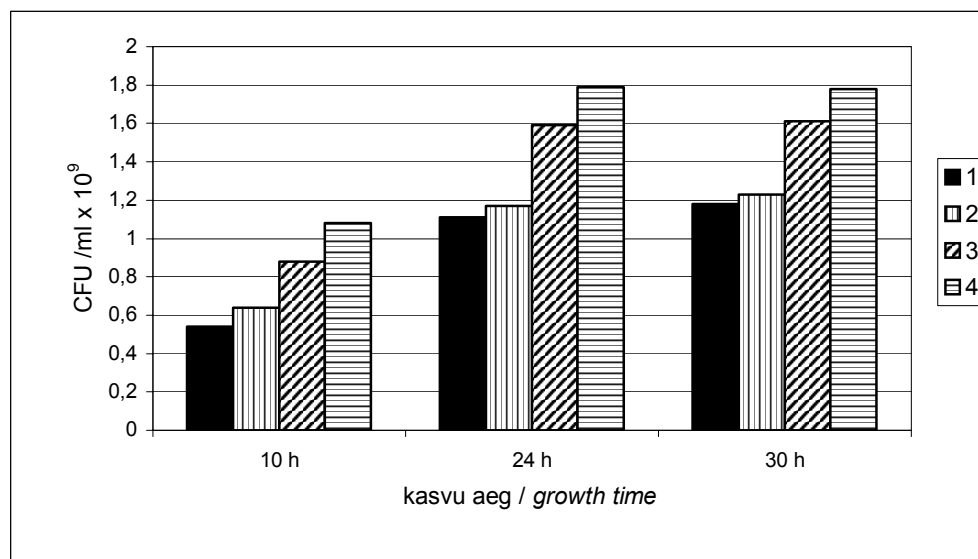
Tabel 2. *S. aureus*'e kasvu ja alfatoksiini tekkimise sõltuvus komplekssoötmes sisalduva peptooni kogusest ja mikroelementide lisandist (arvväärtused väljendavad kolme samalaadse katse keskmisi väärtusi \bar{x} ja valimi standardhälvet)

Table 2. The dependence of *S. aureus* growth and formation of alpha-toxin in the different amounts of peptone and microelement supplements in complex media (values are mean \bar{x} and \pm SD of 3 similar experiments)

Kompleks- söötme variant <i>Variant of complex media</i>	Kasvu aeg (h) / <i>Growth time (hours, h)</i>										
	10 h (19 ⁰⁰)			24 h (9 ⁰⁰)				30 h (15 ⁰⁰)			
	OD	pH	CFU/ ml x10 ⁹	OD	pH	CFU/ ml x10 ⁹	Alfatoksiin ühik/ml <i>Alpha toxin unit/ml</i>	OD	pH	CFU/ ml x10 ⁹	Alfatoksiin ühik/ml <i>Alpha toxin unit/ml</i>
1	0,9±0,03	6,93±0,03	0,54	1,85±0,09	6,37±0,06	1,11	3,87±0,98	1,97±0,11	6,14±0,08	1,18	5,53±0,92
2	1,07±0,09	6,87±0,07	0,64	1,96±0,10	6,33±0,07	1,17	5,53±0,92	2,06±0,10	6,09±0,03	1,23	6,07±0,92
3	1,43±0,09	6,74±0,03	0,88	2,66±0,07	5,89±0,07	1,59	7,73±1,96	2,68±0,14	5,62±0,03	1,61	8,87±1,96
4	1,81±0,04	6,48±0,06	1,08	2,98±0,04	5,81±0,04	1,79	12,13±1,85	2,97±0,03	5,47±0,05	1,78	12,13±1,85

CFU/ml × 10⁹ – mikroobide arv 1 ml-s × 10⁹ / *number of microbes in 1 ml × 10⁹*

OD – mikroobi kasvu optiline tihedus 650 nm juures / *optical density of microbial growth by 650 nm*

