

KOAGULAASINEGATIIVISTEN STAFYLOKOKKIEN AIHEUTTAMA UTARETULEHDUS NAUDALLA

– kirjallisuuskatsaus ja patogeneesitutkimus kokeellisen infektiomallin avulla



©Heidi Hiitiö

ELK Heidi Hiitiö

Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma

Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen osasto, tuotantoeläinten terveyden- ja sairaanhoito

Eläinlääketieteellinen tiedekunta

Helsingin yliopisto

2011

Tiedekunta - Fakultet – Faculty		Osasto - Avdelning – Department	
Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen osasto	
Tekijä - Författare – Author			
Hiitiö Heidi Kristiina ELK			
Työn nimi - Arbetets titel – Title			
Koagulaasinegatiivisten stafylokokkien aiheuttama utaretulehdus naudalla –kirjallisuuskatsaus ja patogeenesitutkimus kokeellisen infektioimallin avulla			
Oppiaine - Läroämne – Subject			
Tuotantoeläinten terveyden- ja sairaanhoito			
Työn laji - Arbetets art – Level	Aikä - Datum – Month and year	Sivumäärä - Sidoantal – Number of pages	
Lisensiaatin tutkielma	2.5.2011	50	
Tiivistelmä - Referat – Abstract			
<p>Koagulaasinegatiivisia stafylokokkeja (KNS) on pidetty ja osittain pidetään edelleenkin vähäpätöisinä utaretulehdusta aiheuttavina bakteereina. Tämä on johtunut niiden aiheuttaman utaretulehduksen lievästä taudinkuvasta ja korkeasta paranemisprosentista, verrattuna esimerkiksi koagulaasipositiivisen <i>Staphylococcus aureuksen</i> aiheuttamaan utaretulehdukseen. Utaretulehdusdiagnoosissa on näinollen tyydytty määrittämään KNS:t ainoastaan ryhmätasolle, ei lajitasolle.</p> <p>KNS:n esiintyvyys utaretulehdusten aiheuttajina on lisääntynyt jatkuvasti. Niistä on tullut Suomessa ja monessa muussakin maassa yleisimmän utaretulehdusnäytteistä eristetty taudinaiheuttaja. Joillakin tiloilla KNS:t ovat voineet muodostua jo karjaongelmaksikin. Tämä on herättänyt tutkijoiden ja karjanomistajien kiinnostuksen kyseistä bakteeriryhmää ja sen merkitystä kohtaan. Maidontuottajia KNS-bakteeriryhmä kiinnostaa eniten maidon laadun kannalta, koska KNS-tulehdus aiheuttaa muutoksia maidossa ja nostaa solulukua. KNS-tulehdukset ovat yleisimpiä ensikoilla, jotka ovat karjojen uudistumisen perusta.</p> <p>Kirjallisuuskatsauksessa perehdytään tämänhetkiseen tietoon KNS:n yleispiirteistä, niiden esiintyvyyteen, merkitykseen utaretulehduksen aiheuttajana, mikrobilääkeresistenssiin, etiologiaan ja taudinaiheutuskykyyn. Lisäksi käsitellään utareen puolustusmekanismeja sekä maidon tulehdusindikaattoreita. Kirjallisuuskatsauksen lopussa keskitytään KNS-tulehdusten hoitoon ja ehkäisyyn.</p> <p>Kokeellisessa osassa kuvataan tekemämme tartutuskoee, jossa kahdeksaan kerran poikineeseen lehmään tartutettiin peräkkäin <i>S. epidermidis</i> ja <i>S. simulans</i>. Tartutuksen jälkeen seurassimme mm. lehmien yleisoireita, maitomäärää, maidon solupitoisuutta sekä maidon entsyymiaktiivisuuksia. Koejärjestelyt perustuivat Simojoki ym. vuonna 2005 tekemään pilottikokeeseen. Kokeessa havaittiin eroavaisuuksia käyttämiemme KNS-lajien aiheuttamissa utaretulehduksissa. Tulosten perusteella voitiin todeta, että <i>S. simulans</i> aiheuttaa lehmälle voimakkaamman tulehdusvasteen kuin <i>S. epidermidis</i>.</p> <p>Lisätietoa eri KNS-lajien ominaisuuksista kaivataan edelleen ja uusia tutkimuksia julkaistaankin jatkuvasti. Jos tulevissa tutkimuksissa saadaan yhä enemmän todisteita KNS:n välisistä taudinaiheutuskyvyn eroista, epidemiologiasta sekä resistenssitilanteesta, uskon, että koagulaasinegatiivisia stafylokokkeja aletaan tyyppittää lajitasolle asti. Lajitason tietämys mahdollistaisi yhä tehokkaampien utareterveys suunnitelmien tekemisen KNS-tartuntojen ehkäisyä varten sekä yksityiskohtaisempien hoito-ohjeiden antamisen.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords			
Koagulaasinegatiivinen stafylokokki, KNS, utaretulehdus, hieho, lehmä, tartutus			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Viikin kampuskirjasto			
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) – Instruktor och ledare – Director and Supervisor(s)			
Työn johtaja: prof. Satu Pyörälä, ohjaaja ELL Heli Simojoki			

SISÄLLYSLUETTELO

I JOHDANTO	4
II KIRJALLISUUSKATSAUS.....	6
1. YLEISTÄ STAFYLOKOKEISTA.....	6
1.1 <i>Staphylococcus spp.</i>	6
1.2 Koagulaasinegatiiviset stafylokokit (KNS).....	7
1.3 Utaretulehdusta aiheuttavien KNS:n määrittäminen lajitasolle	8
2. KNS:N MERKITYS NAUDAN UTARETULEHDUKSESSA	10
2.1 Esiintyvyys	10
2.2 Taloudellinen merkitys.....	13
2.3 Utaretulehdusta aiheuttavien KNS:n mikrobilääkeresistenssi.....	14
3. KNS:N ETIOLOGIA JA TAUDINAIHEUTUSKYKY	15
4. UTAREEN PUOLUSTUSMEKANISMIT	18
4.1 Mekaaninen ja fysiologinen puolustus.....	18
4.2 Humoraalinen puolustus.....	19
4.3 Soluvälitteinen puolustus.....	19
5. TULEHDUSINDIKAATTORIT MAIDOSSA	20
5.1 Somaattiset solut (Somatic cell count, SCC)	21
5.2 NAGAasi.....	21
5.3 Akuutin faasin proteiinit (APP)	22
6. KNS AIHEUTTAMAN UTARETULEHDUKSEN HOITO.....	22
7. KNS AIHEUTTAMAN UTARETULEHDUKSEN EHKÄISY	24
III KOKEELLINEN OSUUS.....	26
1. TUTKIMUKSEN TARKOITUS.....	27
2. AINEISTO JA MENETELMÄT	27
2.1 Eläimet	28
2.2 Bakteerikannat	28
3. TARTUTUSKOE	29
3.1 Näytteenotto-protokolla	30
4. TULOKSET	33
4.1. Bakteerit.....	33
4.2 Oireet	34
4.2.1 Ruumiinlämpö.....	35
4.2.2. Utareen ja maidon arviointi	36
4.3 Maitomäärä.....	37
4.4 Maidon solupitoisuus.....	38
4.5 NAGAasi (N-asetyyli-beta-D-glukosaminidaasi)	40
5. POHDINTA	41
IV LÄHTEET:	46

I JOHDANTO

Koagulaasinegatiivisia stafylokokkeja (KNS) on pidetty ja osittain pidetään edelleenkin vähäpätöisinä utaretulehdusta aiheuttavina bakteereina. Tämä on johtunut niiden aiheuttaman utaretulehduksen lievästä kliinisestä taudinkuvasta, verrattuna esimerkiksi koagulaasipositiivisen *Staphylococcus aureuksen* aiheuttamaan utaretulehdukseen.

KNS:n esiintyvyys utaretulehdusten aiheuttajina on kuitenkin lisääntynyt jatkuvasti niin Suomessa (Pitkälä ym. 2004) kuin muuallakin maailmassa (Bradley ym. 2007, Waage ym. 1999, Nevala ym. 2004, Rajala-Shultz ym. 2004, Tenhagen ym. 2006, Sampimon ym. 2009). Tämä on herättänyt tutkijoiden ja tilallisten kiinnostuksen kyseistä bakteeriryhmää ja sen merkitystä kohtaan. Tutkimuksissa on yritetty saada lisätietoa koagulaasinegatiivisten stafylokokkien aiheuttamista tulehduksista, niiden säilymisestä utareessa, taudinaiheutuskyvystä eli virulenssista ja isäntä-mikrobivuorovaikutuksesta. On myös tutkittu KNS:n esiintyvyyttä suhteessa poikimisajankohtaan ja vuodenaikoihin, vertailtu hiehojen ja lehmien sairastuvuutta, sekä kartoitettu hoitovaihtoehtoja ja mikrobilääkeresistenssiä.

Maidontuottajia KNS-bakteeriryhmä kiinnostaa eniten maidon laadun kannalta. Suomessa ja muutamissa muissa EU-maissa maidosta maksetaan parempaa hintaa sen mukaan, mitä laadukkaampaa maito on, toisin sanoen, mitä vähemmän siinä on soluja. KNS-tulehdus aiheuttaa muutoksia maidossa ja nostaa solulukua (Taponen ym. 2007, Simojoki ym. 2008), jolloin maitoa joudutaan lypsämään sivuun, jos halutaan tuottaa E-luokan maitoa (< 250 000 solua/ml). KNS:n aiheuttaman utaretulehduksen yhteydessä ei ole havaittu yhtä merkittävää tuotoksen laskua kuin esimerkiksi *S. aureuksen* infektoimilla lehmillä (Gröhn ym. 2004). Edellä mainitussa tutkimuksessa KNS-utaretulehdukseen sairastuneet lehmät olivat kuitenkin alun perin olleet korkeatuottoisempia kuin vertailuryhmän eläimet, joten menetyksiä on saatettu aliarvioida (Gröhn ym. 2004).

Joillekin tiloille KNS-utaretulehdus on voinut muodostua jo karjaongelmaksi. Tiedonpuute esimerkiksi KNS-lajien tarttuvuuden, taudinaiheutuskyvyn sekä ehkäisykeinojen suhteen voi ahdistaa niin hoitavia eläinlääkäreitä kuin tilallisiakin. Näillä tiloilla on usein korkea tuotos ja vain vähäinen määrä muiden merkittävämpien

taudinaiheuttajien, kuten *S. aureuksen*, aiheuttamia utaretulehduksia. Kyseisten tilojen kohdalla olisi utareterveysohjelmaa varten hyvä tietää, onko taustalla joku tietty KNS-laji ja miten sitä vastustettaisiin mahdollisimman tehokkaasti.

Keskustelu käy edelleen vilkkaana siitä, kuinka merkityksellisiä KNS:t ovat. Mielipiteet jakautuvat lähinnä sen mukaan, minkä laatuista maitoa meijerit kussakin maassa ottavat vastaan. Yhdysvalloissa kiinnostus KNS:a kohtaan on vähäistä (liittovaltiotasolla meijeriin toimitettavan maidon virallinen laaturaja on < 750 000 solua/ml), Pohjoismaissa kiinnostusta on huomattavasti enemmän.

Tämän liseniaattityön myötä perehdyin koagulaasinegatiivisten stafylokokkien yleispiirteisiin, niiden merkitykseen naudan utaretulehduksen aiheuttajina ja taudinaiheutuskykyyn, sekä KNS:n aiheuttamien utaretulehdusten hoitoon ja ennaltaehkäisyyn. Tutkimusosassa tutkimme kokeellisen infektiomallin avulla kahden eri KNS-lajin, *S. epidermidiksen* ja *S. simulansin* taudinaiheutuskykyä naudan utaretulehduksessa.

II KIRJALLISUUSKATSAUS

1. YLEISTÄ STAFYLOKOKEISTA

1.1 *Staphylococcus spp.*

Stafylokokit ovat fakultatiivisesti anaerobeja, Gram-positiivisia kokkeja. Ne kuuluvat *Micrococcusten*, *Rothioiden* ja *Planococcusten* kanssa samaan *Micrococcaceae* – heimoon (Seuna 2002, Quinn ym. 2002). Stafylokokkisukuun kuuluu runsaasti lajeja: stafylokokit voidaan jakaa yli 40 lajiin ja alalajiin (Devriese ym. 2002). Ainakin kolmenkymmenen stafylokokkilajin tiedetään esiintyvän niin sanottuina kommensaaleina tasalämpöisten eläinten iholla ja limakalvoilla (Quinn ym. 2002, Irlinger 2008). Edellä mainituista 30 lajista noin 20 lajin on arvioitu voivan aiheuttaa naudoille utaretulehdusta (Quinn ym. 2002).

Stafylokokit ovat halkaisijaltaan 0,5 - 1,5 µm mittaisia, itiöttömiä ja liikkumattomia kokkeja, joille on ominaista ryhmittyminen rypälemäisiksi muodostelmiksi (Quinn ym. 2002, Irlinger 2008, Hirsh & Zee, 1999). Stafylokokkien pesäkkeet ovat yleensä vaaleita, kuultavia ja halkaisijaltaan muutamasta millimetristä puoleen senttimetriin (Quinn ym. 2002). *S. aureus* -pesäkkeet ovat kullankeltaisia. Joidenkin koagulaasinegatiivisten stafylokokkien pesäkkeet voivat olla heikosti värillisiä (Quinn ym. 2002, Irlinger 2008, Hirsh & Zee 1999).

Veriagarilla stafylokokit voivat saada aikaan hemolyysiä, ja muodostaa α -, β -, γ -, tai δ -hemolysiinejä (Quinn ym. 2002). Stafylokokit ovat katalaasiposiitiivisia ja oksidaasinegatiivisia. Koagulaasitestissä ne voivat olla joko positiivisia (*S. aureus*) tai negatiivisia (koagulaasinegatiiviset stafylokokit, KNS). Koagulaasin tuottoa pidetään tärkeänä patogeneisuuden mittarina (Quinn ym. 2002). Stafylokokit kasvavat hyvin kaupallisilla agareilla, hyvinkin vaatimattomissa olosuhteissa (Irlinger, 2008).

Erotusdiagnostiikassa kliinisesti merkittävät streptokokit tulee osata erottaa stafylokokkeista. Streptokokit erotetaan stafylokokkeista pesäkemorfologian, ryhmittymisen (muodostavat ketjuja) sekä negatiivisen katalaasikokeen perusteella (Seuna 2002, Quinn ym. 2002).

Taudinaiheuttajina stafylokokit ovat luonteeltaan pääasiassa opportunisteja. Stafylokokit kestävät hyvin kuivumista ja korkeaa osmoottista painetta (Tortora ym. 2004), mikä mahdollistaa niiden aiheuttamat kolonisaatiot ja infektiot iholla ja limakalvoilla. Yleisesti stafylokokit aiheuttavat märkäisiä tulehduksia iholla ja haavoissa.

Tyypillisimpiä stafylokokkien aiheuttamia tulehduksia eläimillä ovat nautojen utaretulehdus, sikojen ja hevosten botryomykoosi, sekä kissojen ja koirien virtsatieinfektiot, pyoderma, endometriitti ja ulkokorvan tulehdukset (von Eiff ym. 2002). Lääketieteessä stafylokokit ovat tunnettuja sairaalainfektioiden aiheuttajia (Irlinger 2008, von Eiff ym. 2002).

Koagulaasipositiiviset stafylokokit aiheuttavat vakavimmat tulehdukset niin eläimillä kuin ihmisilläkin, mutta koagulaasinegatiiviset stafylokokitkin kykenevät aiheuttamaan vakavia infektiota vastasyntyneille, pitkään sairaalahoidossa olleille tai niille, joiden immuunipuolustus on merkittävästi heikentynyt (Irlinger 2008, von Eiff ym. 2002).

1.2 Koagulaasinegatiiviset stafylokokit (KNS)

Ulkonäöltään ja pesäkemorfologialtaan KNS:t muistuttavat muita stafylokokkeja, ainoa ero on niiden koagulaasinegatiivisuus. Tunnistettaessa KNS:a primaariviljelmästä tehdään puhdasviljelmä, jonka jälkeen perustesteinä suoritetaan Gram-värjäys, katalaasikoe Gram-positiivisille ja lopuksi koagulaasikoe edellisissä positiivisiksi osoittautuneille bakteereille (Evira 2006). Koagulaasinegatiiviset stafylokokit voidaan myös jakaa kahteen ryhmään novobiosiiniherkkyyden mukaan (Irlinger 2008). KNS:n osalta ryhmätunnistuksen on todettu olevan riittävä.

KNS:t muodostavat erittäin laajan ja kirjavan bakteeriryhmän, jonka kaikkia jäseniä ei ole vielä tunnistettu. Uusia lajeja on löytynyt jatkuvasti, esimerkkeinä vuohesta vuonna 2005 eristetty *S. nepalensis*, joka sittemmin on löytynyt myös eurooppalaisen lehmän maidosta (Zadoks 2007) ja lehmän utaretulehduksesta eristetty, vastikään nimetty *S. agnetis* (Taponen ym. 2011). Tunnetuimpia ja yleisimpiä naudnan utaretulehdusta

aiheuttavia KNS-lajeja ovat *S. chromogenes*, *S. simulans*, ja *S. epidermidis* (Aarestrup & Jensen 1997, Pitkälä ym. 2004, Rajala-Shultz 2004, Taponen ym. 2006).

KNS:t aiheuttavat erilaisia sairauksia myös muille eläinlajeille: *S. hyicus* aiheuttaa sioille eksudatiivista dermatiittia, eli porsasrupea, *S. epidermidis* haavainfektioita hevosille ja koirille, *S. chromogenes* ihoinfektioita sioille ja siipikarjalle, ja *S. simulans* ja *S. xylosoyus* ihoinfektioita niin koirille, kissoille, hevosille kuin siipikarjallekin (Quinn ym. 2002).

Koagulaasinegatiivisten stafylokokkien aiheuttamia ihmisten infektioita on myös raportoitu. Etenkin *S. epidermidis* on merkittävä sairaalainfektioiden aiheuttaja (Irlinger 2008, von Eiff ym. 2002). Koagulaasinegatiivisten stafylokokkien ihmisille aiheuttamat infektiot ovat harvoin hengenvaarallisia, mutta pitkään sairaalahoidossa olleille, immuunipuutoksesta kärsiville tai vastasyntyneille infektio voi olla kohtalokas (von Eiff ym. 2002). KNS-infektioita esiintyy eniten erilaisten proteesien tai muiden implanttien asentamisen jälkeen. KNS:n on todettu kykenevän kiinnittymään pintaproteiiniensa avulla implantin pintaan, ja muodostamaan siihen pitävän biofilmin (Irlinger 2008, von Eiff ym. 2002).

