



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİK-YL-2015-0008

**SUBKLİNİK MASTİTİSLİ SIĞIRLARDAN
STAPHYLOCOCCUS AUREUS, *STREPTOCOCCUS UBERIS*
VE *STREPTOCOCCUS DYSGALACTIAE* ETKENLERİNİN
İZOLASYONU VE ANTİBİYOTİKLERE
DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Ferhat GENÇ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Osman KAYA**

AYDIN-2015

T.C
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİK-YL-2015-0008

**SUBKLİNİK MASTİTİSLİ SIĞIRLARDAN
STAPHYLOCOCCUS AUREUS, *STREPTOCOCCUS UBERIS*
VE *STREPTOCOCCUS DYSGALACTIAE* ETKENLERİNİN
İZOLASYONU VE ANTİBİYOTİKLERE
DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Ferhat GENÇ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Osman KAYA**

AYDIN-2015

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Ferhat GENÇ tarafından hazırlanan “SUBKLİNİK MASTİTİSLİ SIĞIRLARDAN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, *STREPTOCOCCUS UBERIS* VE *STREPTOCOCCUS DYSGALACTIAE* ETKENLERİNİN İZOLASYONU VE ANTİBİYOTİKLERE DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ” başlıklı tez, 31/08/2015 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi :

İmzası:

1- Prof. Dr. Osman KAYA

ADÜ, Veteriner Fakültesi

2- Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ

ADÜ, Veteriner Fakültesi

3- Doç. Dr. Ertan Emek ONUK

OMÜ, Veteriner Fakültesi



Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN
Enstitü Müdürü

Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

09100- AYDIN

Santral : (256) 218 20 00

Direkt Telefon : 218 20 44

Fax : (256) 218 20 44

ÖNSÖZ

Mastitis süt veriminde ve kalitesinde azalma ile seyreden, veteriner hekim, laboratuvar ve ilaç giderleri gibi ekonomik giderleri olan bir enfeksiyondur. Ülkemizde mastitisle ilgili pek çok çalışma olmasına karşın hem çevresel hem de kontajiyöz streptokok etkenlerinin birlikte değerlendirildiği çalışmalar sınırlıdır. Süt üretimini sınırlayan önemli bir hastalık olan mastitis çeşitli mikroorganizmalar tarafından meydana gelmektedir. Hastalık süt üretimi açısından önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Ayrıca gıda hijyeni yönünden de halk sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle mastitise sebep olan mikroorganizmaların hızlı ve doğru olarak tayin edilmesi, hastalığın teşhis ve tedavi aşamalarında önem taşımaktadır.

Bu çalışmada Aydın ilindeki subklinik mastitisli süt sığırlarından toplanan süt örneklerindeki *Staphylococcus* ve *Streptococcus* türlerinin izole edilmesi ve tanımlanması amaçlanmıştır. Buna ek olarak, tanımlanan türlerin çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları araştırılmıştır. Çalışma sonuçlarının gelecekte ilimizde ortaya çıkabilecek mastitis olgularının teşhis ve tedavisinde fayda sağlayabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte ülkemizin farklı bölgelerine ait mastitis etkeni organizmaların özelliklerinin belirlenmesi amacı ile gelecekte yapılabilecek çalışmalar için bölgeye ait veri bankası sunması açısından çalışma sonuçları önemli bilgiler sunmaktadır.