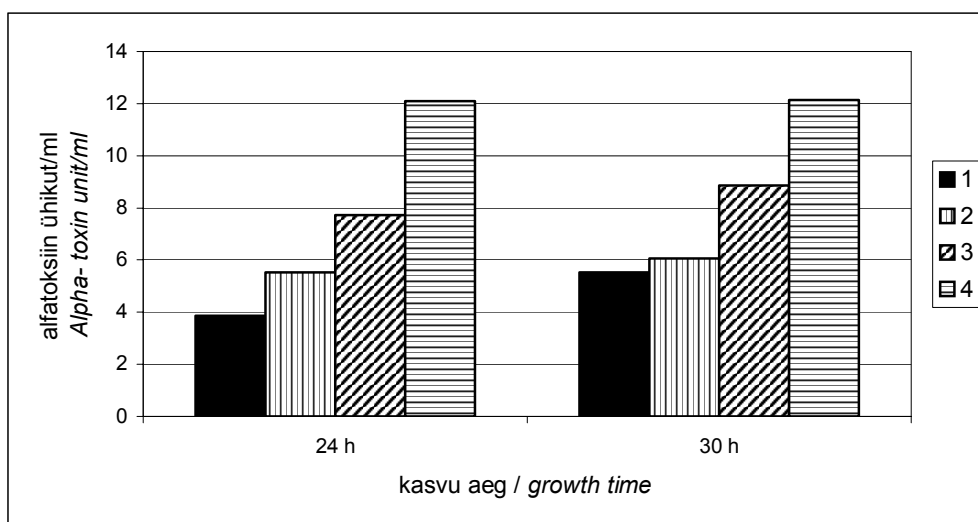


Joonis 1. *S. aureus*'e kasv erinevates komplekssoötmetes
Figure 1. Growth of *S. aureus* in different complex media

S. aureus'e kasvu OD näidud 24 h kultiveerimise järgselt olid kõige kõrgemad neljandas söötmevariandis OD $2,98 \pm 0,04$ ja kõige madalamad esimeses söötmevariandis OD $1,85 \pm 0,09$. Kaheksa tundi hiljem, s.o 30 h kultiveerimise järgselt teostatud OD mõõtmistel täheldati *S. aureus*'e kasvu olulist aeglustumist kolmes söötmes (variandid 1, 2 ja 3). Neljandas söötmes aset leidnud OD vähenemine $2,98 \pm 0,04$ kuni $2,97 \pm 0,03$ on tõestuseks bakterikultuuri suuremise ehk bakteriolüütilise faasi algusele. Võrreldes omavahel neljas söötmevariandis kasvanud *S. aureus*'e kultuuride OD-d kultiveerimiste lõpus selgus, et see oli suurim neljandas söötmes, OD $2,97 \pm 0,03$ ($1,78 \times 10^9$ m.r./ml). Kolmandas söötmevariandis saadi OD näiduks $2,68 \pm 0,14$ ($1,61 \times 10^9$ m.r./ml). Oluliselt väiksem oli *S. aureus*'e kultuuri tihedus söötmevariandis number üks OD $1,97 \pm 0,11$ ($1,18 \times 10^9$ m.r./ml) ja söötmes number kaks OD $2,06 \pm 0,10$ ($1,23 \times 10^9$ m.r./ml).

Kultiveerimisperioodide lõpus teostatud kasvukeskkondade pH mõõtmistel (tabel 2) oli madalaimaks väärtuseks $5,47 \pm 0,05$, mis mõõdeti neljandas söötmevariandis kultiveerimistel, kus bakterite arv oli suurim. Kõige kõrgemale jäi pH väärtus näiduga $6,14 \pm 0,08$ kultiveerimiskeskkonnas number üks, milles bakterite arv oli väikseim.

Järgmise olulise näitajana võrreldi, millises kompleksisöötmes kultiveerimine tagab antud *S. aureus*'e tüvedele kõige intensiivsema alfa-hemolüsiini sünteesimise. Uurimise tulemustest (joonis 2) selgub, et valdav osa alfa-hemolüsiinist sünteesiti *S. aureus*'e tüvede poolt kõigi nelja kompleksisöötme variandi korral 24 h kultiveerimisperioodi jooksul. Sellele järgneva kaheksatunnise kultiveerimisega mõõdeti alfa-hemolüsiini vähest suurenemist kolmes esimeses kompleksisöötmes. Seevastu neljandas kompleksisöötmes alfa-hemolüsiini 24 h jooksul sünteesitule juurde ei lisandunud.