Koagulaasinegatiivisia stafylokokkeja käytetään myös elintarviketeollisuudessa, esimerkiksi herätebakteereina, mutta yhtäkään KNS:n aiheuttamaa ruokamyrkytystapausta ei toistaiseksi ole raportoitu (Irlinger 2008).

1.3 Utaretulehdusta aiheuttavien KNS:n määrittäminen lajitasolle

Ongelmana KNS:n kohdalla on niiden erotteleminen toisistaan. Tällä hetkellä ei ole saatavilla nopeaa, halpaa ja riittävän yksinkertaista tunnistusmenetelmää, jolla utaretulehdusta aiheuttavat KNS:t saataisiin määritettyä lajitasolle asti. Yleensä tyydytäänkin vain toteamaan taudinaiheuttajan olevan koagulaasinegatiivinen stafylokokki, erotukseksi koagulaasipositiivisista *S. aureuksesta*, *S. intermediuksesta* ja *S. pseudointermediuksesta*. Utaretulehdusdiagnostiikassa tämä on riittävä tarkkuus Elintarviketurvallisuusviraston ohjeen mukaan (Evira 2006).

Yleisesti käytettyjä menetelmiä eri KNS-lajien määrittämiseen ovat olleet erilaiset kaupalliset testit, kuten API Staph ID 32, Staph-Ident, Staph-Trac ja StaphZym, jotka

perustuvat lajien fenotyyppien muodostamien biokemiallisten reaktioiden eroavaisuuksiin. Pikatestien ongelmana on ollut niiden alkuperäinen pyrkimys tunnistaa ihmisistä eristettyjä kantoja, eivätkä testit pysty kovin luotettavasti tunnistamaan eläinalkuperäisiä kantoja (Bes ym. 2000). Menetelmät eroavat toisistaan myös valmistajan mukaan, ja eri testimenetelmillä saatujen tulosten vertaileminen keskenään voi olla epäluotettavaa. Ruotsalaisessa tutkimuksessa, jossa vertailtiin fenotyyppeihin perustuvia testejä, ne onnistuivat tunnistamaan utaretulehdusmaidosta eristetyt KNS-lajit oikein 77:n % (Api Staph 32) ja 94:n % (Staph-Zym) tarkkuudella (Thorberg & Brändström 2000). Taposen ym. (2007) tekemässä tutkimuksessa vain 66 % API Staphilla määritetyistä lajeista tunnistettiin samoiksi genotyyppiin perustuvalla amplified fragment length polymorphism (AFLP) –analyysillä. Vaihtoehtoisella menetelmällä voidaan erotella myös novobiosiiniherkkiä KNS-kantoja (Thorberg & Brändström 2000).

Koska fenotyyppinen tunnistus on suhteellisen epätarkkaa, genotyyppeihin perustuvien tunnistusmenetelmien kehittäminen ja testaus on lisääntynyt jatkuvasti. Näiden menetelmien erottelukyky ja toistettavuus on parempi kuin fenotyyppeihin perustuvissa testimenetelmissä (Forsman ym. 1997). Genotyyppisten tunnistusmenetelmien perustana toimii bakteerin DNA. Useita geeniteknologiaan perustuvia menetelmiä on käytetty alalajien, eli tietyn lajin eri kantojen, tutkimiseen, mutta niitä voidaan käyttää myös lajitason tunnistukseen (Zadoks 2009).

DNA-sekvensointi näyttäisi tällä hetkellä antavan tarkimmat tulokset, ja sen avulla voidaan tunnistaa jopa 99 % KNS-kannoista (Zadoks 2009). Menetelmän tarkkuus perustuu viitekantakokoelmiin, joita voidaan jatkuvasti tallentaa geenipankkeihin. Kannat saadaan pankista vertailuun nopeasti internetin avulla, ja ne ovat kaikkien käytettävissä. Yleisin kohde DNA-sekvensoinnille on 16S rRNA –geeni (Lan & Reeves 2001). Myös ns. genomic fingerprinting, eli kunkin bakteerilajin tyypillisten DNA-rakenneosien tunnistaminen (Shimizu ym. 1997, Thorberg & Brändström 2000) ja ribotyyppitys (Thorberg & Brändström 2000) ovat osoittautuneet käyttökelpoisiksi tunnistustyökaluiksi tunnistettaessa KNS-bakteereita. AFLP näyttäisi myös soveltuvan KNS-lajimääritykseen (Taponen ym. 2006).

Geenitekniikkaan perustuvat menetelmät vaativat osaavaa henkilökuntaa ja kalliita laitteita, joten geeniteknologian tuottamat edut, kuten nopeus ja tarkkuus, eivät ole vielä

kustannusten takia yleisesti hyödynnettävissä. Suurimmat yritykset, kuten esimerkiksi Valio Oy, ovat jo siirtyneet kaupallisiin PCR-pohjaisiin menetelmiin, jossa bakteeri voidaan tunnistaa suoraan maidosta, mutta KNS:n osalta vastauksessa ei eritellä tarkemmin, mikä KNS-laji on kyseessä.

Tietokantojen ja geeniteknisten menetelmien yleistymisen näkynee jatkossa menetelmien halpenemisena ja PCR:n käytön lisääntymisenä. Tulevaisuudessa uusien keksintöjen ja eri menetelmien ominaisuuksien ja hintavertailun myötä on todennäköistä saada luotettavia tunnistusmenetelmiä vakiinnutettua myös praktikoiden käyttöön. Tällä hetkellä kuitenkin kiistellään vielä siitä, mikä tarkkuus KNS:n tunnistuksessa olisi riittävää ja järkevää ajatellen utaretulehduksen hoitoa ja ehkäisyä, ja kuinka paljon resursseja tulisi KNS:n tutkimiseen käyttää (Ruegg 2007, Pyörälä & Taponen 2009).

2. KNS:N MERKITYS NAUDAN UTARETULEHDUKSESSA

2.1 Esiintyvyys

KNS:t ovat yleistyneet utaretulehdusten aiheuttajina runsaasti sekä Suomessa että muissa maissa (Pitkälä ym. 2004, Waage ym. 1999, Nevala ym. 2004, Rajala-Shultz ym. 2004, Tenhagen ym. 2006, Sampimon ym. 2009). Suomessa 2001 tehdyn kartoitustutkimuksen mukaan lähes 50:ssä % kaikista piilevistä utaretulehduksista otetuista, bakteriologisesti positiivisista näytteistä kasvoi KNS-bakteereita (Pitkälä ym. 2004). Koagulaasinegatiiviset stafylokokit olivat osallisena myös yli 70:ssä % sellaisia näytteitä, joista eristettiin kaksi lajia (Pitkälä ym. 2004).

Suomessa vuosina 2004 - 2006 kerätyn aineiston perusteella kliinistä utaretulehdusta sairastavilta lehmiltä otetuista näytteistä 17,6:ssä % kasvoi KNS. Piilevistä utaretulehdustapauksista tutkituista näytteistä vastaava luku oli 23,5 % (Koivula ym. 2007.) Helsingin yliopiston tuotantoeläinlääketieteen osaston praktiikka-alueelta vuosina 2002 - 2003 kerätyn aineiston perusteella yli 20 % kliinisistä utaretulehduksista oli KNS aiheuttamia (Nevala ym. 2004).

Saksalaistutkimuksessa kaikista mukana olleista karjoista löytyi KNS:n aiheuttamia utaretulehduksia (Tenhagen ym. 2006) ja Norjassa KNS:n yleisyys on ollut 16 % luokkaa (Østerås & Sølverød 2006). Monissa muissakin maissa KNS:n merkitys niin piilevien kuin kliinistenkin utaretulehdusten aiheuttajana on kasvanut, kuitenkin niin, että KNS on aina yleisempi piilevän kuin kliinisen utaretulehduksen aiheuttajana (Pyörälä & Taponen 2009). Vertailua hankaloittavat eri maiden käytännöt siitä, mikä luetaan bakteriologisesti positiiviseksi näytteeksi. Suomalaisissa tutkimuksissa näyte on todettu positiiviseksi, jos bakteerikasvu on ollut yli 500 pesäketä muodostavaa yksikköä (pmy) millilitrassa maitoa. Edellä mainitussa norjalaistutkimuksessa puolestaan KNS-näytteiden osalta bakteriologisesti positiiviseksi näytteeksi on tulkittu 4000 pmy/ml (Østerås & Sølverød 2006). Voidaan olettaa, että Østeråsin ym. (2006) tutkimuksessa havaittu 16 % esiintyvyys voisi olla paljon korkeampikin, mikäli tutkimus olisi tehty Suomessa käytettävillä raja-arvoilla.

KNS:n aiheuttama tulehdus on yleisin hiehoilla (Aarestrup & Jensen 1997, Waage ym. 1999, Matthews ym. 1992, Tenhagen ym. 2006). Erään tutkimuksen mukaan jopa 75 % kaikista poikimista edeltävistä hiehojen utaretulehduksista oli KNS:n aiheuttamia (Borm ym. 2006). Hiehot saavat tartunnan heti tuotoskauden alussa, toisin kuin lehmät, jotka infektoituvat vasta myöhäisemmässä vaiheessa (Taponen ym. 2007, Gröhn ym. 2004). Syytä, miksi KNS aiheuttaa utaretulehdusta enemmän hiehoille, ei tiedetä. Jotkut hiehoista ja lehmistä kykenevät eliminoimaan infektion, jotkut eivät, ja syyn arvellaan liittyvän jotenkin isäntä-mikrobivuorovaikutukseen tai eroihin KNS-lajien taudinaiheutuskyvyssä (Taponen ym. 2007). Hiehojen hoidolla, ruokinnalla sekä elinympäristöllä ennen poikimista on arveltu olevan merkitystä esiintyvyyteen (Pyörälä & Taponen 2009).

Eri vuosikymmeniltä peräisin olevat tutkimukset viittaavat siihen, että dominoivien KNS-lajien suhteet olisivat muuttuneet vuosien varrella (Devriese ym. 1980, Aarestrup & Jensen 1997, Waage ym. 1999, Taponen ym. 2003, Rajala-Shultz 2004). Lajien tunnistamiseen käytetyt menetelmät ovat olleet niin erilaisia ja tutkimusten kattavuus on vaihdellut niin suuresti, että tulokset eivät ole vertailukelpoisia, eikä näin ollen voida olla varmoja, ovatko kaikki tunnistetut KNS-lajit oikeasti niitä, mitä on väitetty.

Koagulaasinegatiivisten stafylokokkien esiintyvyydessä on havaittu myös vuodenaikavaihtelua (Østerås & Sølverød 2006, Waage ym. 1999, Koivula ym. 2007).

Norjalaisessa tutkimuksessa, jossa kartoitettiin koko maan utaretulehdustilannetta, KNS-utaretulehdusten esiintyvyys oli suurimmillaan sisäruokintakauden lopussa huhtikuusta kesäkuuhun (Østerås & Sølverød 2006). Waagen ym. (1999) tutkimuksessa touko - kesäkuu oli KNS:n esiintyvyyden suhteen merkittävä ajanjakso, mutta KNS-infektioita todettiin tavallista enemmän myös tammi - helmikuussa (Waage ym. 1999). Sisäruokintakauden lopussa havaittujen infektioiden määrän kasvun arveltiin johtuvan huonolaatuisemman ja vähemmän E-vitamiinia sisältävän rehun, tai huonon hygienian aiheuttamasta lehmien puolustuskyvyn heikkenemisestä (Østerås & Sølverød 2006). Koivulan ym. (2007) tutkimuksessa vuosina 2004 - 2006 kerätyn aineiston perusteella KNS:n esiintymisessä havaittiin myös alueellisia eroja. KNS on Suomen pohjoisosissa yleisin utaretulehduksia aiheuttava patogeeni ympäri vuoden, kun taas eteläisessä Suomessa *S. aureus* on yleisempi maaliskuusta huhtikuusta ja marraskuusta (Koivula ym. 2007).

Koagulaasinegatiivisten stafylokokkilajien esiintyvyydessä on havaittu eroja myös ajanjaksoina poikimisen molemmin puolin, sekä tuotoskauden eri vaiheissa (Østerås & Sølverød 2006, Aarestrup & Jensen 1997, Taponen ym. 2007). Ennen poikimista saadun KNS-infektion on todettu kasvattavan riskiä saada infektio myös poikimisen jälkeen (Aarestrup & Jensen 1997). Tanskalaistutkimuksessa havaittiin *S. chromogenes* olevan merkittävin utaretulehduksen aiheuttaja ennen poikimista (15 % kaikista prepartum-infektioista), mutta heti poikimisen jälkeen *S. chromogenes* aiheuttamat infektiot laskivat yhteen prosenttiin. *S. chromogenes* oli ainoa KNS-laji, joka diagnosoitiin jo neljä viikkoa ennen poikimista (Aarestrup & Jensen 1997). Saman tutkimuksen mukaan ennen poikimista havaitun *S. simulans* -infektion voidaan olettaa löytyvän myös poikimisen jälkeen samasta neljänneksestä (Aarestrup & Jensen 1997).

S. simulans on todettu persistoivan utareessa viikkoja (Aarestrup & Jensen 1997, Aarestrup ym. 1999), kun taas *S. epidermidixen* aiheuttama infektio on havaittu ohimeneväksi (Aarestrup & Jensen 1997), joka pysyäkseen utareessa tarvitsisi paremman isäntäkudoksen tai jatkuvan ulkopuolisen kontaminaatiolähteen (Thorberg & Brändström 2006). Thorbergin ym. (2009) tuoreessa tutkimuksessa edellä mainitut lajit olivat yleisimpiä persistoivien tulehdusten aiheuttajia karjatasolla.

Syitä matalamman taudinaiheutuskyvyn omaavien bakteerien yleistymiseen on pohdittu useilla tahoilla. KNS:n on todettu olevan yleinen etenkin sellaisissa karjoissa, joista

merkittävät utaretulehdusta aiheuttavat bakteerit on saatu hoidettua (Radostits 2000). Tämä voisi hyvinkin selittää suomalaisten karjojen nykytilannetta. Muiksi syiksi on arveltu yksiköiden suurentumista, pihatoiden yleistymistä ja lypsyteknologian muuttumista (Nevala ym. 2004).

2.2 Taloudellinen merkitys

Utareterveydellä on suuri merkitys tulevan tuotoskauden maidon laatuun ja määrään (Oliver ym. 2003, Gröhn ym. 2004). Tämä on todettu etenkin hiehoilla (Matthews ym. 1992, Oliver ym. 2003), jotka ovat lypsykarjojen uudistumisen perusta. Utaretulehdus onkin yksi lypsylehmien kalleimmista sairauksista (Halasa ym. 2007, Radostits 2000, Heikkilä 2010). Utaretulehduksen kulut muodostuvat lääkkeiden ja eläinlääkärikulujen lisäksi tuotannon vähenemisestä, sivuun lypsetyn maidon menettämisestä, tulehduksen aiheuttamasta ylimääräisestä työstä, maidon laadun heikkenemisestä, sekä eläinten ennenaikaisista poistoista (Halasa ym. 2007). Utaretulehdukset saattavat vaikuttaa myös tiinehtyvyyteen (Rajala-Shultz 2007). Suomalaistutkimuksen mukaan, jossa dynaamisen optimointimallin avulla arvioitiin utaretulehduksen kustannuksia, hinta vaihteli välillä 270 - 670 euroa/tapaus, jos lehmää ei poistettu karjasta (Heikkilä ym. 2010).

KNS:n, ja muidenkin pääasiassa piileviä utaretulehduksia aiheuttavien bakteerien, aikaansaamien taloudellisten menetysten suurimpana syynä on ajateltu olevan kohonnut soluluku (Halasa ym. 2007) ja sitä kautta maidon laadun heikentyminen sekä sivuunlypsy. On myös löydetty todisteita siitä, että piilevän utaretulehduksen jälkeen tuotos ei nouse enää samalle tasolle (Halasa ym. 2007), kuin mitä se oli ennen tulehdusta. Suomalaisen karjantarkkailuaineiston mukaan akuutin utaretulehduksen yhden lypsykauden tuotantotappiot vaihtelevat 110 - 552 kg:n välillä (Rajala-Shultz, 2007). Tappion suuruus on riippuvainen tulehduksen ajankohdasta ja lehmän iästä.

Oliver ym. (2003) kokeilivat hoitaa rutiinisti kaikki hiehot antibiootein ennen poikimista ehkäistäkseen tulevia utaretulehduksia, ja saivat toiminnasta jopa 200 dollarin edun hiehoa kohti. Näihin tuloksiin tulee suhtautua kriittisesti jo pelkästään laskutoimituksiin sisältyvien muuttujien takia, eikä tuloksia voi suoraan soveltaa muihin maihin. Esimerkiksi Borm ym. (2006) eivät kolme vuotta myöhemmin julkaistussa tutkimuksessa saaneet prepartum -hoidoilla merkittävää taloudellista etua.

Taloudelliset laskelmat vaihtelevat paljon niin maittain kuin alueellisestikin (Halasa ym. 2007). Voidaan kuitenkin todeta, että utaretulehdus on kallein lypsylehmiä vaivaava sairaus maailmassa, oli laskelmiin sisällytetty mitä muuttujia tahansa (Heikkilä ym. 2010, Rajala-Shultz 2007).

2.3 Utaretulehdusta aiheuttavien KNS:n mikrobilääkeresistenssi

Koagulaasinegatiivisilla stafylokokkeilla on havaittu eniten resistenssiä G-penisilliiniä vastaan. Suomessa vuonna 1988 tehdyssä kartoitustutkimuksessa utaretulehduksista eristetyistä KNS-kannoista 24 % oli penisilliiniresistenttejä, eli beetalaktamaasia tuottavia kantoja. Vuonna 1995 vastaava luku oli 37 %, ja vuonna 2001 32 % (Pitkälä ym. 2004). Saaren tuotantoeläinklinikan hoitoalueelta vuosina 2002 - 2003 kerätyssä aineistossa, resistenttejä kliinistä utaretulehdusta aiheuttavia kantoja oli 13,2 % ja resistenttejä piilevää utaretulehdusta aiheuttavia kantoja oli 23,4 % (Nevala ym. 2004). Samankaltaisia lukuja on saatu myös maailmalla (Rajala-Shultz ym. 2004, Østerås & Sølverød 2006, Gentilini ym. 2002), mutta tulosten vertailukelpoisuuteen vaikuttavat muun muassa erilaiset herkkyysmäärittämenetelmät.