Araştırmamız, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından VTF-15009 kodlu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGELER	v
1. GİRİŞ	1
1.1. Mastitis	1
1.2. Bulaşıcı ve Çevresel Mastitis	2
1.3. İnfeksiyonun Klinik ve Subklinik Formları	4
1.4. Mastitis İnfeksiyonlarında Tanı	4
1.5. <i>S. aureus</i> Kaynaklı Mastitis	5
1.5.1. <i>S. aureus</i> Kaynaklı Mastitislerinin Patogenezi ve Tanısı	5
1.5.2. <i>S. aureus</i> Kaynaklı Mastitislerin Tedavisi, Koruma ve Kontrol	6
1.6. Streptokokkal Mastitisler	7
1.6.1. Streptokokların Mastitis İnfeksiyonlarındaki Durumu	8
1.7. <i>S. dysgalactiae</i>	9
1.8. <i>S. uberis</i>	10
1.9. Streptokok Mastitislerinin Laboratuvar Tanısı	14
1.10. Koruma ve Kontrol	18
2. GEREÇ VE YÖNTEM	20
2.1. Gereç	20
2.1.1. Besiyerleri, Ayraçlar, Solusyonlar ve Antibiyotik Diskleri	20
2.1.2.1. Besiyerleri	20
2.1.2.1.1. Blood Agar (Merck 1. 10886)	20
2.1.2.1.2. Mannitol Salt Phenol Red Agar (MSA) (Merck 1.05404)	20
2.1.2.1.3. Mueller-Hinton Agar (MHA) (Oxoid CM 129)	21
2.1.2.1.4. Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (% 20 Gliserinli) (Oxoid CM 0225)	21
2.1.2.1.5. Trypton Soya Broth (TSB) (% 7,5 Tuzlu) (Oxoid CM 129)	21
2.1.2.1.7. DNase Test Agar (Merck 1.10449)	21
2.1.2.1.8. Todd-Hewitt Buyyonu	22
2.1.2.1.9. Safralı Esculinli Agar	22

2.1.2.1.10. Kaliforniya Mastitis Test Ayracı (Immucell®)	22
2.2. Yöntem	23
2.2.1. Süt Örneklerinden <i>S. aureus</i> ve <i>Streptococcus</i> Türlerinin İzolasyonu	23
2.2.2. <i>S. aureus</i> ve <i>Streptococcus</i> Türlerinin Tespiti İçin Gram Boyama	23
2.2.3. <i>S. aureus</i> ve <i>Streptococcus</i> Türlerinin Katalaz Testi ile Ayrımı	23
2.2.4. <i>S. aureus</i> Tespitinde Koagülaz Testi	24
2.2.5. B Grubu <i>Streptococcus</i> 'ların İdentifikasyonu için CAMP (Christie, Atkins, Munch-Peterson) Testi	24
2.2.6. D Grubu <i>Streptococcus</i> 'ları Diğer <i>Streptococcus</i> 'lardan Ayırmak için Safralı-Eskulinli Agar Testi	25
2.2.7. Disk Difüzyon Yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi	25
3. BULGULAR	26
3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	26
3.2. Antibiyogram Bulguları	27
4. TARTIŞMA	28
5. SONUÇ	32
ÖZET	33
SUMMARY	34
KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ	41
TEŞEKKÜR	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	Örneklerde bulunan toplam bakteri sayısı	26
Çizelge 3.2.	Elde edilen izolatların antibiyotik duyarlılık oranları	27

1. GİRİŞ

1.1. Mastitis

Mastitis, meme dokusundaki patolojik değişiklikler ve sütteki somatik hücre sayısının artışı ile karakterize, meme bezlerinde oluşan yangısal değişiklikler olarak tanımlanır (Khan 2003, Akan 2006). İnsan ve hayvan sağlığı, beslenmesi ve ulusal ekonomide çok önemli olan süt ve süt ürünleri, ancak sağlıklı hayvanlardan elde edilebilir (Arda ve ark 1997). Meme bezinin yangısal durumuna bağlı olarak oluşan patolojik değişikliklerin sonucunda sütte bir takım fiziksel ve kimyasal değişimler de meydana gelir. Meydana gelen bu değişimler süt ve süt ürünlerinin kullanılabilirliğini sınırlar ve bu nedenle mastitis, üzerinde dikkatle durulması gereken önemli bir problemdir.