Joonis 2. *S. aureus*'e alfatoksiini moodustumine erinevates kompleksisöötmetes
Figure 2. Formation of the alpha-toxin of *S. aureus* in different complex media

Võrreldes saadud tulemusi omavahel selgus, et suurima koguse alfa-hemolüsiini võimaldas antud *S. aureus*'e tüvedega toota kompleksisöötme neljas variant vastavalt $12,13 \pm 1,85$ Hü/ml. Üle kahe korra vähem $5,53 \pm 0,92$ Hü/ml tekkis alfa-hemolüsiini kompleksisöötme esimeses variandis. Veidi rohkem, $6,07 \pm 0,92$ Hü/ml tekkis alfa-hemolüsiini kompleksisöötme teises variandis. Kolmandas kompleksisöötmes mõõdeti alfa-hemolüsiini hulgaks $8,87 \pm 1,96$ Hü/ml.

Arutelu

Uurimistöös kasutatud põhisisöötme retsepti (tabel 1, söötmevariant 1) kavandamisel tugineti teemakohasest kirjandusest saadud informatsioonile ja mitmetele eelkatsetele. Lõplik valik langes Eesti Agrobiokeskuses (EABK) toodetava sigade punataudi bakteriini valmistamiseks kasutatavale söötmele. See kujutab endast meie modifitseeritud Feist'i kompleksisöödet (Feist, *et al.*, 1976) mille valmistamine on hästi omandatud. Feist'i originaalsöötme võrreldes on söötmemodifikatsioonis välja jäetud Tween 80 kui *S. aureus*'e kasvu mittemõjutav komponent. Söötme koostises olev 0,6% glükoosi sisaldus valiti vastavalt Coleman (1983) teostatud uuringutele.

Aminohappe arginiini lisamine söötme koostisesse on põhjendatud meie uuringutega, kus selgus, et kõik selekteeritud *S. aureus*'e tüved osutusid biokeemilistelt omadustelt intensiivseteks arginiini fermenteerijateks. Arginiini olulist rolli *S. aureus*'e kultiveerimisel ja alfa-hemolüsiini sünteesimisel on rõhutatud ka mitmetes teistes uurimistes (Coleman, Abbas-Ali, 1977; Reisbrodt, Klinke, 1978; Gopalkrishna *et al.*, 1993).

Analüüsinud eelkatsete tulemusi jõudsime järeldusele, et kompleksisöötme esimene variant ei taga bakteriini valmistamiseks vajaliku *S. aureus*'e baktermassi ja alfa-hemolüsiini tekkimist piisaval määral. Seetõttu

huvitas meid, kas on võimalik valitud põhisoõtmega baasil, kui selles suurendada peptooni osa 2%-ni ja juurde lisada mikroelementide segu, saada OD ja alfa-hemolüsiini moodustumise suurenemist. Tavaliselt on bakterioloogilistes söötmetes peptooni või selle sarnaseid valgühendeid 1%.

S. aureus'e kultiveerimisi 2% ja enama peptooni sisaldusega söötmetes on bakterite kasvu intensiivistamiseks kasutatud ka varem (Reisbrodt, Klinke, 1978; Coleman, 1983; Jagiczka *et al.*, 1985).

Alfa-hemolüsiini sünteesi intensiivistamise eesmärgil teostatud uuringutes on alfa-hemolüsiini moodustumise suurenemist saadud *S. aureus*'e kultiveerimissöötmele magneesiumsulfaadi lisamisel (Gopalkrishna *et al.*, 1993) Fe-Mg-Mn-sulfaatide segu lisamine aitas oluliselt alfa-hemolüsiini sünteesi tõsta Reisbrodti ja Klinke (1978) teostatud uuringutes.

Antud uurimistöös nelja komplekssoõtmega variandi võrdluskatsetes *S. aureus*'e kultiveerimisel tagas suurima OD ja alfa-hemolüsiini moodustumise 24 h kultiveerimisega söötmevariant nr 4, milles oli peptooni sisaldust suurendatud 2%-ni ja lisaks sellele veel söödet täiendatud mikroelementide Fe-Mg-Mn sulfaatide seguga. 24 h kultiveerimise periood sobib hästi ka järgnevalt bakteriini valmistamiseks vajaliku tööprotsessiga. Kultiveerimise protsessi pikendamisel 30 tunnini ei tõusnud optimaalse söötmevariandi korral enam alfa-hemolüsiini sisaldus ja OD. Kasvukeskkonna pH langust 30 h kultiveerimisega 5,47±0,05-ni võib lugeda juba liiga madalaks ja protektiivseid antigeene kahjustavaks (Feist *et al.*, 1976).