KNS:lla on todettu myös metisilliiniresistenssiä. Resistenssigeeniksi on tunnistettu *mecA*-geeni, jonka on todettu siirtyvän horisontaalisesti eri stafylokokkilajien välillä (Werckenthin ym. 2001). Sampimonin ym. (2011) tutkimuksessa maitonäytteistä eristetyistä *S. epidermidis* -bakteereista 30 % kantoi *mecA*-geeniä. Utaretulehduksen aiheuttajina metisilliiniresistentit KNS-kannat ovatkin yleisempiä, kuin *S. aureuksen* metisilliiniresistentit kannat (MRSA).

KNS-bakteerien resistenssi muita mikrobilääkkeitä, kuten klindamysiiniä ja erytromysiiniä, sekä streptomysiiniä ja trimetopriimi-sulfonamideja vastaan Suomessa on ollut alle 7 % (Pitkälä ym. 2004). Oksasilliiniresistenssi oli 9,6 % ja tetrasykliiniresistenssi 8,7 % (Pitkälä ym. 2004, FINRES-Vet 2005 - 2006).

KNS-lajien eroavaisuuksista resistenssin osalta on olemassa vain muutamia tutkimuksia. Devriese ym. (2002) keskittyivät tutkimuksessaan pelkästään *S. chromogeneksen* resistenssiin, ja totesivat kyseisen lajin olevan herkkä kaikille

antibiooteille, poikkeuksena penisillinaasiherkät penisilliinit (G-penisilliini, ampisilliini ja amoksisilliini). Tosin *S. chromogenekselle* on saatu myös yli 80 % resistenssilukuja sulfonamideja vastaan (Werckenthin ym. 2001). *S. xylosuksen* on todettu olevan herkkä lähes kaikille antibiooteille (Werckenthin ym. 2001). Uudessa Sampimon ym. (2011) tutkimuksessa havaittiin *S. epidermidiksellä* penisilliiniresistenssiä merkittävästi enemmän kuin muilla lajeilla. Kannoista 30:lla % löydettiin metisilliiniresistenssiin yhdistetty *mecA*-geeni ja lähes puolet kannoista oli multiresistenttejä. Tämä on merkittävä löydös siitäkin syystä, että nautojen ja ihmisten *S. epidermidis* -kannat voivat olla zoonoottisia (Sampimon ym. 2011).

Thorbergin ym. (2006) tutkimuksessa ruotsalaisten lehmien maidosta eristetyistä *S. epidermidis* -kannoista 6 % oli oksasilliinille resistenttejä ja 13 % erytromysiinille ja fusidiinihapolle. Mielenkiintoista Thorbergin ym. (2006) tuloksissa on se, ettei Ruotsissa näistä lääkkeistä yhtäkään ole rekisteröity lehmille.

Ihmisillä KNS-resistenssi on lisääntyvä ongelma etenkin sairaaloissa, pääasiassa multiresistenttien kantojen syntymisen myötä (Werckenthin ym. 2001). Eläinlääketieteessä asiasta ei ole raportoitu yhtä johdonmukaisesti, ja kuten edellä mainittu, julkaisut eroavat toisistaan paljon niin lajien, tulosten, kuin käytettyjen menetelmienkin osalta, joten vertailu on äärimmäisen vaikeaa (Werckenthin ym. 2001). Suomen resistenssitilanne on kuitenkin hyvä (FINRES-Vet 2005 - 2006).

3. KNS:N ETIOLOGIA JA TAUDINAIHEUTUSKYKY

KNS:n aiheuttamia utaretulehduksia esiintyy lypsykauden kaikissa vaiheissa, eniten umpeenpanovaiheessa sekä poikimisen yhteydessä (Pyörälä ym. 2004a).

Koagulaasinegatiivisia stafylokokkeja on eristetty jopa alle vuoden ikäisten hiehojen vetimien iholta ja vedinkanavasta (DeVliegher ym. 2003). KNS-bakteereita on eristetty vetimen iholta ja kärjestä myös tilanteissa, jolloin lehmällä ei ole ollut merkkejä infektiosta (DeVliegher ym. 2003). Jotta infektio syntyisi, tarvitaan patogeenin lisäksi usein jonkinlainen lehmän vastustuskykyyn alentavasti vaikuttava tekijä, kuten

virusinfektio, lämpötilan muutos (Pyörälä ym. 2004) tai vetimen epiteelivaurio (Pyörälä ym. 2004, Mylly ym. 1994).

Poikkeuksena muihin KNS-lajeihin *S. epidermidis* ei ole lehmän iholla normaalisti tavattava bakteeri, vaan sitä eristetään pääasiassa maidosta (Devriese & de Keyser 1980). Ihmisillä *S. epidermidis* kuuluu ihon normaalimikrobistoon. Thorberg ym. (2006) tekivät kokeen, jossa heidän tarkoituksenaan oli tutkia *S. epidermidiksen* siirtymistä lypsäjästä lehmään. Lehmän maidosta eristetyt kannat olivat samoja, kuin lypsäjän käsistä eristetyt. Tämä tutkimus tukee hypoteesia, että ihmisen *S. epidermidis* -kanta kykenisi aiheuttamaan myös lehmälle infektion (Thorberg ym. 2006).

Kolonisaatio, eli bakteerien pääsy utareeseen, on ensimmäinen vaihe utaretulehdusprosessissa. Seuraava vaihe on kiinnittyminen isäntäeläimen kudoksiin. Stafylokokit kykenevät kiinnittymään maitotiehyiden seinämiin, basaalimembraaniin, solunsisäiseen matriksiin ja fibriiniin (Sandholm ym. 1995). Etenkin ekstrasellulaarimatriksin proteiinit laminiini, fibronectiini sekä kollageeni, ovat kiinnittymisen kohteina (Sandholm ym. 1995). Vauriot suojaavassa epiteelissä mahdollistavat bakteerien pääsyn suoraan alla olevaan kudokseen, ja edesauttavat siten bakteerien kiinnittymistä. Vetimen pään epiteelivaurion onkin todettu korreloivan voimakkaasti piilevän utaretulehduksen esiintymisen kanssa (Mylly ym. 1994).

Watts ym. (1990) tarkastelivat kiinnittymiseen liittyviä virulenssitekijöitä *S. epidermidiksellä*, *S. chromogeneksella* ja *S. hyicusella*. Osa kannoista kykeni tuottamaan sidekudoksen hajotusta katalysoivaa entsyymiä, elastaasia, sekä kiinnittymistä edesauttavaa limaa. Jotkut kannat pystyivät myös kiinnittymään kollageeniin (Watts ym. 90).

Almeidan ja Oliverin (2001) tutkimustulokset osoittivat, että kaikki heidän tutkimuksessaan olleet lajit (*S. xylosus*, *S. hyicus* ja *S. epidermidis*) kykenivät kiinnittymään ja tunkeutumaan isäntäeläimen utareen epiteelisoluihin *in vitro*. Bakteerien invaasio solujen sisälle tapahtui reseptorivälitteisen solusyönnin avulla (Almeida & Oliver 2001). Anaya-Lopezin ym. (2006) tutkimuksessa piilevästä utartulehduksesta eristettiin *S. aureus* -, *S. epidermidis* -, *S. xylosus* -, *S. equorum* - ja *S. haemolyticus* -kantoja, ja testattiin niiden kykyä tunkeutua ja selvitä naudan utareen epiteelisoluisissa *in vitro*: vain kaksi *S. aureus* -kanta ja yksi *S. epidermidis* -kanta

kykenivät tähän (Anya-Lopez ym. 2006). Koska kaikki kannat olivat kuitenkin aiheuttaneet piilevän utaretulehduksen, tutkijat epäilivät, että invaasio solun sisälle ei ole välttämätön mekanismi utaretulehduksen ja pysyvän infektion aikaansaamiseksi (Anya-Lopez ym. 2006).

Koagulaasinegatiiviset stafylokokit kykenevät muodostamaan biofilmiä, eli bakteerisolujen ja soluväliaineen muodostamaa kestävää bakteerikasaumaa. *S. epidermidiksellä* on havaittu kyky kolonisoida polymeeripintoja, kuten proteeseja, biofilmimuodostuksen avulla (von Eiff ym. 2002). Biofilmin muodostuksessa bakteerit tarttuvat polymeerimateriaaliin ja lisääntyvät useita kerroksia muodostaviksi solurykelmiksi proteesin pintaan. Tämän jälkeen bakteerikerrokset peittyvät vähitellen soluväliaineella, joka suojaa ja vahvistaa bakteerikasauman rakennetta (von Eiff ym. 2002). Biofilmimuodostuksen merkityksestä utaretulehduksen etiologiassa ei ole varmuutta.

KNS:lta on löydetty muitakin kuin kiinnittymiseen liittyviä virulenssitekijöitä. Wattsin ym. (1990) tutkimuksessa *S. epidermiksien* ja *S. chromogeneksen* havaittiin tuottavan delta-toksiinin kaltaista toksiinia, joka on yksi *S. aureuksen* tuottamista toksiineista (Watts ym. 1990). Delta-toksiini, tai delta-lysiini, aiheuttaa valkosolujen tuhoa ja ihokuolioita. Toksiinin tuotto aiheutti myös selkeät muutokset maidon somaattiseen solulukuun, joka kasvoi kolminkertaiseksi. Tutkijat epäilivät, että toksiinin tuotto voisi olla yksi kantojen taudinaiheutuskyvyn eroista kertova tekijä (Watts ym. 1990). Park ym. (2011) tutkimuksessa maitonäytteistä eristetyiltä KNS-kannoilta 31,2 % löydettiin ns. superantigeneja (SAGs), joita on löydetty myös *S. aureukselta*. Vielä on selvittämättä, mikä näiden geenien merkitys on (Park ym. 2011).

Zhang ym. (2000) selvittivät tutkimuksessaan KNS-kantojen, ja etenkin *S. chromogeneksen*, sytotoksisia aktiivisuuksia. Lähes kaikki *S. chromogenes* -kannat aiheuttivat solujen pyöristymistä. Osa kannoista puolestaan tuotti toksiineja, jotka aiheuttivat solujen hajoamista (Zhang & Maddox 2000). Lisäksi KNS-kantojen todettiin tuottavan lipaaseja, hemolysiinejä sekä proteaaseja.

Koska KNS:n aiheuttamat utaretulehdukset ovat kliinisesti lievempiä kuin *S. aureuksen* aiheuttamat, on voitu spekuloida taudinaiheutusgeenien määrän vähäisyyttä ja niiden merkitystä KNS:n genomissa (Sairasalo 2007). Hyvösen ym. (2009) tutkimuksessa,

jossa tutkittiin KNS-invaasion voimakkuutta, havaittiin sen olevan selkeästi heikompaa kuin *S. aureuksella* (Hyvönen ym. 2009).

Kuten edellä mainituissa tutkimuksissa on havaittu, KNS-kannoilla näyttäisi olevan eroja taudinaiheutuskyvyssä. KNS:n aiheuttaman utaretulehduksen syntyyn vaikuttaa suuresti myös lehmän oma vastustuskyky, ympäristö- ja navettaolosuhteet, sekä lypsyhygieniat ja -tekniikka, joka osaltaan antaa viitteitä ympäristöperäisestä etiologiasta (Sampimon ym. 2009).

Lisätutkimuksia KNS:ta julkaistaan jatkuvasti, ja varmasti lähivuosina päästään muodostamaan laajempi kokonaiskuva eri KNS-lajien ja -kantojen etiologiasta, patogeneesistä ja virulenssista.

4. UTAREEN PUOLUSTUSMEKANISMIT

Pelkkä patogeenien tutkiminen ei riitä tutkittaessa utaretulehduksen syitä ja seurauksia. Utaretulehduksessa, kuten muissakin infektioidissa, on tärkeää tunkea myös isäntäeläimen ja kohdekudoksen vasteet. Tällä hetkellä tietämys utareen immuunipuolustuksesta ei ole vielä läheskään täydellistä, vuosien tutkimuksesta huolimatta (Rainard & Riollet 2006). Uusien työkalujen, kuten genomiikan ja proteomiikan avulla tutkimusta voidaan yhä tarkentaa ja syventää. Maitorauhasen epiteeli on vain hyvin harvoin bakteerien kanssa kosketuksissa, ja utareen puolustusmekanismit reagoivat herkästi kudokseen tunkeutuviin taudinaiheuttajiin (Sandholm ym. 1995).

4.1 Mekaaninen ja fysiologinen puolustus

Utaretulehduspatogeenit tunkeutuvat utareeseen vedinkanavan kautta, joka toimii ensimmäisenä puolustuslinjana utareessa. Vedinkanavan päässä oleva keratiinitulppa toimii fysikaalisena esteenä joka sitoo ja immobilisoi osaa kapselittomista bakteereista (Rainard & Riollet 2006). Vedinkanavan halkaisijalla on myös merkitystä: mitä leveämpi kanava on, sitä alttiimpi se on infektiolle (Andrews ym. 2004). Muita

luonnollisia mekaanisia puolustusmenetelmiä utareessa ovat maidon ulosvirtauksen aiheuttama huuhteluvaikutus, sekä epiteelisolukon nopea uusiutuminen.

4.2 Humoraalinen puolustus

Utareen humoraalinen puolustus koostuu komplementtireaktiosta, maitoon erittyvistä erilaisista maitoproteiineista, sekä luonnollisista vasta-aineista (Rainard & Riollet 2006). Komplementin osia on jatkuvasti läsnä maidossa pieninä määrinä. Komplementtireaktion merkitys korostuu tulehduksen yhteydessä, jolloin verisuonten sekä epiteelisolujen permeabiliteetti lisääntyy, ja lisää komplementin osia saadaan kudokseen (Rainard & Riollet 2006).

Laktoferrini on tärkein rautaa sitova proteiini maidossa (Sandholm ym. 1995). Sen pitoisuus nousee tulehduksen aikana ja riippuu utaretulehdusta aiheuttavasta bakteerista (Kutilla ym. 2003). Kutilan ym. (2003) tutkimuksessa koagulaasinegatiivisista stafylokokkeista neljä kantaa viidestä inhiboitui jollakin tasolla laktoferrinin vaikutuksesta, mutta yksi kanta oli täysin resistentti (Kutilla ym. 2003). Laktoferrinin vaikutusta bakteerien kiinnittymiseen, invaasioon tai solunsisäiseen jakaantumiseen ei ole havaittu (Hyvönen ym. 2009).

Muita humoraaliseen puolustukseen kuuluvia proteiineja on bakteerien soluseinää tuhoava lysosyymi, sekä bakteriosidinen ja bakteereja inhiboiva laktoperoksidaasi. Myös vasta-aineet ovat osa humoraalista immuniteettia. Maidossa on todettu olevan mastiittipatogeneja opsonisoivia vasta-aineita (Rainard & Riollet 2006).

4.3 Soluvälitteinen puolustus

Luonnollisen immuniteetin soluvälitteiseen puolustukseen kuuluvat neutrofiilit, makrofagit ja luonnolliset tappajasolut (Rainard & Riollet 2006).

Tulehduksessa neutrofiilit saapuvat sytokiinien houkuttelemana ensimmäisenä paikalle, ja niiden määrä kasvaa niin runsaasti, että suurin osa tulehdusmaidon soluista on neutrofiileja. Ne tuhoavat bakteereja, ja eräät sytokiinit, kuten IL-1 ja TNF-alfa, voimistavat neutrofiilien fagosyyttistä ja bakteriosidistä aktiivisuutta (Rainard & Riollet

2006). Lampaille indusoidussa *S. chromogenes* – infektiossa IL-8 pitoisuudet nousivat merkittävästi ja pysyivät koholla tulehduksen ajan (Winter ym. 2003). Neutrofiilien saapuminen tulehduspaikalle vaihtelee sekä nopeudessa, että intensiivisyydessä, bakteeri- ja lehmäkohtaisesti (Rainard & Riollet 2006).

Makrofagit ovat normaalin maidon yleisin solutyyppe. Ne kykenevät fagosytoimaan yleisimpiä mastiittipatogeenia (Rainard & Riollet 2006).

Luonnolliset tappajasolut ovat suuria granulaarisia lymfosyyttejä, joilla on sytotoksista aktiivisuutta. Niiden tärkein tehtävä on tunnistaa ja tuhota epänormaaleja soluja, kuten infektoituneita soluja (Mackay & Rosen 2000).

Oma roolinsa utareen puolustuksessa on myös utareen epiteelisoluilla. Niiden on todettu syntetisoivan useita tulehduksen välittäjäaineita, kuten sytokiineja, kemokiineja, arakidonihapon metaboliitteja sekä ”host defence” -peptidejä (Rainard & Riollet, 2006). Utaretulehduksen aikana soluvälit löystyvät, ja sen seurauksena verta sekä immuunipuolustuksen komponentteja pääsee tulehtuneeseen kudokseen (Sandholm ym. 1995). Permeabiliteettiin vaikuttavia mekanismeja ovat proinflammatoristen tulehdusvälittäjäaineiden, kuten histamiinin, TNF-alfan ja IFN-gamman, vaikutus soluväliliitoksiin, sekä bakteeritoksiinien aiheuttama solutuho (Rainard & Riollet 2006). Tiiviiden liitosten läpäisevyyteen sen sijaan vaikuttavat mm. hormonit ja matriksin metalloproteinaasit.

5. TULEHDUSINDIKAATTORIT MAIDOSSA

Kliininen utaretulehdus havaitaan oireiden perusteella ilman laboratoriomenetelmiä, mutta piilevän utaretulehduksen havaitseminen on vaikeampaa. Lehmä voi olla ulkoiselta olemukseltaan täysin normaali, eikä utareessa havaita ulkoisia tulehduksen merkkejä. Maidosta mitattavista tulehdusindikaattoreista on tällöin apua. Näitä utaretulehduksesta kertovia suureita ovat kohonnut maidon soluluku, entsyymiaktiivisuus, sekä akuutin faasin proteiinien määrä.

5.1 Somaattiset solut (Somatic cell count, SCC)

Maidossa olevien somaattisten solujen lukumäärän mittaaminen on laajasti käytössä oleva tapa seurata maidon laatua ja utareterveyttä. Normaali maito sisältää aina somaattisia soluja (alle 100 000 kpl/ml), jotka ovat peräisin mm. vetimen epiteelistä. Kuinka paljon soluluku tulehduksen yhteydessä kasvaa, riippuu taudinaiheuttajasta (Djabri ym. 2002) ja tulehduksen voimakkuudesta. Suomessa tulehdusmaidon solurajana pidetään 200 000 kpl/ml.