İşletme düzeyinde etkin kontrol programlarının uygulanması ile mastitis nedenli kayıpların azaltılması mümkün olabilmektedir. Mastitis kontrol programlarının uygulanması ve bu programların devamlılığının sağlanması, özellikle kapasiteleri büyük olan süt işletmelerinde, ekonomik verimliliğin en önemli göstergesidir. Ancak ülkemizde özellikle süt yönlü yetiştiricilikte işletme kapasitelerinin küçük olması ve henüz verimlilik merkezli mastitis kontrol programlarının oluşturulamaması nedeniyle, süt üretiminde büyük ekonomik kayıplar ortaya çıkmaktadır (Atasever ve ark 2008). Sağlıklı süt, sağlıklı hayvanlardan elde edildiği için, hayvan sağlığını korumak ve mastitis olgularını erken teşhis etmek temel hedeftir. Süt endüstrisinde mastitis nedenli ekonomik kayıplar, süt kalitesinin ve süt veriminin azalması, buna bağlı olarak da ilaç ve veteriner hizmet kullanımının artması ve yem giderlerinin artışı sonucunda ortaya çıkmaktadır. Aynı zamanda, infeksiyonun tedavisi için kullanılan antibiyotiklerin sütte kalıntı bırakması, bilinçsiz olarak ilaç kullanımına bağlı gelişen antibiyotik dirençli bakteriler, tedavi olanaklarının sınırlanması gibi olumsuz etkiler. Düzenli ve bilinçli kontrol programlarının uygulanması, klinik mastitis olgularının azaltılmasını ve subklinik infeksiyonların da erken teşhis edilmesini sağlamaktadır (Blood 1989).

Süt sığıru yetiştiriciliğinin en önemli hastalığı olan mastitis, meme bezlerinin travmatik etkilere ve meme içerisine ekzojen veya endojen olarak giren mikroorganizmalara karşı bir tepkisidir. Mastitis, klinik seyirlerine göre klinik ve subklinik mastitisler olarak sınıflandırılmaktadır. Meme dokusunda ve sütte değişikliklerin

görüldüğü klinik mastitisler, memede şişme, ağrı, kızarıklık, sıcaklık ve duyarlılık gibi lokal belirtilerin yanında ateş, halsizlik, iştah ve kilo kaybı gibi sistemik hastalık belirtileri ile karakterizedir. Mastitisin, ikinci formu olan subklinik mastitisler meme dokusunu, süt verimini ve bileşimini etkilemesi nedeniyle daha fazla önem arz etmektedir. Subklinik mastitisler klinik semptom göstermeden seyrettiği için gözden kaçmakta ve kolaylıkla yayılabilmektedir (Baştan 2009). Süt veriminin azalması, sütün kalitesinin bozulması, tedavi süresince sütün atılması, tedavi ve veteriner hekim giderleri nedeniyle süt sığırcılığı işletmelerinde büyük ekonomik kayıplara neden olan mastitislerin % 70'ni subklinik mastitisler oluşturmaktadır (De Graves ve ark 1993). Mastitislerin ortaya çıkışında konağa, çevreye ve mikroorganizmalara ait determinantlar önemli rol oynamaktadır. Konağa ait determinantlar arasında ırk ve kalıtım, yaş ve laktasyon sayısı, laktasyon dönemi, memenin doğal savunma mekanizmaları ve immun sistemin gücü sayılabilir. Çevresel determinantlara ise hava koşulları, mevsim, beslenme, sağım ile ilgili faktörler ve barınak koşulları örnek verilebilir. Mastitis vakalarının büyük çoğunluğu mikroorganizmalar (bakteriler, viruslar ve mantarlar) tarafından oluşturulmaktadır (Arda 1997). Sığırlardaki mastitis vakalarından 135'ten fazla mikroorganizma izole edilmesine rağmen infeksiyonların çoğunluğu Stafilokoklar, Streptokoklar ve Gram negatif bakteriler tarafından oluşturulmaktadır (Tenhagen ve ark 2006). Bu etkenlerden bazıları kontagiyöz bazıları ise çevresel mastitis etkeni durumundadır.