Madalamate OD ja alfa-hemolüsiini Hü näitude põhjuseks söötmevariantides nr 1, 2 ja 3 tuleb eelkõige pidada valgulise toitefaktori defitsiiti. Selle kinnituseks on suuremate OD ja Hü näitude tulemus söötmes nr 3, kus efekt saadi üksnes peptooni koguse tõstmisega 2%-ni söötmes.

Seevastu sünergeetilist efekti OD ja alfa-hemolüsiini optimaalsete näitude saamisel andis üheaegne peptooni kontsentratsiooni tõstmine ja mikroelementide lisamine söötmesse.

S. aureus'e alfa-hemolüsiin kuulub tsütotoksiinide hulka ja omab *S. aureus*'e tekitatud haiguste patogeneesis võrdlemisi olulist rolli. Tema toksilisus on seotud mitte ainult erütrotsüütide, vaid ka mitmete teiste rakkude seintesse pooride tekitamisega, mis lõpptulemusena põhjustab raku surma ja osmootse lüüsi (Bhakdi Tranum-Jensen, 1991).

Tõestatud on *S. aureus*'e alfa-hemolüsiini osa bakteriaalse biofilmi moodustumisel (Caiazza, O'Toole, 2003). See kujutab endast *S. aureus*'e kasvuvormi mitmekihilise kilena, mis suurendab haigustekitaja resistentsust ravimitele.

Samas on *S. aureus*'e alfa-hemolüsiin tuntud ka tugeva antigeenina ja immunostimulaatorina, mis anatoksiinina tõstab neutrofiilsete leukotsüütide fagotsütoosi aktiivsust *S. aureus*'e intratsellulaarsel hävitamisel (Gemmel *et al.*, 1982).

Alfa-hemolüsiini mõõtmiseks kasutatud spektrofotomeetiline meetod (Bernheimer, 1988) võimaldab mõõtmisi standardiseerida ja vähendada oluliselt eri aegadel teostatud mõõtmistel tekkida võivaid ebatäpsusi.

S. aureus'e alfa-hemolüsiini suhtes on väga tundlikud küüliku erütrotsüüdid. Oina erütrotsüütide tundlikkus moodustab küüliku erütrotsüütide tundlikkusest 4% (Bernheimer, 1988).

Uurimistöös kasutati oina erütrotsüüte sellepärast, et ühelt ja samalt oinalt korduvate ja kvaliteetsete hüübimata vereproovide võtmine on hõlpsam kui küülikult.

Kokkuvõte

Farmispetsiifiliste *S. aureus*'e bakteriinide valmistamiseks vajaliku kultiveerimissöötme optimeerimisel selgus, et Feisti ja kaasautorite poolt väljatöötatud sööde, mis originaalvariandina oli mõeldud *Erysipelothrix rhusiopathiae* bakteriini tootmiseks, sobib modifitseeritud kujul ka *S. aureus*'e kultiveerimiseks. Suurendades söötme koostisesse kuuluva peptooni hulka 2%-ni ja lisades mikroelementide Fe-Mg-Mn sulfaatide segu, saadi 24 h kultiveerimisel 37 °C *S. aureus*'e kasvutiheduseks $1,79 \times 10^9$ m.r./ml ja alfa-hemolüsiini sisalduseks söötmes 12 Hü/ml.

Uurimistega lahendati otsustava tööloigu teostusviis, tagamaks *S. aureus*'e farmispetsiifiliste bakteriinide valmistamine.

Uurimistöös on teostatud Eesti Teadusfondi finantseerimisel (grant 4097).

Kasutatud kirjandus

- Archer, G. L. 1998. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. – J. Clin. Infect. Dis., 26 (5), p. 1179–1181.
- Bernheimer, A.W. 1988. Assay of hemolytic Toxins. – Methods Enzymology, 165, p. 213–217.
- Bhakdi, S., Tranum-Jensen, J. 1991. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. – Microbiol. Rev., vol. 55, p. 733–751.
- Caiazza, N. C., O'Toole G. A. 2003. Alpha-toxin is required for biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. – J. Bacteriology, 185 (10), p. 3214–3217.
- Coleman, G., Abbas-Ali, B. 1977. Comparison of the patterns of increase in alpha-toxin and total extracellular protein by *Staphylococcus aureus* (Wood 46) growth in media supporting widely differing growth characteristics – Infect Immun., vol. 17, p. 278–281.