Djabrin ym. (2002) tekemässä kattavassa yhteenvetoartikkelissa (meta-analyysi), tarkasteltiin maidon solulukuja eri patogeenien aiheuttamissa tulehduksissa neljänneskohtaisesti. KNS:n aiheuttaman tulehduksen soluluku jäi yleensä alle 500 000 kpl/ml, ja geometriset keskiarvot vaihtelivat 63 000 ja 1 277 000 kpl/ml välillä. Yleisesti matalapatogeenisten taudinaiheuttajien soluluvun keskiarvoksi oli laskettu 110 000 – 150 000 kpl/ml ja korkeapatogeenisten keskiarvoksi yli 350 000 kpl/ml (Djabri ym. 2002). Suomessa tehdyssä kartoitustutkimuksessa SCC nousi yli 300 000 kpl/ml vain 18:ssa % KNS:n infektoimista neljänneksistä (Pitkälä ym. 2004). Verrattuna terveisiin kontrollineljänneksiin, KNS:t ovat nostaneet solulukua lähes kaikissa tutkimuksissa (Leitner ym. 2000, Simojoki ym. 2008, Winter & Colditz 2002). Taposen ym. (2007) tutkimuksessa pysyvästi KNS:lla infektoituneiden neljännesten geometrinen SCC keskiarvo oli 657 600 kpl/ml ja ohimenevästi infektoituneiden neljännesten soluluvun keskiarvo oli 610 100 kpl/ml.

5.2 NAGaasi

Maidon entsyymiaktiivisuudet muuttuvat utaretulehduksen myötä. Maidon synteesiin liittyvä entsyymituotanto vähenee, ja tulehdukseen viittaavien, etenkin fagosyyteista peräisin olevien lysosomaalisten entsyymien määrä vastaavasti kasvaa (Sandholm ym. 1995).

NAGaasi (N-asetyyli-beta-D-glukosaminidaasi) on intrasellulaarinen, lysosomaalinen entsyymi, joka vapautuu tulehdussolujen aktivoituessa ja hajotessa (Sandholm ym. 1995). Maidon NAGaasi-aktiivisuutta voidaan käyttää apuna piilevän utaretulehduksen diagnosoinnissa bakteriologisen testin ja SCC:n seurannan ohella.

5.3 Akuutin faasin proteiinit (APP)

Akuutin faasin vaste tarkoittaa sytokiinien indusoimaa isäntäeläimen vastetta heti kudosaaurion jälkeen (Pyörälä 2000). Nautojen kaksi herkimmin havaittavaa akuutin faasin proteiinia ovat haptoglobiini (Hp) sekä seerumin amyloidi A (SAA) (Pyörälä 2000, Grönlund ym. 2005, Eckersall ym. 2006). Näitä on tutkittu paljon kliinisten utaretulehdusten yhteydessä (Pyörälä 2000). Eckersall ym. (2006) havaitsivat haptoglobiinin ja SAA:n pitoisuuksien nousun subkliinisessä mastiitissa. Lisäksi he havaitsivat, että utaretulehduksen aikana SAA:ta ja haptoglobiinia muodostuu maksan lisäksi paikallisesti myös utareessa (Eckersall ym. 2006).

Kokeellisesti tartutetussa *S. chromogeneksen* aiheuttamassa utaretulehduksessa havaittiin MAA:n (maidon amyloidi A) pitoisuuksien vaihtelevan vuorokauden ajan mukaan (Simojoki ym. 2008) ja kohoavan edelleen vaikka bakteeri oli jo eliminoitunut. *E. colin* aiheuttamaan utaretulehdukseen verrattuna, MAA pitoisuudet ovat *S. chromogeneksella* sata kertaa alhaisempia (Simojoki ym. 2008).

6. KNS AIHEUTTAMAN UTARETULEHDUKSEN HOITO

Koagulaasinegatiivisiin stafylokokkeihin kohdistuva tutkimus ei ole vielä niin pitkällä, että niiden aiheuttaman infektion hoitoon voitaisiin antaa yksiselitteisiä ohjeita, eikä niiden aiheuttaman infektion kliinisessä kuvassa tai paranemisessa ole pystytty osoittamaan eroavaisuuksia (Simojoki ym. 2005, Taponen ym. 2005, Jarp 1991).

KNS-mastiittia on pidetty ohimenevänä, itsestään paranevana infektiona. Piilevät utaretulehdukset ovatkin usein jätetty hoitamatta, tai hoidettu esimerkiksi tiheän lypsyn avulla. Spontaanisti paranevien infektioiden osuus on vaihdellut maailmalla tuotantovaiheen mukaan välillä 15 - 72 % (Timms & Shultz 1987, Wilson ym. 1999). Taponen ym. (2006) tutkimuksessa spontaanisti parantui 46 % eläimistä. Uudet tutkimukset ovat osoittaneet useiden KNS-lajien persistoivan utareessa pitkiä aikoja, jopa koko laktaatiokauden ajan (Taponen ym. 2007, Aaresrup & Jensen 1997, Aarestrup

ym. 1999, Thorberg ym. 2006). Samoja kantoja on löytynyt sekä ohimenevistä, että persistoivista infektioista (Taponen ym. 2007).

Tulosten perusteella on arvioitu, että *S. epidermidiksen* tai *S. chromogeneksen* aiheuttamissa utaretulehduksissa antibiootihoidon käyttö ei olisi kovin järkevää niiden ohimenevän infektioluonteensa takia (Aaresrup & Jensen 1997). Taposen ym. (2007) tutkimuksessa kokonaisuudessaan yli puolet KNS:n aiheuttamista utaretulehduksista oli pysyviä, ja suurin osa lehmistä pysyi infektoituneina koko tuotantokauden ajan (Taponen ym. 2007). Jatkuvasti KNS:a erittävät lehmät, joita ei ole pantu umpeen, tai hoidettu antibioottein, muodostavat riskin tartunnan leviämiseen (Simojoki ym. 2005), joten persistoivien infektioiden hoitoon antibiooteilla olisi selkeä indikaatio.

Rutiininomaiset ennen poikimista annettavat antibiootihoidot (Oliver 2003) eivät tule kyseeseen, mutta lypsykauden alussa diagnosoidun piilevän utaretulehduksen hoito antibiooteilla voisi olla suositeltavaa, mikäli ennuste paranemisen ja soluluvun normalisoitumisen suhteen on hyvä (Simojoki 2005).

Intramammaari- ja parenteraalihoidon tehokkuutta KNS-tulehdusten hoidossa ei ole vertailtu, mutta molemmilla tavoilla on saatu hyviä tuloksia (Pyörälä & Pyörälä 1998, Taponen ym. 2003, Simojoki 2005). Penisilliiniherkkien stafylokokkien MIC-arvot ovat alle 0,03 – 0,12 µg/ml (Pitkälä ym. 2004), joten injektiona annetulla penisilliinillä saavutetaan utareessa tarvittavat pitoisuudet, vaikka penisilliinit leviävätkin elimistössä huonosti (Pyörälä ym. 2004). Intramammaarihoidon etuna on mikrobilääkkeen vähäisempi kulutus, kun hoito kohdistetaan suoraan utareeseen ja maitotilaan, sekä eläinystävällisyys, koska pistoksesta aiheutuva kipu vältetään (Pyörälä ym. 2004).

Hoidon pituudeksi riittää kolme vuorokautta (Pyörälä ym. 2004). Lypsykaudella antibiooteilla hoidettujen KNS-tulehdusten paranemisprosentit ovat olleet hyviä (Wilson ym. 1999), jopa 85,9 % (Taponen ym. 2006). Paranemistulokseen vaikuttavat paitsi käytetty antibiootti ja hoidon pituus, myös KNS-kannan kyky tuottaa β-laktamaasia (Simojoki ym. 2005). Taposen ym. (2006) tutkimuksessa myös beetalaktamaasipositivisista, antibioottein hoidetuista eläimistä kuusi yhdeksästä parani.

Jos KNS-mastiittia lähdetään hoitamaan antibiooteilla, käytettäväksi suositellaan β-laktamaasinegatiivisille KNS:lle ensisijaisesti G-penisilliinihoitoa paikallisesti (Evira

2010), ja β -laktamaasipositiivisille ensisijaisena hoitona umpeuttaminen tai eläimen karsinta ja toissijaisena hoitona kloksasilliini- tai linkosamidivalmistetta paikallishoitona herkkyysmäärityksen perusteella (Evira 2010). Riittäväksi herkkyysmääritykseksi katsotaan betalaktamaasitestaus (Simojoki ym. 2005).

Koagulaasinegatiivisilla stafylokokkeilla on kiisteltyjä ominaisuuksia kyvyssä suojata utaretta vakavampia infektiota aiheuttavia utaretulehdusbakteereja vastaan. Kyky perustuu bakteriosiinien, eli bakteerin itsensä muodostamien antimikrobiaalisten, muiden bakteerien kasvua inhiboivien proteiinien, tuottoon (Coelho ym. 2007, dos Santos Nascimento ym. 2005, DeVliegher ym. 2004). Matthews ym. (1990) tutkimuksessa todettiin luonnollisesti tarttuneen *S. chromogeneksen* suojaavan utaretta *S. aureukselta*. Tämä herätti kysymyksen, onko *S. chromogeneksen* hoitaminen järkevää, jos se ehkäisee *S. aureuksen* aiheuttamaa infektiota?

Donovan ym. (2006) tutkivat *S. aureuksesta* eristettyä bakteriofagi *phi11* tuottamaa endolysiiniä ja sen vaikutusta käsittelemättömään *S. aureukseen* ja koagulaasinegatiivisiin stafylokokkeihin. He havaitsivat endolysiinin hajottavan *S. aureus*- ja KNS (*S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. chromogenes*, *S. hyicus*, *S. warneri* ja *S. xylosus*) –soluja (Donovan ym. 2006).

Taustalla bakteriosiini- ja bakteriofagitutkimuksissa on ajatus tehdä niistä utaretulehduksen hoitoon käytettäviä, antibioottihoitoja korvaavia tai niitä tukevia valmisteita. Näiden käyttö utaretulehduksen hoidossa vaatii kuitenkin vielä rutkasti *in vivo* -kokeita.

7. KNS AIHEUTTAMAN UTARETULEHDUKSEN EHKÄISY

KNS-infektioiden ehkäisyssä erittäin tärkeitä ovat olosuhteet: siisti ja puhdas ympäristö jo sinällään ehkäisee patogeenien olemassaoloa ja madaltaa tautipainetta. Likainen parsi, johon on valunut maitoa, tarjoaa otollisen alustan bakteerien kasvuksi, sekä tilaisuuden bakteereille siirtyä utareeseen.

Sampimon ym. (2009) tekemässä tutkimuksessa kartoitettiin ensimmäistä kertaa Hollannin KNS-prevalenssia, ja myös siellä KNS:n todettiin olevan yleisin maidosta eristetty patogeeniryhmä. Samalla he tutkivat kyselylomakkeen avulla navetoiden yleisiä tiloja (navettamuoto, ilmastointi, alusmateriaali jne.), hygieniää (mm. poikimakarsinan pesutiheys), ruokintaa, lypsykäytäntöjä sekä utaretulehdusten hoitoja ja niiden merkitystä KNS:n aiheuttaman utaretulehduksen syntyyn. Tilastollisesti merkittäviä riskitekijöitä saada KNS-infektio olivat kesälaidunnus (kärpäset), juomaveden laatu, ja mm. umpilehmien pito vain yhdessä ryhmässä (Sampimon ym. 2009.) Tiineiden hiehojen tiedetään olevan alttiimpia KNS-infektioille kuin vanhempien lehmien, joten etenkin hiehojen olosuhteisiin, ruokintaan ja hyvinvointiin tulisi kiinnittää huomiota (Pyörälä & Taponen 2009).

Vedinkastoaineiden käytöllä pyritään ehkäisemään bakteeritartuntoja sekä hoitamaan rasitukselle joutuvan vetimen ihoa (Pitkälä ym. 2005). Vedinkaston käytön lopettamisen on havaittu lisäävän nimenomaan KNS:n sekä *Corynebacterium boviksen* aiheuttamia utaretulehduksia (Pyörälä & Taponen 2009).

Umpeenpanohoito toimii utaretulehduksen ehkäisykeinona parhaiten tartunnallisia patogeeneja vastaan (Pyörälä ym. 2004b). Nykysuosituksena kaikki soluttavat (yli 200 000 kpl/ml) ja etenkin koagulaasinegatiivisten stafylokokkien infektoimat lehmät kannattaisi hoitaa umpeenpanon yhteydessä (Pyörälä ym. 2004b).

KNS:n taudinaiheutuskyky on matala, joten KNS-infektion ehkäisyssä yksi tärkeimmistä seikoista on lehmän ja sen utareen hyvän vastustuskyvyn ylläpito (Simojoki ym. 2005). Sorkkien ja jalkojen kunto vaikuttaa välillisesti vedinpolkemien kautta myös utareterveyteen. Lisäksi utareiden ja jalkojen mahdollisten haavojen hoidosta tulee huolehtia. Lypsytekniikan täytyy olla hygieenistä ja lypsykoneen tulee olla asianmukainen ja toimiva, ettei vetimen päihin aiheuteta tarpeettomia vaurioita (Haltia ym. 2006). Østerås ym. (2006) tutkimuksessa havaitun KNS-infektioiden määrän kasvun arveltiin johtuvan osittain huonolaatuisemman ja vähemmän E-vitamiinia sisältävän rehun aiheuttamasta lehmän puolustuskyvyn heikkenemisestä (Østerås & Sølverød 2006). Ruokinnalla on epäsuora yhteys utareterveyteen, ja hyvälaatuisella ruokinnalla voidaan ehkäistä myös utaretulehduksia.

Suomessa on ollut järjestelmällistä utaretulehduksen vastustusta jo vuosikymmeniä, ja ponnistelut näyttävät tuottavan tulosta (Pitkälä ym. 2004). Hyvä terveydenhuoltosuunnitelma ja selkeä utareterveysuunnitelma ovat parhaat työkalut karjan KNS-ongelman ratkaisemisessa (Simojoki ym. 2005). Jatkuvasti lisääntyvä tieto KNS-lajeista, niiden etiologiasta, patogeneesistä ja virulenssieroista antaa mahdollisuuden suunnitella yhä tehokkaampia ja järkevämpiä hoitomuotoja, sekä ennaltaehkäisystrategioita KNS:a vastaan.

III KOKEELLINEN OSUUS

1. TUTKIMUKSEN TARKOITUS

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli vertailla kahden KNS-lajin, *S. simulansin* ja *S. epidermidiksen*, kykyä tartuttaa utare, sekä tutkia niiden aiheuttamaa tulehdusvastetta lehmässä.

2. AINEISTO JA MENETELMÄT

Tutkimus tehtiin kevään 2008 aikana Helsingin yliopiston tuotantoeläinsairaalassa, Mäntsälän Saarella.

Tutkimuksen metodina oli ns. cross-over -design, jossa kokeen aikana eläimelle tehdään kaksi tai useampia kokeellisia käsittelyjä. Koemallille on tyypillistä, ettei siinä käytetä erillistä kontrolliryhmää, vaan kontrollit ovat eläimessä itsessään. Tekemässämme kokeessa jokaiseen lehmään tartutettiin *S. epidermidis* ja *S. simulans*, toinen ensimmäisessä ja toinen toisessa koeosuudessa. Yksi neljännes toimi aina koeneljänneksenä ja joku toinen kontrollineljänneksenä. Koeneljännekset valittiin satunnaisesti, kuitenkin niin, ettei tartutettua neljänneestä enää otettu kontrolliksi, eikä samaa koeneljänneestä tartutettu uudelleen. Jos infektiota todettiin pysyväksi viimeisellä näytteenotokerralla, neljännes hoidettiin intramammaariantibiootilla (*S. simulans* Carepen 600 mg prokaiinipenisilliini (Vetcare Oy Suomi) ja *S. epidermidis* Wedeclox mastitis 1000 mg kloksasilliini (WDT, Garbsen, Saksa)). Valmisteet annosteltiin infektoituneeseen neljännekseen kerran päivässä kolmen päivän ajan. Paranemista seurattiin päivinä 11, 12 ja 13 hoidon jälkeen otetuilla bakteriologisilla näytteillä. Muuta lääkitystä lehmät eivät kokeen aikana saaneet.

Helsingin yliopiston koe-eläinlautakunta myönsi eläinkokeeseen tarvittavat luvat.

2.1 Eläimet

Kokeessa oli mukana seitsemän ayrshire-rotuista ja yksi holstein-friisiläinen lehmä. Lehmät olivat syntyneet vuosina 2004 (2 kpl) ja 2005 (6 kpl), ja kaikki olivat poikineet yhden kerran. Eläimet tulivat Saarelle kahdessa neljän eläimen ryhmässä, tammikuussa 2008 ensimmäiset neljä (ryhmä I) ja maaliskuussa 2008 toiset neljä (ryhmä II). Lehmiä pidettiin koko kokeen ajan Saaren tuotantoeläinsairaalan potilasnavetassa, vierekkäisissä parsissa. Parsissa oli parsimatot, sekä kuivikkeena runsas määrä kutterinpurua. Lehmät ruokittiin tuotoskauden vaihetta vastaavasti, suomalaisten ruokintasuositusten mukaan. Väkirehua annettiin neljä kertaa päivässä, ja korsirehua sekä vettä oli saatavilla vapaasti. Lehmät lypsettiin kaksi kertaa vuorokaudessa ja lypsyjärjestys oli jokaisella lypsykerralla sama.

Saapumisen yhteydessä lehmille tehtiin perusteellinen kliininen tutkimus, ja lisäksi utareen jokainen neljännes tutkittiin CMT-testillä. Kaikista neljänneksistä otettiin aseptiset maitonäytteet, jotka viljeltiin lampaanveriagarille mahdollisen bakteerikasvun toteamiseksi. Kaikki lehmät olivat saapuessaan kliinisesti terveitä. Ainoastaan Ulrikalla (II-ryhmä) havaittiin vähäistä sierainvuotoa ja yskää saapumisen yhteydessä.

Jokaisen lehmän neljänneskohtaisten maitonäytteiden soluluvut olivat ennen kokeen alkamista alle 100 000 solua/ml, eikä bakteerikasvua todettu.

2.2 Bakteerikannat

Tutkimuksessa käytettiin kahta KNS lajia: *S. epidermidistä* ja *S. simulansia*. Kannat identifioitiin sekä API Staph 32:lla (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France), että AFLP:n avulla, ja ne todettiin yhteneväisiksi keskenään molemmilla tekniikoilla.