1.2. Bulaşıcı ve Çevresel Mastitis

Mastitise neden olan etkenler arasında bakteriler önemli bir yere sahiptir (Phuektes ve ark 2001a). Memelerdeki anatomik bozukluklar ve travmalar da infeksiyonun yerleşimini ve oluşumunu hızlandırmaktadır (Blowey ve ark 1995b).

Anatomik bozukluklara bağlı mastitis olgularında; memelerin doğmasal olarak bozuk anatomik yapısı, hayvanın yaşı, ırkı gibi etkiler, süt veriminin fazla olması, laktasyonun dönemi (aktif involusyon, peripartum periyot, erken laktasyon vb.), beslenme durumları (Se ve Vit. E eksiklikleri), süt ineklerini infeksiyona duyarlı kılmaktadır (Blowey ve ark 1995b).

Çevresel faktörler arasında, uygun olmayan çevre koşulları, ahır ve barınakların sağlık yönünden uygun olmaması, yetersiz havalandırma koşulları, altlıkların sert ve kirli olması sayılabilir. Süt verimini arttırmak amacıyla protein yönünden zengin besleme

mastitise yakalanma olasılığını arttırmaktadır. Sağımıcıların temizlik ve dezenfeksiyona dikkat etmemeleri de hayvanlar arasında infeksiyonun yayılmasını hızlandırmaktadır. Mikrobiyel nedenlere bakıldığında; pek çok bakteri, mantar ve viral etken mastitisin oluşumuna neden olmaktadır. Mastitis etkenleri, meme ve meme kanalıyla ilişkileri yanında, özellikleri de dikkate alınarak bulaşıcı ve çevresel patojenler olarak ayrılmıştır. Mikrobiyel patojenler, sığır meme bezine yerleşerek çoğalır ve hayvandan hayvana sağım sırasında bulaşır. Çevresel patojen olan *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* ve *Escherichia coli* çevresel mastitis infeksiyonlarına neden olmaktadır. Bulaşıcı patojenler olarak *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma* türleri ve *Corynebacterium bovis* bulunmaktadır. Ayrıca tüberküloz etkenleri, *Proteus*, *Leptospira*, *Listeria* ve *Brucella* türleri de mastitise neden olmaktadır (Blood ve ark 1989).

Çevresel patojenlerin infeksiyon oluşturması hayvanlar arasında sağım esnasında ya da sağım aralarında çevre teması ile meydana gelir. Çoğunlukla kuru dönemde, laktasyonun erken evresinde ve hayvan sıklığının arttığı durumlarda, serbest hayvancılıktan ziyade ahır işletmelerinde, çevresel patojenlerin oluşturduğu infeksiyonlara daha sık rastlanır. Bakım ve beslemenin iyi yapıldığı durumlarda, koliform mastitisleri nadiren ortaya çıkar ve oranı %1-2'de kalırken, streptokokkal nedenli mastitis oranı %5'den daha az seyrederek, ancak sürüde mevcut herhangi bir problemde bu oran %10'u aşar. Çevresel streptokokların oluşturduğu mastitis infeksiyonlarının %49-50'sinin de klinik semptomlar kendini gösterir. Klinik mastitislerin sonucuna bağlı olarak da süt üretiminde, reproduktif aktivitede azalma ve işletme giderlerinin artışı ile ekonomik kayıp şekillenir (Oliver ve ark 1998).

Bulaşıcı mastitis infeksiyonları ise, bir meme bezinin infeksiyon kaynağı olması ve bu infekte meme bezine sahip hayvandan, sağlıklı başka bir hayvana etkenin taşınması ile gerçekleşir. Meme başı lezyonları, yetersiz bakım koşulları etkenlerin yerleşimini kolaylaştırır. Bulaşıcı mastitis olguları sıklıkla akut, kronik veya subklinik formlarda görülebilir. Mikroorganizmanın geçişi sağımıcıların elleri, sağım makineleri gibi sağım esnasında yayılma gösterir. Bu şekilde infekte hayvanlardan sağlıklı hayvanlara mikroorganizmaların geçişi gerçekleşir (Hadimli ve ark 2001).