- Coleman, G. 1983. The Effect of Glucose on the Differential Rates of Extracellular Protein and alpha Toxin Formation by *Staphylococcus aureus* (Wood 46). – Archiv Microbiology, 134, p. 208–211.
- Erskine, R. J., Kirk, J. H., Tyler, J. W., De Graves, F. J. 1993. Advances in the therapy for mastitis – Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract., vol. 9, p. 499–517.
- Feist, H., Flossman, K. D., Erler, W. 1976. Einige Untersuchungen zum Nährstoff bedarf der Rotlaufbakterien. – Archiv für experimentelle Veterinärmedizin, Band 30, H. 1, S. 49–57.
- Gemmel, C. G., Peterson, P. K., Schmeling, D. J., Quie, P. G. 1982. Effect of staphylococcal alpha-toxin on phagocytosis of staphylococci by human polymorphonuclear leucocytes. – Infection and Immunity vol. 38, p. 975–980.
- Giraud, A. J., Calzolari, H., Rampone, A. T., Girando, C., Bogni, A., Larriesta, R., Nagel, R. 1997. Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 1. Evaluation Heifers. – J. Dairy Sci. vol. 80, p. 845–853.
- Gopalkrishna, K., Hegde, B. K., Shivananda, P. G. 1993. A modified chemically defined medium for *Staphylococcus aureus*. – Indian Journal of Experimental Biology, vol. 31, p. 948–950.
- Hume, E. B. H., Dajcs, J. J., Moreau, J. M., O'Callaghan, R. J. 2000. Immunization with Alpha-Toxin Toxoid Protects the Cornea against Tissue Damage during Experimental *Staphylococcus aureus* Keratitis – Infect Immun., vol. 68, p. 6052–6055.
- Jagicza, A., Balla, P., Zsidai, J. 1985. Large-scale Production of Staphylococcus Alpha Toxin in Fermentor – The Staphylococci Proceedings of V International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections. Ed. J. Jeljaszewicz. Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag, p. 267–269.
- Jay, J. M. 1996. Staphylococcal gastroenteritis. – Modern Food Microbiology 5-th ed., New York: Chapman and Hall, 661 pp.
- Leitner, G., Krifucks, O., Glickman, A., Younis, A., Saran, A. 2003. *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis: virulence antibody production and protection from challenge in a mouse model – FEMS Immun. and Medical Microbiology, vol. 35, 2, p. 99–106.
- Nickerson, S. C., Owens, W. E., Tomita, G. M., Widel, P. W. 1999. Vaccinating dairy heifers with a *Staphylococcus aureus* bacterin reduces mastitis at calving. – Large Anim. Practice, vol. 3, p. 16–28.
- Nordhaug, M. L., Nesse, L. L., Norcross, N. L., Gudding, R. 1994. A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. 1. Clinical parameters. – J. Dairy Sci. vol. 77, p. 1267–1275.
- Onogava, T. 2002. Staphylococcal α -toxin synergistically enhances inflammation caused by bacterial components. – FEMS Immunology and Medical Microbiology, vol. 33, p. 15–21.
- Peterson, K., Klaassen, M., Klaassen, E., Lindjärv, R., Zereen, A. 1997. Lakteerivatel lehmadel *S. aureus*'e vaktsiini kasutamise esialgsetest tulemustest – Veterinaarmeditsiin 97, Tartu, lk 89–95.
- Reisbrodt, R., Klinke, E. 1978. Production of *S. aureus* α -Hemolysin in the nutrient medium free of admixtures. – J. Microbiology and Immunology, 5, p. 93–96.
- Watson, D., Mc Coll, M., Davies, H. 1996. Field trial of a staphylococcal mastitis vaccine in dairy herds: clinical subclinical and microbiological assessments. – Austr. Vet. J., vol. 74, No. 6, p. 447–450.
- Yancey, R. J. 1999. Vaccines and Diagnostic Methods for Bovine Mastitis: Fact and Fiction. – Advances in Veterinary Medicine, vol. 41, p. 257–273.