Käyttämämme utaretulehdusta aiheuttavien KNS-lajien pesäkemorfologia eroaa hieman toisistaan. *S. epidermidiksen* pesäke on tyypillisesti vaalea ja alle 5mm halkaisijaltaan. Hemolyysi on heikko tai sitä ei ole ollenkaan. *S. simulansilla* pesäkkeen koko on halkaisijaltaan yli 5 mm, ja pesäkkeen väri on harmahtava tai vaalea. Hemolyysiä ei ole tai se on heikko (Holt ym. 1994.)

Käyttämämme KNS-bakteerikannat olivat eristetty vuosina 2004 - 2005, pysyväksi todetuista piilevistä utaretulehduksista, kahdelta eri eläimeltä. *S. epidermidis* -kannan aiheuttaman utaretulehduksen keskimääräinen soluluku oli ollut 385 000 solua/ml (154 000 - 1 177 000 kpl/ml). Kanta oli myös beetalaktamaasiposiitivinen eli resistentti penisilliinille (Taponen ym. 2007). *S. simulans* -kannan aiheuttaman utaretulehduksen keskimääräinen soluluku oli ollut 1 054 000 solua/ml (356 000 - 2 269 000 solua/ml). Kanta oli beetalaktamaasinegatiivinen, eli herkkä penisilliinille (Taponen ym. 2007). Kyseessä on samat kannat kuin Taponen ym. (2007) koagulaasinegatiivisten stafylokokkien persistenssiä käsittelevässä tutkimuksessa. *In vitro* -tutkimuksessa (Hyvönen ym. 2009) käyttämillämme KNS-kannoilla todettiin keskivertoa voimakkaampi kyky kiinnittyä ja tunkeutua ympäröiviin kudoksiin. Myös jakaantumisnopeuden on todettu olevan korkeampi kuin muilla *S. simulans* ja *S. epidermidis* -kannoilla (Hyvönen ym.2009).

3. TARTUTUSKOE

Kokeen järjestelyt perustuivat Simojoen ym. vuonna 2005 tekemään pilottitutkimukseen, jossa he kokeellisesti tartuttivat *S. chromogenes* viiteen kerran poikineeseen lehmään, tutkien bakteerin aiheuttamaa vastetta lehmissä (Simojoki ym. 2008).

Tekemämme tartutuskoe koostui yhteensä neljästä 21 vrk:n (-7 - +14 vrk) mittaisesta jaksosta. Ensimmäiset neljä lehmää olivat mukana kahdessa ensimmäisessä jaksossa, ja loput neljä kahdessa viimeisessä jaksossa, siten, että jokaiseen lehmään oli loppujen lopuksi tartutettu molemmat bakteerikannat.

Ennen tartutusta valittiin koeneljännes ja kontrollineljännes, joista otettiin sekä solu-että bakteriologiset näytteet. Tartutus tehtiin päivänä 0 klo 10.00 annostelemalla koeneljännekseen $5,7 \times 10^6$ pesäkettä muodostavaa yksikköä millilitrassa vastaava määrä bakteeriliuosta. Käytetty bakteerimäärä oli päätetty aikaisemman tartutuskokeen perusteella (Simojoki ym. 2008), ja sitä lisättiin aiempaan kokeeseen verrattuna selkeämmän kliinisen tulehdusreaktion aikaansaamiseksi. Vetimen pää puhdistettiin klorheksiidiinillä (Desinfektol-P, jossa 70p-% denat. A12t, Berner oy), jonka jälkeen

bakteereita sisältävä liuos annosteltiin ruiskulla vetimeen. Vetimen pää suljettiin sormin ja vedintä hierottiin, jotta bakteerit leviäisivät utarekudokseen mahdollisimman hyvin.

3.1 Näytteenotto-protokolla

Näytteenotto tapahtui kahtena ensimmäisenä päivänä neljä kertaa vuorokaudessa, ja seuraavina päivinä kaksi kertaa vuorokaudessa, aamu- ja iltalypsyn yhteydessä. Neljänä viimeisenä vuorokautena näytteet otettiin vain kerran vuorokaudessa aamulypsyn yhteydessä (taulukko 1.).

Taulukko 1. Näytteenottoaikataulu. Päivämäärät päivinä ennen ja jälkeen tartutuksen (päivä 0).

PVM	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4	+5	+6	+7	+10	+14 d
7:00	-2 d	-24 h	-3 h	+21 h	+45 h	+69 h	+93 h	+117 h	+141 h	+7 d	+10 d	+14 d
10:00			TARTUTUS									
13:00				+27 h								
14:00			+4 h									
16:00			+6 h	+30 h	+54 h	+78 h	+102 h	+126 h				
22:00			+12 h	+36 h								

Ensimmäiseksi jokaisella näytteenottokerralla utare puhdistettiin ja siitä otettiin alkusuihkeet. Alkusuihkeiden jälkeen teimme CMT-testin. Ennen reagenssin lisäämistä arvioimme aistinvaraisesti maidon ulkonäön (väri, kokkareet, vetisyys). Tämän jälkeen lisäsimme solutestireagenssin ja arvioimme tuloksen asteikolla 1 - 5. Maidon ulkonäköarviot kirjasimme omin sanoin kaavakkeelle myöhemmin tehtävää pisteytystä varten.

CMT:n jälkeen otimme viralliset solunäytteet, sekä koe- että kontrollineljänneksistä. Näytteet otettiin pieniin kannellisiin muovipurkkeihin, joihin oli etukäteen lisätty säilöntäainetabletit. Näytteet säilytettiin jääkaapissa, ja lähetettiin joka toinen päivä Valio Oy:n aluelaboratorioon tutkittavaksi fluorometrisellä menetelmällä (Fossomatic).

Solunäytteiden jälkeen otimme aseptisesti maitonäytteet sekä koe- että kontrollineljänneksistä bakteeriviljelyä sekä maidon NAGaasi-aktiivisuusmäärittystä varten. Lopuksi lehmät lypsettiin mittalypsykoneella (DeLaval) siten, että maitomäärät saatiin mitattua neljänneskohtaisesti. Mittalypsy tehtiin päivinä -2 - +7 tartutuksesta.

Aseptisesti otetut maitonäytteet viljeltiin näytteenoton jälkeen lampaanveriagarille (Tammer-Tutkan maljat, Tampere, Suomi). Koeneljänneksen näytteestä pipetoitiin maljalle 100 mikrolitraa maitoa, ja levitettiin kertakäyttöisellä 10 mikrolitran muovisilmukalla. Jos kasvun oletettiin olevan runsasta, laimensimme näytteet aina 10^{-4} asti. Jokainen valmistettu vahvuus viljeltiin alkuperäisen näytteen lisäksi. Laimennusnesteenä käytimme 0,9 % NaCl:a (Natriumklorid Braun 9mg/ml inj., B. Braun Melsungen AG, Saksa). Viljelyn jälkeen maljojen annettiin kuivahtaa hetki huoneenlämmössä, jonka jälkeen ne siirrettiin lämpökaappiin + 37 °C lämpötilaan vuorokaudeksi. Kontrollineljänneksistä otetut näytteet viljeltiin kuten edellä kerrottu, mutta näytemäärä oli vain 10 mikrolitraa.

Vuorokauden kestäneen inkuboinnin jälkeen maljat luettiin: bakteeripesäkkeiden määrä laskettiin, niiden ulkonäkö ja -muoto tarkasteltiin, ja mahdollisista poikkeavista pesäkkeistä tehtiin jatkoviljelyt ja -tutkimukset. Kaikki tulokset kirjattiin ylös. Maljojen, joilla kasvu oli huonoa tai epämääräistä, annettiin kasvaa lämpökaapissa vielä toinenkin vuorokausi uudelleentarkastelua varten.

Aseptisesti otetuista näytteistä pipetoitiin maitoa myös eppendorffputkiin. Putket pakastettiin (-80 °C) jatkotutkimuksia mm. maidon NAGaasi-aktiivisuuksien määrittystä varten.

Jokaisella näytteenottokerralla teimme lehmille myös kliinisen tutkimuksen, jossa arvioimme eläimen yleisolemuksen, ulosteen laadun, kuuntelimme pötsiäänät, mittasimme ruumiinlämmön ja sydämfrekvenssin, sekä kintereiden välisen etäisyyden. Lisäksi palpoimme utareen, jolloin kiinnitimme huomiota mahdolliseen turvotukseen, palpaatioarkuuteen, kipuun ja kuumotukseen. Kaikki oireet arvioitiin aistinvaraisesti, lukuunottamatta ruumiinlämpöä ja kintereiden välisen etäisyyden mittausta.

Jaoimme oireet kolmeen eri kategoriaan: yleisoireisiin, paikallisoireisiin sekä maidossa näkyviin muutoksiin. Kirjasimme tiedot ylös sanallisesti ja pisteytimme ne jälkeenpäin

asteikolla 1 - 3, käyttäen myös puolikkaita arvoja (1: ei yhtään tai vähäisiä muutoksia, 3: vakavia tai voimakkaita muutoksia). Samaa pisteytysmetodia käytettiin Simojoen ym. pilottitutkimuksessa (Simojoki ym. 2008)

Yleisolemus arvioitiin joko normaaliksi (1), nuutuneeksi (2) tai vakavasti depressoituneeksi (3). Ruokahalua ja ulostetta arvioitiin seuraavasti: normaali ruokahalu ja uloste (1), heikentynyt ruokahalu/ripuli (2), ei syö/voimakas ripuli/ei ulostetta (3). Pötsin auskultaatio arvioitiin normaaliksi (1), heikentyneeksi (2) tai ei ääniä (3). Sydänsyke oli normaali (1), kohonnut (2) tai erittäin nopea (3).

Utareen arvioinnissa normaalia (arvo 1) kuvasi kovuudeltaan normaalin tuntuinen utare, jossa ei havaittu turvotusta tai kipua. Eläin ei myöskään saanut aristaa utareen tunnustelua, neljännes ei saanut olla kutistunut eikä sen pintalämpötilassa voitu havaita muutoksia. Arvon 2 sai utare, jossa tunnustellen havaittiin kohtalaista kovuutta, tai paikallisia kovettumia, kohtalaista turvotusta, aristusta, kohtalaista pintalämpötilan nousua tai kutistumista. Jos utare tuntui kauttaaltaan kovalta, pintalämpötila oli selvästi noussut tai laskenut, utare oli voimakkaasti turvoksissa tai kutistunut, tai utare oli niin kipeä, että sen tunnustelu aiheutti potkimista, sille annettiin arvo 3.

Maidon aistinvaraiseen arviointiin kuului maidon ulkonäön arviointi sekä CMT (tulokset kohdassa maidon solupitoisuudet). Maito oli koostumukseltaan joko normaalia (1), voimakkaan vetistä/kellertävää tai sisälsi hieman kokkareita(2). Jos maito oli heraa tai siinä oli runsaasti kokkareita, se arvioitiin voimakkaasti muuttuneeksi (3).

Lisäksi otimme verinäytteet muita määritettäviä analyysejä, kuten SAA:ta varten. Verinäytteistä sentrifugoitiin seerumi erilleen ja se pakastettiin -80 °C syväjähän myöhempiä analyyseja varten. SAA:n määrittäminen tapahtui myöhemmin kaupallisella testimenetelmällä (Tridelta Development, Wiclow, Ireland).

Verinäytteiden otto varten lehmille oli asetettu kanyylit *Vena jugularikseen*. Kanyloimalla pyrittiin välttämään turhaa verinäytteen ottamisesta aiheutuvaa toistuvaa kipua. Eläimet kanyloitiin *v. jugularikseen* normaaliprotokollan (karvojen ajo, desinfiointi, paikallispuudute) mukaan. Kanyyliinä käytettiin siihen soveltuvaa pehmeää ja taipuisaa silikoniputkea. Kanyyliletku pujotettiin *v. jugularikseen* neulan avulla, ja kiinnitettiin ihoon muutamalla tikillä. Päälle kiedottiin itsekiinnittyvää haavateippiä.

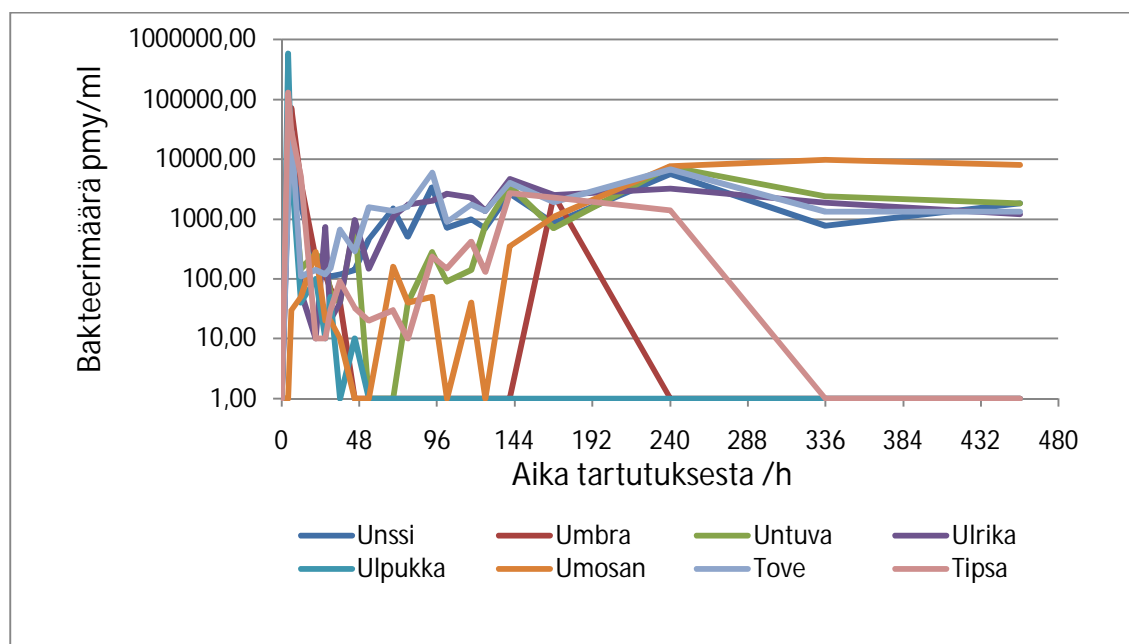
Verinäytteenoton yhteydessä kanyylista vedettiin ensin noin 10 ml verta, jotta kanyyli puhdistuisi. Sen jälkeen otettiin näytteeksi verta 20 ml ruiskuun, ja näytteenoton jälkeen kanyyliin ruiskutettiin 3 - 4 ml hepariinia. Mikäli kanyyli oli vioittunut tai lähtenyt irti, verinäytteen otto tapahtui v. *jugulariksesta* perinteisesti joko vakuumilla tai avomenetelmällä. Veri siirrettiin ruiskusta 10 ml seerumiputkiin.

4. TULOKSET

Kaikki lehmät, jotka tartutettiin, infektoituivat. Molemmissa tartutuksissa oireet vaihtelivat lievästä kohtalaisiin, mutta lehmäkohtainen vaihtelu oli huomattavaa.

4.1. Bakteerit

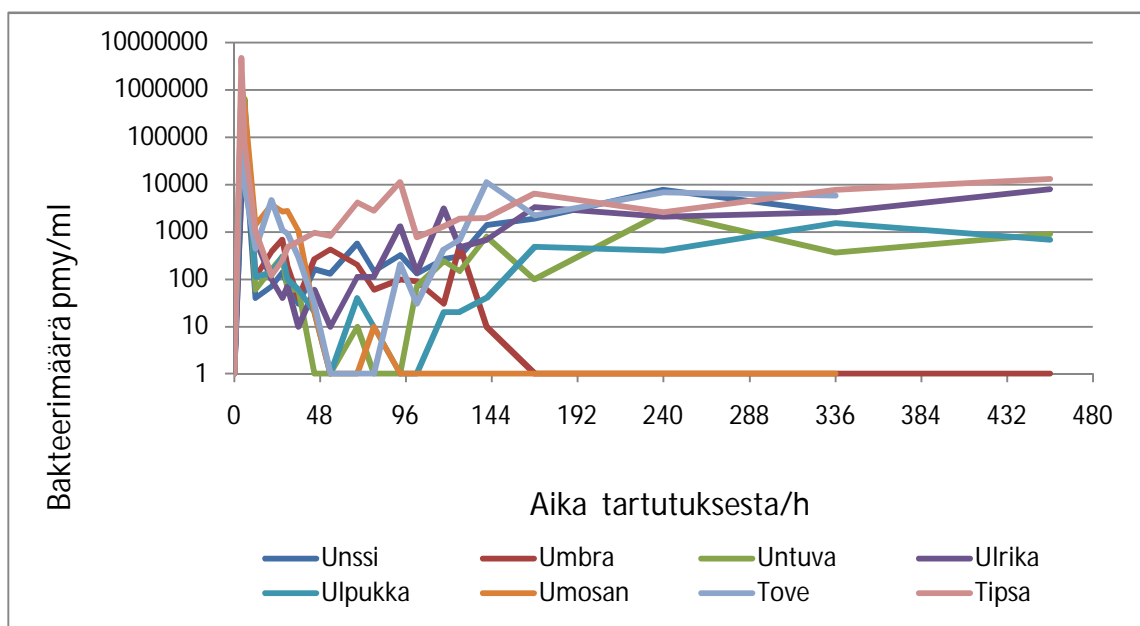
S. epidermidixen aiheuttama tulehdusreaktio oli bakteerimäärällisesti voimakkaimmillaan 4 - 6 tuntia tartutuksen jälkeen seitsemällä lehmällä kahdeksasta (vaihteluväli 2000 - 580 000 pmy/ml). + 12 tuntia tartutuksesta bakteerien määrä putosi jo murto-osaan edellisestä mittauksesta (vaihteluväli 40 - 5200 pmy/ml). Yhdellä lehmällä (Umosan) bakteerien lisääntyminen havaittiin lievänä (280 pmy/ml) vasta + 20 tuntia tartutuksen jälkeen. Bakteerikasvua ei tämän jälkeen Umosanilla havaittu ennen päivää + 14 (9900 pmy/ml) jolloin bakteerimäärät olivat korkeimmillaan.



Kuva 1. *S. epidermidixellä* tartutettujen lehmien maidon bakteerimäärät pmy/ml.

S. epidermidis aiheutti bakteeriviljelyiden perusteella pysyvän infektion viidelle lehmälle. Viimeisessä bakteeriviljelyssä bakteerimäärät vaihtelivat 770 ja 9900 pmy/ml välillä. Kolme lehmää parantui *S. epidermidiksestä* täysin koejakson aikana. Parantuneista Umbra ja Ulpukka olivat päässeet eroon infektiosta jo + 54 tuntia tartutuksen jälkeen. Kolmannen koejakson aikana parantuneeksi todetun lehmän (Tipsa) bakteerierityksen todettiin loppuneen vasta 14 päivää tartutuksen jälkeen (kuva 1).

S. simulansin aiheuttama bakteerimäärien nousu maidossa oli myös voimakkaimmillaan 4 - 6 tuntia tartutuksesta. Bakteerikasvu, mitattuna pmy/ml, oli kuitenkin huomattavasti runsaampaa kuin *S. epidermidiksellä* tartutettujen lehmien maidossa, ja havaittiin voimakkaana kaikilla kahdeksalla lehmällä (hajonta 6500 - 4 714 000 pmy/ml)(kuva 2).



Kuva 2. *S. simulansilla* tartutettujen lehmien maidon bakteerimäärät pmy/ml.

Ainoastaan kaksi eläintä parani *S. simulans* -tartutuksesta (Umosan ja Umbra), muilla todettiin pysyvä tartunta koejakson lopussa (hajonta viimeisellä näytteenotokerralla 370 - 7600 pmy/ml). *S. simulansin* bakteerimäärien vaihtelu oli lehmäkohtaisesti suurta ensimmäisen viikon aikana. Osalla lehmistä (Untuva, Tove, Ulpukka) bakteerikasvua ei havaittu enää muutaman vuorokauden kuluttua tartutuksesta, mutta bakteerimäärät nousivat jälleen koejakson lopussa merkittävästi, yli 1000 pmy/ml.

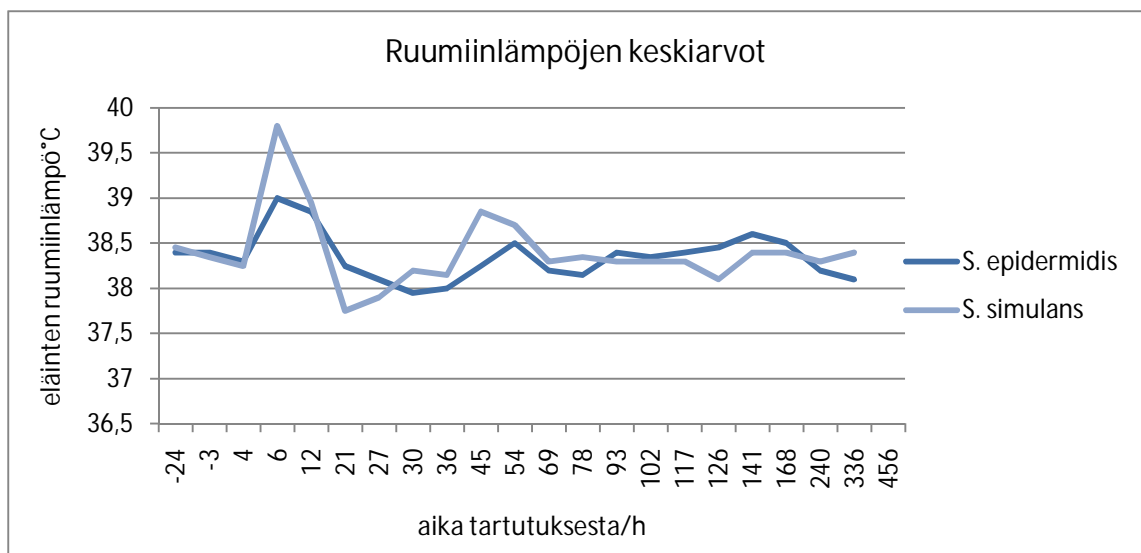
Kaikilla lehmillä havaittiin joko lieviä tai kohtalaisia systeemisiä oireita. Yleisoreissa, eli ruokahalun muutoksissa, pötsin toiminnassa, ulosteen laadussa, sydäntahtissa tai kintereiden välisessä etäisyydessä ei havaittu merkittäviä muutoksia.

4.2.1 Ruumiinlämpö

Eläinten ruumiinlämmöt nousivat noin 4 h tartutuksen jälkeen riippumatta siitä, kumpi bakteerilaji oli kyseessä, ja 21 h kuluttua tartutuksesta kaikkien lehmien ruumiinlämmöt olivat normalisoituneet, eivätkä enää nousseet riippumatta siitä, oliko maitonäytteissä havaittavissa bakteerikasvua vai ei.

S. epidermidisen aiheuttamat muutokset ruumiinlämmössä olivat lievempiä kuin *S. simulansin* aiheuttamat muutokset. *S. epidermidiksellä* tartutettaessa ruumiinlämpö nousi eniten Untuvalla, Ulpukalla ja Tipsalla, lähelle +40 °C. *S. simulans* aiheutti radikaalimmat ruumiinlämmön nousut 4 - 21 h tartutuksesta, jolloin osalla lehmistä ruumiinlämpö nousi yli 40 °C (Untuva, Ulpukka, Umosan).

Helmikuun tartutuksen jälkeen Ulpukka, johon oli tartutettu tällöin *S. simulans*, loi vasikkansa, joten emme voi olla varmoja kuinka paljon enemmän kohtutulehdus nosti kyseisen eläimen ruumiinlämpöä kuin mitä *S. simulans* olisi nostanut. Luomisen aiheutti Evirassa tehdyn tutkimuksen mukaan *Bacillus cereus* -bakteeri, joka on yleinen luomisen aiheuttajabakteeri naudoilla.

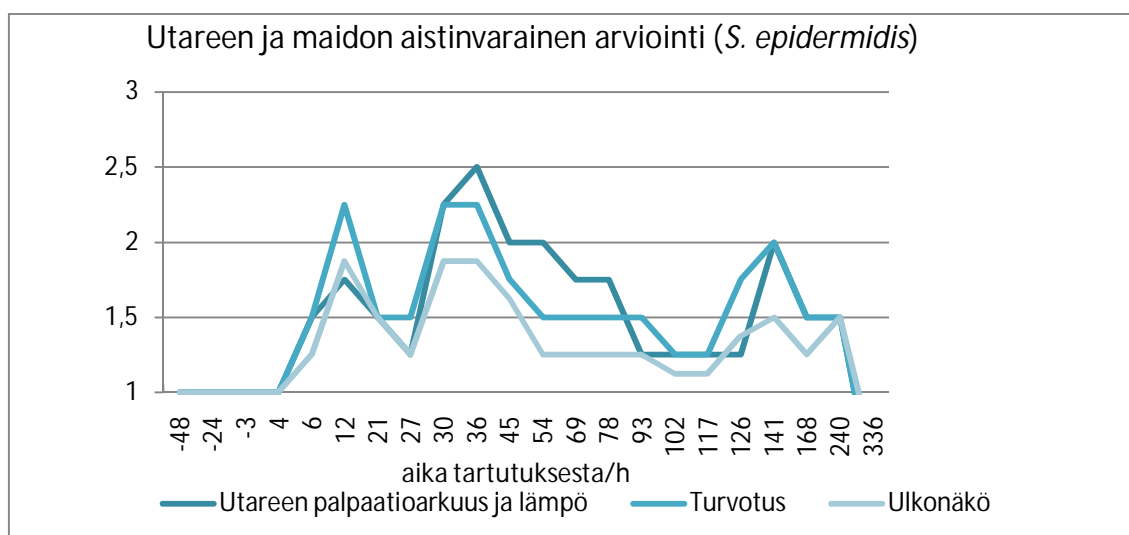


Kuva 3. S. epidermidiksen ja S. simulansin aiheuttamat ruumiinlämpöjen vaihtelut tartutuskokeiden aikana.

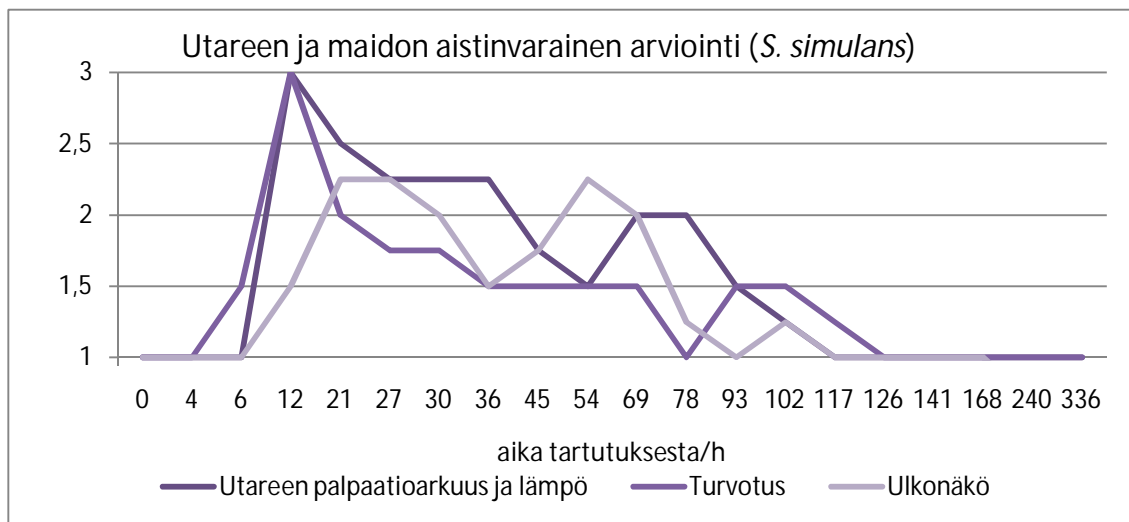
4.2.2. Utareen ja maidon arviointi

S. epidermidiksellä tartutetuilla eläimillä + 12 tuntia tartutuksen jälkeen kaikissa kolmessa muuttujassa, utareen arkuudessa ja lämpötilassa, turvotuksessa, sekä maidon ulkonäössä havaittiin selviä muutoksia verrattuna normaalitilaan. Keskimäärin oireet saivat tällöin arvon kaksi, palautuen + 27 tunnin jälkeen taas lähelle alkuperäistä tilaa (arvo1). + 36 tuntia tartutuksesta etenkin utareen arkuuden ja pinalämpötilan oireilu palasi (arvo 2,5). Myös turvotus ja maidon ulkonäkö muuttuivat (arvo 2). Viisi päivää tartutuksen jälkeen jokainen mitattu muuttuja oli laskenut lähelle normaalitasoa (arvo1), kunnes palpaatioarkuus, turvotus ja utareen pinalämpötila kohosivat kolmannen kerran + 141 h tartutuksesta(arvo 2) (kuva 4.).

S. simulansilla tartutettaessa oireisto oli selkeämpi. +6 h tartutuksesta utareen palpaatioarkuus, lämpötila sekä turvotus nousivat korkeimpaan mahdolliseen arvoon (3). Turvotus laski huomattavasti reilun vuorokauden kuluttua, ja utare normalisoitui +78 h tartutuksen jälkeen. Koejakson lopulla oli havaittavissa uudestaan lieviä utaremuutoksia. Maidon ulkonäkö alkoi muuttua vasta + 21 h tartutuksesta (arvo 2) ollen koholla kokeen keskivaiheen ajan. Maidon ulkonäkö normalisoitui + 93 h tartutuksesta (kuva 5.)



Kuva 4. Utareen palpaatioarkuus ja lämpötila, turvotus, sekä maidon ulkonäkö aistinvaraisesti arvioituna ja pisteytettynä asteikolla 1 - 3. Tartutusbakteerina *S. epidermidis*.

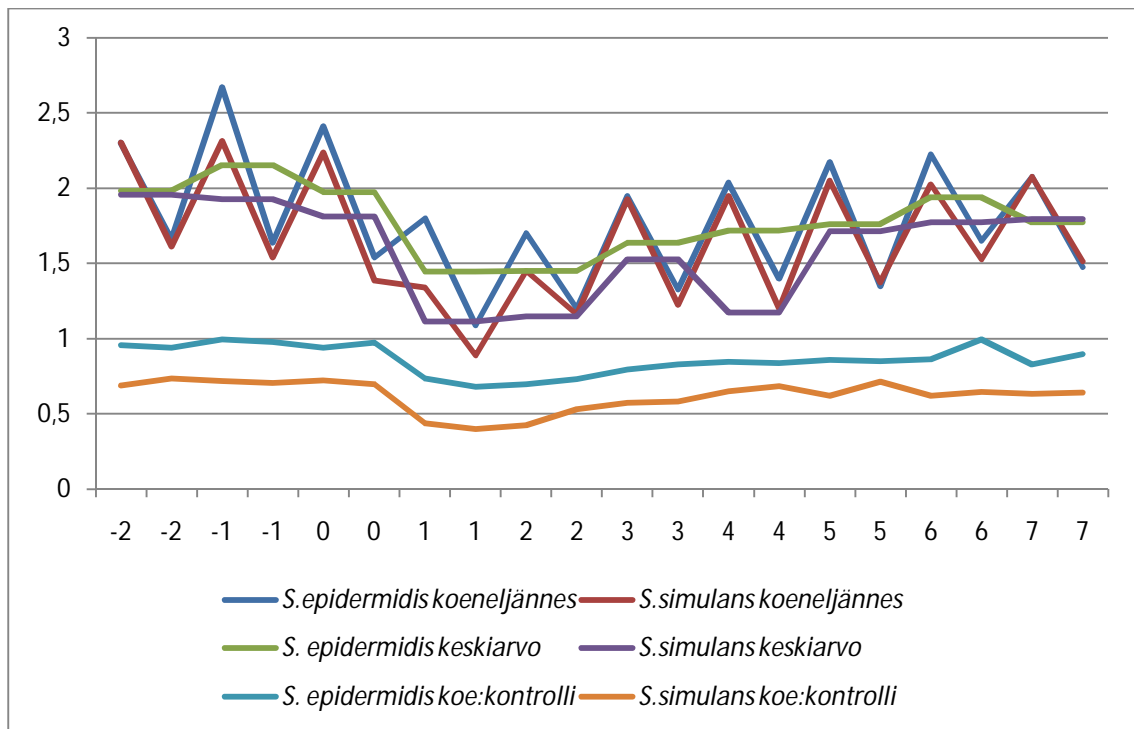


Kuva 5. Utareen palpaatioarkuus ja lämpötila, turvotus, sekä maidon ulkonäkö aistinvaraisesti arvioituna ja pisteytettynä asteikolla 1 - 3. Tartutusbakteerina S. simulans.

4.3 Maitomäärä

Neljänneskohtaiset maitomäärät mitattiin mittalypsyllä päivinä 1 - 7 vuorokautta tartutuksen jälkeen kaksi kertaa päivässä, aamu- ja iltalypsyllä. Kummankin KNS-bakteerilajin infektoimien neljännesten maitomääriä verrattiin keskenään. Lisäksi neljännesten maitomääristä laskettiin suhdeluku: koeneljänneksen maitomäärä verrattuna kontrollineljänneksen maitomäärään (kuva 6). Tällä yritettiin minimoida virhettä, joka aiheutuu siitä, että takaneljännekset tuottavat yleensä enemmän maitoa kuin etuneljännekset.

Maitomäärät laskivat heti tartutuksen jälkeen riippumatta infektion aiheuttaneesta bakteerista. *S. epidermidiksellä* tartutettujen lehmien maitomäärät laskivat maltillisemmin verrattuna *S. simulansilla* tartutettujen eläinten lypsämiin maitomääriin, kuitenkin tilastollisesti merkittävää eroa ei lajien välille saatu (Simojoki ym. 2011). Esimerkiksi Umosanilla *S. simulansin* vaikutuksesta maitomäärä putosi 2,7 litrasta (mitattu aamulypsyllä -2 vrk tartutuksesta) 0,5 litraan (aamulypsy +1 vrk tartutuksen jälkeen). Seitsemän päivää tartutuksen jälkeen yhdenkään eläimen maitomäärä ei ollut palautunut samalle tasolle kuin ennen tartutusta, riippumatta bakteerilajista.

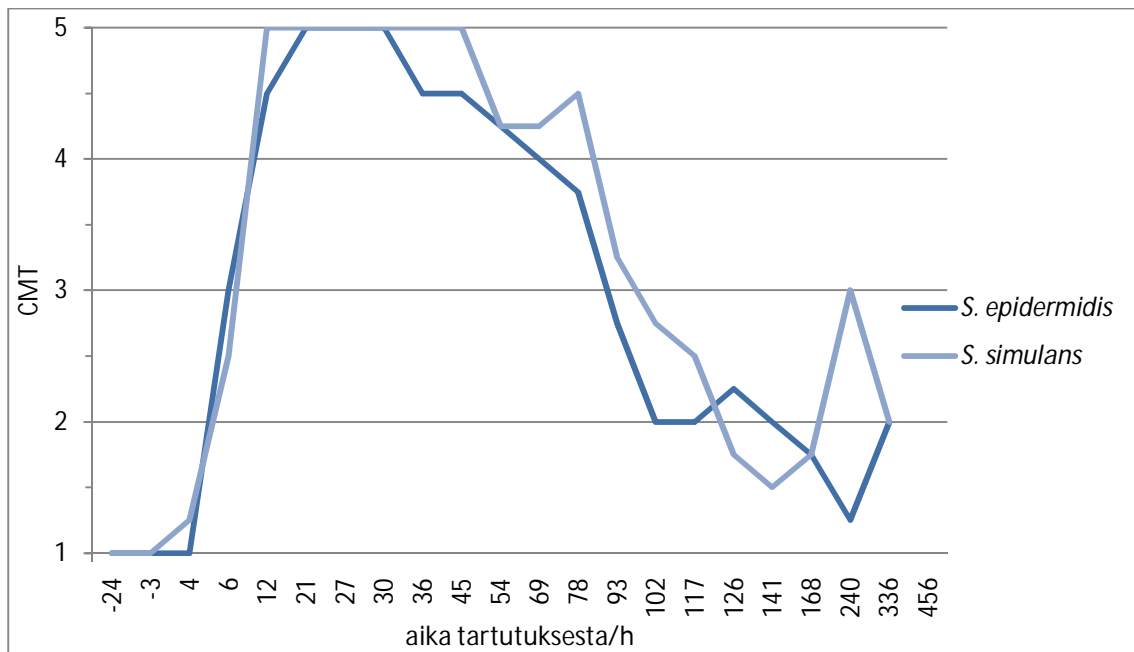


Kuva 6. *S. epidermidiksellä* ja *S. simulansilla* tartutettujen koeneljännesten maitomäärät, niiden keskiarvot, sekä suhdeluvut verrattuna kontrollineljänneksiin, päivinä -2 - +7 vrk.