A Farmspecific *Staphylococcus aureus*' bacterin against mastitis of cows

1. Optimizing of the growth rate and alpha-hemolysin formation by *S. aureus* in complex medium

R. Lindjärv, T. Schattschneider, J. Kumar, T. Saar, E. Klaassen, M. Kuus

Summary

Staphylococcus aureus is a major causative agent of the mastitis of cows, that continue to cause economic losses in milk production and reduce the welfare of animals. Attempts to vaccinate heifers or lactating cows against *S. aureus* to reduce mastitis have been undertaken with varying success. Considerable strain variations between herds and bacterins composition may explain by the differences in outcome of these trials.

In *S. aureus* pathogenicity the alpha-hemolysin is thought to be an important factor. It is a pore-forming cytotoxin and is extremely potent, causing the lysis of erythrocytes and several other, types of cells (Onogava, 2000). Alpha-hemolysin is required for biofilm formation by *S. aureus* (Caiazza, O'Toole, 2003). But *S. aureus* alpha-hemolysin is known as a good antigen and it containing in bacterin composition is essential (Gemmel *et al.*, 1982; Yancey, 1999; Hume, *et al.*, 2000). For the elaboration of the farmspecific bacterins against of *S. aureus* mastitis of cows the growth medium for *S. aureus* cultivation was optimized. The studies were carried

out in the department of infectious diseases of Estonian Agricultural University and in Estonian Agrobiocentre. In experiments two intensively alpha-hemolytic strains of *S. aureus* were used. For estimation the intensity of hemolysins production of isolated *S. aureus* strains a common 10% bovine blood agar was prepared. For basic agar Columbia Agar Base (Becton Dickinson) was used. The zones of hemolysin were estimated after 24 h incubation in 37 °C and after that kept it 24 hours in room temperature. For biochemical identification of isolated strains a semiautomated testsystem "Crystal" (Becton Dickinson) were used. Coagulase testing with lyophilized plasma of rabbit (Becton Dickinson) in tubes were performed.

Three similar experiments with four different of complex media in 1000 ml Erlenmeyer flasks were performed (Table 1). The volume of cultivating medium was 500 ml and volume of inoculum was 25 ml, OD 0,9 by 650 nm. The basic medium (variant 1) was similar to Feist medium (Arch. Exp. Vet.Med., 1976, 30, p. 49–57) which was used for cultivating of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. The basic medium consisted of (g/litre): Na₂HPO₄×12 H₂O 18,0; Glucose 6,0; Bactopeptone 10,0; yeast extract 7,0; L-arginine 0,5. In two variants of media were added a supplement of trace elements of 1 ml/500ml. The supplement consisted of MgSO₄×7 H₂O 2,0; FeSO₄×7 H₂O 0,1; MnSO₄ 0,3; solved in 50 ml destillated water. Sterilization of media was achieved for 30 min. at 115 °C in autoclave. Solution of glucose was sterilized in Koch apparatus and added to basic medium after autoclavating. The pH of the medium was regulated up to 7,6. Most components of media were purchased from Lab M. L-arginine was product of Merck. Bacterial growth was determined by measuring OD 650 nm using Spectrophotometer Spekol (VEB C. Zeiss Jena). The CFU were confirmed by serial dilutions and surface plating. Alpha-hemolysin content in cultivating media were measured by the detailed described technique of Bernheim (1988). One unit of hemolytic activity is defined as that amount of test solution liberating half of the total hemoglobin in the erythrocytes.

In the experiments erythrocytes from the one sheep were used. It is known that rabbit erythrocytes are highly sensitive to staphylococcal alpha-hemolysin, whereas sheep erythrocytes are about 4% as sensitive as rabbit cells.

The results indicated that the modified Feist medium had good growth density and alpha-hemolysin formation of *S. aureus*. A synergetic effect was achieved when the optimized complex medium percentage of peptone was increased up to 2 and the supplement of microelements Fe-Mg-Mn sulphates was added. During 24 h at 37 °C OD 2,98 (1,79×10⁹ CFU) by aerobic growth was achieved (Table 2, Figure 1). Alpha-hemolysin content of culture supernatant was obtained 12,13 ± 1,85 Hu/ml (Figure 2).

Increasing the volume of peptone or adding microelements to medium 2 and 3 obtained lower OD and alpha-hemolysin amount. In cases when components were added separately the synergetic effect not appeared.

The medium is easy to prepare from inexpensive and widely available components.

The study was financially supported by the Estonian Science Foundation (Grant No. 4097).