4.4 Maidon solupitoisuus

Molemmat bakteerilajit aiheuttivat selkeät muutokset maidon solupitoisuuksissa arvioituna CMT:n avulla. *S. epidermidis* aiheutti enemmän hajontaa tuloksiin, ja CMT arvioitiin arvojen 4 ja 5 välille vaihtelevasti +12 - 54 h tartutuksesta. Umosan ei reagoinut yhtä voimakkaasti tartutukseen solupitoisuudella mitattuna, ja CMT-arvo kävi korkeimmillaan vain arvossa 3.5 (+ 27 h tartutuksesta). *S. simulans* -tartutuksessa soluluku sai arvon 5 jokaisella lehmällä 12 h sisällä tartutuksesta (kuva 7).

S. epidermidiksellä tartutettujen lehmien solupitoisuudet laskivat lähelle CMT-arvoa yksi koejakson lopussa, mutta kummallakin KNS-lajilla tartutettaessa keskiarvot viimeisenä koepäivänä (+14 d) olivat kaksi, eli maidon solupitoisuus ei palautunut lähtötasolle kokeen aikana (kuva 7). Solutestin arvo 2 tulkitaan yleensä olevan noin 100 000 - 250 000 solua/ml.

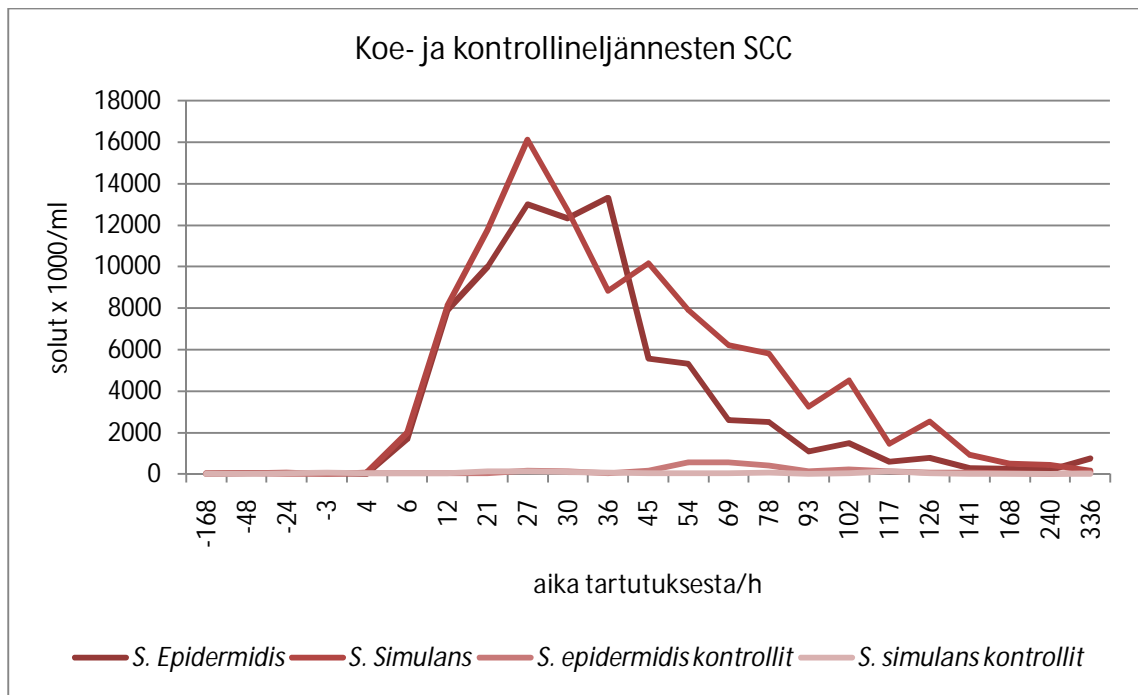


Kuva 7. *S. epidermidiksen* ja *S. simulansin* aiheuttamat CMT:n avulla mitatut solupitoisuudet tartutuskokeen aikana.

Solumäärien tarkat arvot mitattiin Valio Oy:n laboratoriossa. Molemmat bakteerit aiheuttivat somaattisten solujen radikaalin nousun maidossa kuusi tuntia tartutuksen jälkeen (kuva 8). *S. epidermidiksen* solut olivat korkeimmillaan (481 000 - 26 092 000 /ml) + 27 ja +36 h tartutuksesta, puolittuen + 45 tuntiin mennessä. *S. epidermidiksellä* tartutettujen koeneljännesten soluluvut laskivat lähtötasolle (alle 100 000/ml) vain kahdella lehmällä, Ulpukalla ja Tovella. Ulpukka parantui tartutuksesta, mutta soluluvun alenemisesta huolimatta Tovelille jäi pysyvä infektiio.

S. simulansilla tartutettujen lehmien maidon soluluvut nousivat + 12 tuntiin asti kuten *S. epidermidikselläkin* tartutettujen, mutta jatkoivat nousuaan aina keskiarvoltaan 16 000 000 soluun/ml (+27 h) (vaihteluväli 7 500 000 – 26 899 000/ml). Solupitoisuudet laskivat tasaisesti kokeen loppua kohden, päätyen lähes normaalitasolle (30 000 - 371 000/ml). Vain Tipsan, Ulrikan ja Umbran soluluvut olivat laskeneet alle 100 000/ml viimeisen näytteenoton aikana huolimatta siitä, että niiden infektiot todettiin pysyviksi (kuva 2).

Kummassakin tartutuksessa kontrolleiksi valittujen neljännesten solupitoisuudet pysyivät alle 100 000 solua/ml (kuva 8).

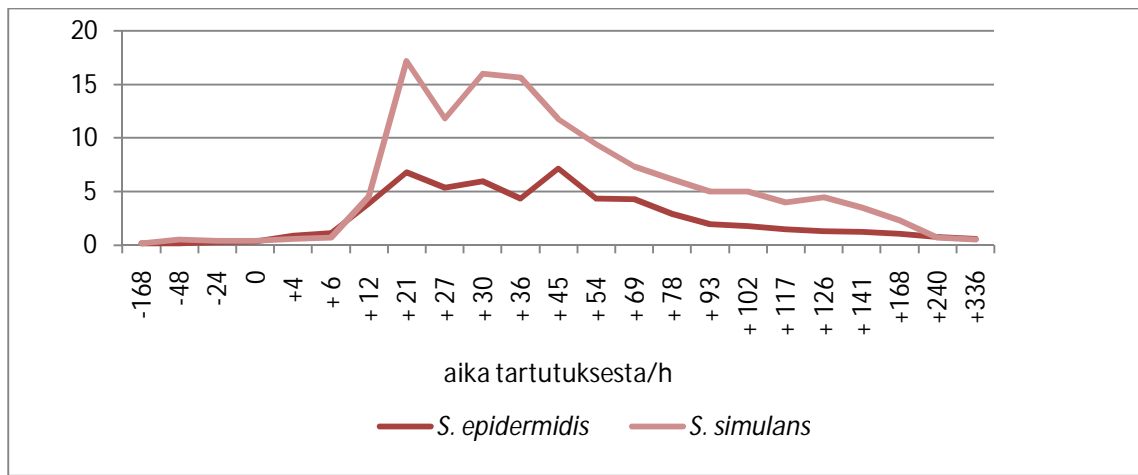


Kuva 8. *S. epidermidiksellä* ja *S. simulansilla* tartutettujen koe- ja kontrollineljännesten somaattiset soluluvut (SCC).

4.5 NAGaasi (N-asetyyli-beta-D-glukosaminidaasi)

Maidon NAGaasi-aktiivisuus nousi molempien bakteerilajien aiheuttamana +12 h kohdalla (kuva 9). *S. epidermidiksen* aiheuttamassa tulehduksessa maidon NAGaasi-aktiivisuus oli huipussaan + 21 h (6,83) ja + 27 h (7,18) tartutuksesta. Aktiivisuudet laskivat lähes samalle tasolle kuin mitä olivat ennen kokeen alkua (vaihtelu 0, 349 - 0, 775 viimeisessä näytteenotossa).

S. simulansin aikaansaama maidon NAGaasi-aktiivisuuden nousu tulehduksen aikana oli yli kaksinkertainen verrattuna *S. epidermidiksen* aiheuttamaan (kuva 9). Arvot olivat huipussaan + 21 h tartutuksesta (17,17) ja + 30 h (16,00) tartutuksesta. Maidon NAGaasi-aktiivisuudet laskivat tämän jälkeen lähes lähtötasolle, ja viimeisellä näytteenotokerralla arvot olivat normaalit (0,27 – 1,08). *S. simulansilla* tartutettujen eläinten maidon NAGaasi-aktiivisuudet säilyivät lähes kaksinkertaisina verrattuna *S. epidermidiksellä* tartutettuihin (+ 12 h - + 168 h)(kuva 9).



Kuva 9. S. epidermidiksen ja S. simulansin aiheuttamat maidon NAGAasi-aktiivisuuksien muutokset koeneljännesten maitonäytteissä.

5. POHDINTA

Koagulaasinegatiivisista stafylokokeista on viime vuosina tullut yhä yleisempi ja merkittävämpi utaretulehdusta aiheuttava bakteeriryhmä (Pitkälä ym. 2006, Pyörälä & Taponen 2009, Tenhagen ym. 2006). Tutkimustiedon lisääntyessä on havaittu koagulaasinegatiivisten stafylokokkien korostunut merkitys etenkin niillä tiloilla, joilla vakavampien mastiittipatogeenien esiintyvyys on saatu alenemaan. Maidontuottajien kiinnostus KNS:a kohtaan on lisääntynyt, koska tavoitteena on tuottaa mahdollisimman korkealaatuista maitoa paremman hinnan vuoksi ja välttää vakavia yleisoireita KNS-utaretulehduksissa usein havaitakaan, maidon lehmäkohtaiset solupitoisuudet voivat nousta huomattavasti (Taponen ym. 2007, Simojoki ym. 2008). KNS-infektioden on havaittu olevan nimenomaan hiehojen tai kerran poikineiden lehmien ongelma ja utaretulehdus heti tuotosuran alussa alentaa paitsi kyseisen tuotoskauden maitomäärää, se voi myös vaikuttaa lehmän elinikäistuotokseen (Pyörälä & Taponen 2009).

KNS:n aiheuttaman utaretulehduksen aiheuttama kliininen kuva on lievä ja vasteet ovat kovin lehmäkohtaisia. Tämä on havaittu niin spontaanisti sairastuneiden lehmien kohdalla, kuin kokeellisissakin tartutuksissa mm. lampaila (Winter & Colditz 2002, Winter ym. 2003) sekä Simojoki ym. (2008) pilottitutkimuksessa lehmillä. Tekemässämme tartutuskokeessa käytimme tartutukseen verrattain suurta bakteerimäärää, jotta saisimme vasteet mahdollisimman hyvin esille. Kaikki tartutetut

lehmät infektoituivat, ja kaikilla havaittiin kliiniset vasteet, vaikka tartutukseen käytettiin piilevistä utaretulehduksista eristettyjä bakteerikantoja.

Myös tässä tutkimuksessa tulehdusvasteissa oli huomattavia lehmäkohtaisia eroja. Esimerkiksi Ulpukka ja Untuva vastasivat tartutukseen korkealla kuumeella, riippumatta bakteerilajista. Ulpukan utareessa havaittiin myös voimakkaat muutokset hyvin varhaisessa vaiheessa kummallakin tartutuskerralla. Ulpukka tartutettiin ensimmäisellä kerralla *S. epidermidiksellä*, josta se parantui spontaanisti. Vaikka Ulpukan vaste oli vielä hieman voimakkaampi *S. simulans* -tartutuksessa, infektiio jäi pysyväksi. Untuvalle puolestaan jäi molemmista tartutuskerroista pysyvä tartunta, vaikka sen tulehdusvaste oli merkittävä. Herää kysymys, olisivatko toisten tartutuskertojen vasteet poikenneet nyt havaituista, mikäli lehmät eivät olisi olleet infektoituneina muutamaa viikkoa aiemmin? Onko lehmän elimistön tulehdusvaste lievempi tai voimakkaampi sen sairastuessa pian edellisen infektion jälkeen riippumatta bakteerista, vai onko se aina pelkästään bakteerikohtainen?

Kaikilla lehmillä näkyvä akuutti infektiivaste oli lyhyt ja ruumiinlämmöt normalisoituivat vuorokaudessa. Muutokset utareessa, maidon ulkonäössä sekä soluluvussa kestivät useita päiviä, eivätkä esimerkiksi maidon soluluvut palautuneet kokeen aikana lainkaan lähtötasolleen (CMT). Maidon soluluvut laskivat alle 100 000 solun/ml vain muutamalla lehmällä, ja osalla niistäkin todettiin pysyvä infektiio. Maidon NAGAasi-aktiivisuus korreloi hyvin tässä tutkimuksessa somaattisten solujen kanssa. Ainoa ero oli, että *S. simulansin* aikaansaamat muutokset maidon NAGAasi-aktiivisuudessa olivat lähes kaksinkertaiset verrattuna *S. epidermidiksen* aiheuttamiin aktiivisuuksiin.

Maitomäärät eivät palautuneet kokeen aikana lähtötasolle yhdelläkään lehmällä. Nämä tulokset tukevat aikaisempia tutkimuksia ja ajatuksia siitä, että KNS:n aiheuttamien tulehdusten vaikutukset maidon laatuun ja määrään voivat olla pitkäaikaisia ja merkityksellisiä (Gröhn ym. 2004, Pyörälä & Taponen 2009).

Bakteerien eliminaatiossa oli myös suuria lehmäkohtaisia eroja. Yhteinen piirre oli bakteerimäärien voimakas kasvu pmy/ml ensimmäisten 4 - 6 tunnin jälkeen tartutuksesta, riippumatta KNS-lajista. Bakteerien suuri määrä aiheutti ruumiinlämmön nousun jokaisella koe-eläimellä: toisilla lievän, toisilla jopa +41,2 °C. Kun kuume laski,

myös bakteerimäärät olivat pudonneet murto-osaan korkeimmista lukemistaan. Poikkeuksen edellä mainittuun teki Umosan, jolla *S. epidermidis* -tartutuksen yhteydessä bakteerikasvu (9 900 pmy/ml) havaittiin vasta päivänä 14 ja jäi pysyväksi. Umosanilla ei myöskään ollut kuumetta koko *S. epidermidis* tartutuksen aikana. *S. simulans* -tartutuksessa Umosan nosti + 41,2 °C kuumeen, ja parani kokonaan infektiosta + 96 tuntia tartutuksesta. Koska jokainen koe-eläin sai samat annokset bakteeriliuosta ja samat KNS-kannat, tämän kokeen perusteella lehmän oma puolustuskyky näyttäisi olevan erittäin merkityksellinen KNS-infektion torjumisessa.

S. epidermidis -tartutuksista viidellä lehmällä kahdeksasta todettiin kokeen lopussa pysyvä infektio. *S. simulans* -tartutuksissa kuudelle lehmälle kahdeksasta jäi pysyvä infektio. KNS-tutkimuksissa juuri nämä kaksi lajia ovat aiheuttaneet pysyviä infektiota lehmille, eli jääneet persistoimaan utareeseen (Taponen ym. 2007, Thorberg ym. 2006). Käyttämämme kannat olivat eristetty Taposen ym. (2007) tutkimuksesta, joten tartuntojen pysyvyys oli odotettavissa. Samoilla KNS-kannoilla on todettu keskivertoa kantaa voimakkaampi kyky kiinnittyä ja tunkeutua ympäröiviin kudoksiin (Hyvönen ym. 2009). Myös jakaantumisnopeus oli korkeampi kuin muilla vastaavilla kannoilla (Hyvönen ym. 2009). Mikä näiden *in vitro* -tulosten merkitys on meidän koelehmien vasteissa? Tulosten perusteella emme voi sanoa, olivatko havaitut vasteet nimenomaan kyseisten keskivertoa virulentimpien KNS-kantojen aikaansaamia, kuinka suuri merkitys oli tartutusannoksella, vai johtuivatko tulokset suurimmaksi osaksi lehmistä itsestään.

Kokeessamme *S. simulans* aiheutti jokaisella mitatulla määreellä voimakkaammat oireet kuin *S. epidermidis*. *S. simulansin* bakteerimäärät (6500 - 4 714 000 pmy/ml) olivat suuremmat kuin *S. epidermidiksellä* tartutettaessa (40 - 5200 pmy/ml) ja ruumiinlämmöt ensimmäisen vuorokauden aikana olivat keskiarvoltaan yli asteen korkeammat. Utareen palpaatioarkuus, turvotus ja ulkonäkö muuttuivat *S. simulans* -tartutuksessa selkeämmin verrattuna *S. epidermidis* -tartuntaan. Myös maitomäärä oli vähäisempi. CMT:llä arvioitaessa molempien KNS-lajien kohdalla maidon solumäärä nousi aina arvoon 5 asti, mutta fluorometrisellä menetelmällä *S. simulansin* aiheuttamat todelliset maidon solupitoisuudet olivat korkeammat kuin *S. epidermidiksellä*. Maidon NAGAasi-aktiivisuus, joka kertoo solujen aktivoitumisesta ja hajoamisesta, oli yli kaksinkertainen *S. simulansilla* tartutetuilla lehmillä verrattuna *S. epidermidiksen* vastaaviin. Simojoen ym. (2011) tähän kokeeseen pohjautuneessa julkaisussa, sytokiinien ja muiden maidossa

esiintyvien tulehdusindikaattorien esiintyvyyteen saatiin myös tilastollisesti merkittäviä eroja, ja voitiin todeta, että *S. simulans* aiheuttaa lehmälle voimakkaamman tulehdusvasteen kuin *S. epidermidis*.

Verrattuna Simojoki ym. (2008) tekemään pilottikokeeseen, jossa viisi eläintä tartutettiin *S. chromogeneksella*, tulehdusarvot olivat tällä kertaa suuremmat, lehmille nousi kuume ja muutokset utareessa olivat selkeitä. Toisaalta tartutusannos oli suurempi ja kyseessä oli eri KNS-laji, mikä osaltaan selittää eläinten erilaista tulehdusvastetta. Pilottikokeessa vain yhdelle lehmälle jäi pysyvä intramammaari-infektio, nyt tehdyssä kokeessa suurimmalle osalle jäi pysyvä tartunta. Tartuntojen pysyvyys ei sinänsä ollut yllätys, koska molemmat KNS-kannat oli eristetty persistoivista utaretulehduksista.

Koeympäristönä potilasnavetta ei ole paras mahdollinen, koska vastapäisessä parsirivistössä on jatkuvasti sairaita eläimiä, ja ihmisvirta navetassa on kirjava ja määrältään suuri. Toisaalta navetta on hyvin hoidettu ja eläimillä on aina puhtaat aluset. Mittalypsyn tuloksiin lypsäjällä on suuri vaikutus tyhjälypsyn kautta. Automaattisia irroittimia ei lypsykoneessa ollut, joten lypsäjän opituilla tavoilla ja kokemuksella oli vaikutusta maitomäärään. Kokeessa käytettiin mittalypsäjinä maksimissaan kahta eri Saaren hoitohenkilökuntaan kuuluvaa henkilöä.

Kokeessa oli pääasiassa kaksi näytteenottajaa, kirjoittaja sekä työn ohjaaja, joiden näytteenottokokemuksessa oli eroja. Kokemattomuuden tuomalla epävarmuudella voi olla merkitystä näytteenotossa, koska kokeen edetessä kokemus karttuu ja näytteenottotekniikka muuttuu ja yhdenmukaistuu. Etenkin kokeen alussa maidon tai muiden oireiden arviointi saattoi poiketa kokeen lopussa tehdyistä arvioista. Tämän vuoksi löydökset kuvattiin mahdollisimman tarkasti, ja tieteellistä artikkelia varten ohjaaja pisteytti itse tulokset, omaa työtäni varten tein oman pisteytyksen.

Eläinmääränä kahdeksan lehmää tuntuu vähäiseltä, mutta cross over -tutkimusmallin avulla aineisto saadaan kaksinkertaistettua ja tilastollisesti merkittäviin tuloksiin on mahdollista päästä. Mielestäni kokeen järjestelyt olivat onnistuneet, ja tuloksista saadaan tärkeää lisäinformaatiota, paitsi käyttämistämme KNS-lajeista ja niiden ominaisuuksista, myös tartutuskokeen järjestelyistä ja menetelmistä tulevia tutkimuksia varten.

Lisätietoa kaivataan edelleen ja uusia koagulaasinegatiivisia stafylokokkeja koskevia artikkeleita julkaistaankin jatkuvasti. Jos tulevissa tutkimuksissa saadaan yhä enemmän todisteita KNS-kantojen välisistä taudinaiheutuskyvyn eroista, epidemiologiasta sekä resistenssitilanteesta, uskon, että koagulaasinegatiivisia stafylokokkeja aletaan tyypittää lajitasolle asti. Tiedon myötä maidontuottajat ja hoitavat eläinlääkärit tulevat entistä paremmin ymmärtämään KNS:n merkityksen puhuttaessa karjakohtaisesta tuotoksesta, eläinten hyvinvoinnista ja maidon laadusta. Ymmärrys taas mahdollistaisi yhä tarkempien utareterveys suunnitelmien teon, jolloin tulehduksia saataisiin ehkäistyä ja hoidettua mahdollisimman tehokkaasti, eikä KNS:sta pääsisi syntymään kiusallista karjaongelmaa. Ennen näitä muutoksia toivon, että tämä vähäpätöisenä pidetty bakteeriryhmä onnistuttaisiin pitämään vähäpätöisenä.

IV LÄHTEET:

Aarestrup FM, Jensen NE. Prevalence and duration of intramammary infection in Danish heifers during the peripartum period. *J Dairy Sci.* 1997;80:307-312.

Aarestrup FM, Larsen HD, Jensen NE. Characterization of *Staphylococcus simulans* strains isolated from cases of bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 1999;66:165-170.

Almeida RA, Oliver SP. Interaction of coagulase-negative staphylococcus species with bovine mammary epithelial cells. *Microb Pathogenesis.* 2001;31:205-212.

Anaya-López JL, Contreras-Gusmán OE, Cárabez-Trejo A, Baizabal-Aguirre VM, López-Meza JE, Valdez-Alarcón JJ ym. Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. *Res Vet Sci.* 2006;81:358-361.

Andrews AH, Blowey RW, Boyd H, Eddy RG. *Bovine medicine: diseases and husbandry of cattle.* 2. painos. Blackwell Science Ltd, Blackwell Publishing company, 2004.

Bes M, Gúerin-Faubleé V, Meugnier H, Etienne J, Freney J. Improvement of the identification of staphylococci isolated from bovine mammary infections using molecular methods. *Vet Microbiol.* 2000;71:287-294.

Borm AA, Fox LK, Leslie KE, Hogan JS, Andrew SM, Hoyes KM, Oliver SP ym. Effects of prepartum intramammary antibiotic therapy on udder health, milk production and reproductive performance in dairy heifers. *J Dairy Sci.* 2006;89:2090-2098.

Bradley AJ, Leach KA, Breen JE, Green LE, Green MJ. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Vet Rec.* 2007;160:253-258.

Coelho MLV, dos Santos Nascimento J, Fagundes PC, Madureira DJ, de Oliveira SS, de Paiva Brito MAV ym. Activity of staphylococcal bacteriocins against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* involved in bovine mastitis. *Res Microbiol.* 2007;158:625-630.

De Vlieghe S, Laevens H, Devriese LA, Opsomer G, Leroy JLM, Barkema HW ym. Prepartum teat apex colonisation with *Staphylococcus chromogenes* in dairy heifers is associated with low somatic cell count in early lactation. *Vet Microbiol.* 2003;92:245-252.

De Vlieghe S, Opsomer G, Vanrolleghem A, Devriese LA, Sampimon OC, Sol J ym. In vitro growth inhibition of major mastitis pathogens by *Staphylococcus chromogenes* originating from teat apices of dairy heifers. *Vet Microbiol.* 2004;101(3):215-221.

Devriese LA, Baele M, Vanechoutte M, Martel A, Haesebrouck F. Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus chromogenes* isolates from intramammary infections of dairy cows. *Vet Microbiol.* 2002;87:175-182.

Devriese LA, de Keyser H. Prevalence of different species of coagulase-negative staphylococci on teats and in milk samples from dairy cows. *J Dairy Sci.* 1980;47:155-158.

- Djabri B, Bareille N, Beaudeau F, Seegers H. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. *Vet Res.* 2002;33:335-357.
- Donovan DM, Lardeo M, Foster-Frey J. Lysis of staphylococcal mastitis pathogens by bacteriophage phi11 endolysin. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;265:133-139.
- Eckersall PD, Young FJ, Nolan AM, Knight CH, McComb C, Waterston MM ym. Acute phase proteins in bovine milk in an experimental model of *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *J Dairy Sci.* 2006; 89:1488–1501.
- von Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis.* 2002;2:677–685.
- Evira 2006. Menetelmäohje 3480/1: Utaretulehdusta aiheuttavien bakteerien eristäminen ja tunnistaminen. Työohje MIBI 105.
- Evira 5.10.2010. Mikrobilääkesuosituksent märehtijöille. http://www.evira.fi/attachments/elaimet_ja_terveys/mikrobilaakesuosituksent_marehtijoille.pdf. Haettu 14.2.2011.
- FINRES-Vet 2001-2005: Eläimistä eristettyjen bakteerien mikrobilääkeresistenssi ja mikrobilääkkeiden käyttö eläimillä. Eviran julkaisuja 3/2007. Helsinki 2007.
- Forsman P, Tilsala-Timisjärvi A, Alatossava T. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiology.* 1997;143:3491-3500.
- Gentilini E, Denamiel G, Betancor A, Rebuelto M, Rodriguez Fermepin M, de Torres RA. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. *J Dairy Sci.* 2002;85:1913-1917.
- Gröhn YT, Wilson DJ, Gonzales RN, Hertl JA, Shulte H, Bennet G ym. Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2004;87:3358-3374.
- Grönlund U, Hallén Sandgren C, Persson Waller K. Haptoglobin and serum amyloid A in milk from dairy cows with chronic sub-clinical mastitis. *Vet Res.* 2005;36:191-198.
- Halasa T, Huijps K, Østerås O, Hogeveen H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Vet quart.* 2007;29(1):18-31.
- Haltia L, Honkanen-Buzalski T, Spiridonova I, Olkonen A, Myllys V. A study of bovine mastitis, milking procedures and management practices on 25 Estonian dairy herds. *Acta Vet Scand.* 2006;48:22.
- Heikkilä A-M, Nousiainen J, Pyörälä S. Kallis utaretulehdus. Suomen maataloustieteellisen seuran tiedote. 2010;26:4p. Maataloustieteen päivät, Helsinki 2010. Julkaistu 11.1.2010 <http://www.smts.fi/jul2010/esite2010/089.pdf>
- Hirsh DC, Zee YC. *Veterinary microbiology.* Blackwell publishing, 1999.

- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9. painos. Lippincott Williams & Wilkins, 1994.
- Hyvönen P, Käyhkö S, Taponen S, von Wright A, Pyörälä S. Effect of bovine lactoferrin on the internalization of coagulase-negative staphylococci into bovine mammary epithelial cells under *in-vitro* conditions. J Dairy Research. 2009;76:144-151.
- Irlinger F. Coagulase-negative staphylococci. Int J Food Microbiol. 2007;126(3):302-310.
- Jarp J. Classification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine clinical and subclinical mastitis. Vet Microbiol. 1991;27:151-158.
- Koivula M, Pitkälä A, Pyörälä S, Mäntysaari EA. Distribution of bacteria and seasonal and regional effects in a new database for mastitis pathogens in Finland. Acta agric scand. 2007;57:89-96.
- Kutila T, Pyörälä S, Saloniemi H, Kaartinen L. Antibacterial effect of bovine lactoferrin against udder pathogens. Acta vet scand. 2003;44:35-42.
- Lan R, Reeves PR. When does a clone deserve a name? A perspective on bacterial species based on population genetics. Trends Microbiol. 2001;9:419-424.
- Leitner G, Shoshani E, Krifucks O, Chaffer M, Saran A. Milk leucocyte population patterns in bovine udder infection of different aetiology. J Vet Med. 2000;B47:581-589.
- Mackay I, Rosen FR. Advances in immunology. New Eng J Med. 2000;343/1:37-49.
- Matthews KR, Harmon RJ, Langlois BE. Prevalence of Staphylococcus species during the periparturient period in primiparous and multiparous cows. J Dairy Sci. 1992;75:1835-1839.
- Matthews KR, Harmon RJ, Smith BA. Protective effect of *Staphylococcus chromogenes* infection against *Staphylococcus aureus* infection in the lactating bovine mammary gland. J Dairy Sci. 1990;73:3457-3462.
- Myllys V, Honkanen-Buzalski T, Virtanen H, Pyörälä S, Müller H-P. Effect of abrasion of teat orifice epithelium on development of bovine staphylococcal mastitis. J Dairy Sci. 1994;77:446-452.
- Nevala M, Taponen S, Pyörälä S. Naudan kliinisen utaretulehduksen bakteerietiologia – Saaren ambulatoirisen klinikan aineisto vuosina 2002 - 2003. Suom Eläinlääkäril. 2004;110:363-369.
- Østerås O, Sølverød L. Milk culture results in a large Norwegian survey – effects of season, parity, days in milk, resistance and clustering. J. Dairy Sci. 2006;89:1010-1023.
- Oliver SP, Lewis MJ, Gillespie BE, Dowlen HH, Jaenicke EC, Roberts RK. Prepartum antibiotic treatment of heifers: Milk production, milk quality and economic benefit. J Dairy Sci. 2003;86:1187-1193.

Park JY, Fox LK, Seo KS, McGuire MA, Park YH, Rurangirwa FR, Sicho WM, Bohach GA. Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. *Vet. Microbiol.* 2011;147:149-154.

Pitkälä A, Haveri M, Pyörälä S, Myllys V, Honkanen-Buzalski T. Bovine mastitis in Finland 2001 – prevalence, distribution of bacteria and antimicrobial resistance. *J Dairy Sci.* 2004;87:2433-2441.

Pitkälä A, Eskola M, Pyörälä S. Vedinkastoaineet. *Suom Eläinlääkäril.* 2005;111:355-359.

Pyörälä S, Pyörälä E. Accuracy of methods using somatic cell count and N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity in milk to assess the bacteriological cure of bovine clinical mastitis. *J Dairy Sci.* 1997;80:2820-2825.

Pyörälä S, Taponen S. Coagulase-negative staphylococci – Emerging mastitis pathogens. *Vet Microbiol.* 2009;134:3-8.

Pyörälä S, Taponen S, Simojoki H. Utaretulehduksen hoito lypsykaudella. *Suom Eläinlääkäril.* 2004;110:577-586.

Pyörälä S, Lehtolainen T, Dredge K. Umpeenpanohoito utaretulehdusten hoidossa ja ennaltaehkäisyssä. *Suom Eläinlääkäril.* 2004;110:587-592.

Pyörälä S, toim. Hirvonen`s thesis on acute phase response in dairy cattle [väitöskirja]. Helsingin yliopisto. Helsinki, 2000.

Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. *Veterinary microbiology and microbial disease.* Blackwell publishing, 2002.

Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses.* 9. painos. WB Saunders company ltd, 2000.

Rainard P, Riollet C. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet Res.* 2006;37:369-400.

Rajala-Shultz PJ. Suomen eläinlääkäripäivien luentokokonaisuus 31.10.-2.11.2007. Fennovet Oy. 2007:162-167.

Rajala-Shultz PJ, Smith KL, Hogan JS, Love BC. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. *Vet Microbiol.* 2004;102:33-42.

Ruegg PL. The quest for the perfect test: phenotypic versus genotypic identification of CNS. Final Program and abstract book. Heifer mastitis conference 24-26.6.2007 Ghent, Belgium.

Sampimon OC, Barkema HW, Berends IMGA, Sol J, Lam TJGM. Prevalence and herd-level risk factors for intramammary infection with coagulase-negative staphylococci in Dutch dairy herds. *Vet Microbiol.* 2009;134:37-44.

Sampimon OC, Lam TJGM, Mevius DJ, Schukken YH, Zadoks RN. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. Vet Microbiol. 2011, in press.

Sandholm M, Honkanen-Buzalski T, Kaartinen L, Pyörälä S, toim. The bovine udder and mastitis. Gummerus kirjapaino Oy. Jyväskylä, 1995.

Sairasalo H. Koagulaasinegatiivisten stafylokokkien virulenssitekijät – kirjallisuuskatsaus [syventävien opintojen tutkielma]. Helsingin yliopisto, eläinlääketieteellinen tiedekunta. Helsinki, 2007.

dos Santos Nascimento J, Fagundes PC, de Paiva Brito MAV, dos Santos K, de Freire Bastos M. Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis. Vet Microbiol. 2005;106:61-71.

Seuna E. Eläinlääketieteellinen bakteriologia II – yleisimmät eläinpatogeeniset bakteerit ja niiden diagnostiikka. Opintomonisteita 11. Eläinlääketieteellinen mikrobiologia ja epidemiologia. Helsinki, 1995. Tarkastettu 17.12.2002.

Shimizu A, Kloos WE, Berkhoff HA, George CG, Ballard DN. Pulse-field gel electrophoresis of *Staphylococcus hyicus* and *Staphylococcus chromogenes* genomic DNA and its taxonomic, epidemiologic and ecologic applications in veterinary medicine. J Vet Med Sci. 1997;59(6):443-450.

Simojoki H, Orro T, Taponen S, Pyörälä S. Host response in bovine mastitis experimentally induced with *Staphylococcus chromogenes*. Vet Microbiol 2009;134(1-2):95-9. Julkaistu sähköisenä 2008.

Simojoki H, Salomäki T, Taponen S, Iivanainen A, Pyörälä S. Innate immune response in experimentally induced bovine intramammary infection with *Staphylococcus simulans* and *S. epidermidis*. Vet Res. 2011, in press.

Simojoki H, Taponen S, Pyörälä S. Koagulaasinegatiivisten stafylokokkien aiheuttama utaretulehdus lehmällä. Suom Eläinlääkäril. 2005;111:303-306.

Taponen S, Jantunen A, Pyörälä E, Pyörälä S. Efficacy of targeted 5-day combined parenteral and intramammary treatment of clinical mastitis caused by penicillin-susceptible or penicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Acta Vet Scand. 2003;44:53-62.

Taponen S, Koort J, Björkroth J, Saloniemi H, Pyörälä S. Bovine intramammary infections caused by coagulase-negative staphylococci may persist throughout lactation according to amplified fragment length polymorphism -based analysis. J Dairy Sci. 2007;90:3301-3307.

Taponen S, Simojoki H, Haveri M, Larsen HD, Pyörälä S. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. Vet Microbiol. 2006;115:199-207.

Taponen S, Supré K, Piessens V, Van Coillie E, De Vliegher S, Koort JMK. *Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulase-variable species from bovine subclinical

and mild clinical mastitis. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2011, in press. doi:10.1099/ijs.0.028365-0

Tenhagen BA, Köster G, Wallmann J, Heuwieser W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci.* 2006;89:2542-2551.

Thorberg BM, Brandström B. Evaluation of two commercial systems and a new identification scheme based on solid substrates for identifying coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. *J vet med.* 2000;B47:683-691.

Thorberg BM, Kühn I, Aarestrup FM, Brändström B, Jonsson P, Danielsson-Tham M-L. Pheno- and genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk and human skin. *Vet Microbiol.* 2006;115:163-172.

Timms LL, Schultz LH. Dynamics and significance of coagulase-negative staphylococcal intramammary infections. *J Dairy Sci.* 1987;70:2648-2657.

Tortora G, Funke B, Case C. *Microbiology, an introduction.* 5. painos. The Benjamin/Cummings publishing company inc., 2004.

Waage S, Mørke T, Røros A, Aasland D, Hunshamar A, Ødegaard SA. Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. *J Dairy Sci.* 1999;82:712-719.

Watts JL, Naidu AS, Wadström T. Collagen binding, elastase production and slime production associated with coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. *J Clin Microbiol.* 1990;28(3):580-583.

Werckenthin C, Cardoso M, Martel J-L, Schwartz S. Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus* and canine *Staphylococcus intermedius*. *Vet Res.* 2001;32:341-362.

Wilson DJ, Gonzales RN, Case KL, Garrison LL, Gröhn YT. Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens. *J Dairy Sci.* 1999;82:1664-1670.

Winter P, Colditz IG. Immunological responses of the lactating ovine udder following experimental challenge with *Staphylococcus epidermidis*. *Vet Immunol Immunop.* 2002;89:57-65.

Winter P, Schilcher F, Fuchs K, Colditz IG. Dynamics of experimentally induced *Staphylococcus epidermidis* mastitis in East Friesian milk ewes. *J Dairy Res.* 2003;70:157-164.

Zadoks RN. Species identification of coagulase-negative staphylococci: genotyping is superior to phenotyping. *Vet Microbiol.* 2009;134:20-28.

Zhang S, Maddox CW. Cytotoxic activity of coagulase-negative staphylococci in bovine mastitis. *Infect Immun.* 2000;1102-1108.