1.3. İnfeksiyonun Klinik ve Subklinik Formları

İnfeksiyonun klinik formlarına bakıldığında; mikroorganizma meme bezini enfekte ettikten sonra buraya yerleşerek hızlı bir şekilde çoğalmaya başlar ve bunu konak-patojen ilişkisine bağlı olarak çeşitli klinik bulgular takip eder. Konak immun cevabının başarısız, antibiyotik tedavisinin yetersiz olduğu durumda etken meme bezine kolonize olur ve mastitis şekillenir. Sonuç olarak da yangının klinik bulguları olan şişkinlik, renk değişimi, ısı artışı ve ağrı gelişir. Klinik semptomlar perakut, akut, subakut ve kronik formlar halinde karakterize edilir. Klinik mastitis durumlarında sütteki değişimler (pıhtı, renk değişimi, kan görülmesi vb.) açığa çıkar. Ateş, anormal sekresyon, iştah kaybı, süt üretiminin azalması akut mastitis durumlarında görülen ilave klinik bulgulardır. Klinik mastitis bulgularının tersine subklinik infeksiyonlarda meme bezi ve sütteki değişimlere nadiren rastlanır ya da hiç rastlanmaz. Semptom göstermeyen hayvanlar sağlıklı kabul edilir, bu nedenle subklinik infekte hayvanların teşhisi zordur. Klinik belirti göstermeyen infekte hayvanlar diğer sağlıklı hayvanlar için bir rezervuar görevi görür ve sağlıklı hayvanlar arasında infeksiyonun yayılımına neden olurlar (Zadoks 2004).

Ekonomik yönden mastitis infeksiyonları, süt veriminin ve kalitesinin azalması, tedavi masraflarına ek olarak somatik hücre sayısının artışı ve sütün kullanılamaması, laboratuvar hizmet alımları, toksemiye bağlı şekillenen hayvan ölümleri ile üretim maliyetlerini arttırmakta ve yetiştiricilik yönünden önemli problemlere neden olmaktadır (Kalmus 2011).

Mastitis infeksiyonlarının gelişebilmesi için, mikroorganizmaların meme kanalına girmesi, infeksiyonun başlaması ve yangısal reaksiyonların oluşması gerekmektedir (Akan 2006).

1.4. Mastitis İnfeksiyonlarında Tanı

Mastitislerin tanısı klinik, kimyasal, fiziksel, hücresel ve bakteriyolojik muayeneler ile yapılmaktadır. Klinik olgularda meme ve sütteki nitelik ve niceliksel değişiklikler belirgin iken, subklinik mastitislerin tanısında meme ve sütte değişiklikler gözle izlenemediğinden sütteki değişiklikleri belirlemeye yönelik testlerden yararlanılmaktadır (Baştan 2002). Bu amaçla uygulaması en pratik olan ve sütteki somatik hücre sayısını belirlemeye yönelik olan California Mastitis Testi (CMT)'dir. Bunun dışında artan SHS'nı belirlemeye yönelik Whiteside ve Wisconsin mastitis testleri ile sütteki kan, kıvam ve pıhtı

varlığını incelemeye yönelik Strip Cup Testleri bulunmaktadır (Arda ve ark 1997). CMT ile saptanan pozitiflik incelenen hayvanın mastitisli olması yönünden bir ön fikir oluşturur. Ancak mastitise neden olan etkenin identifikasyonu amacıyla laboratuvar tanısı gereklidir. Bu amaçla kültür ve biyokimyasal testlerden yararlanılmaktadır (Riffon ve ark 2001). Kültürel yoklamalar sürü düzeyinde infeksiyonun izlenmesi, antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi ve kontrolü yönünden de önemlidir (Milner ve ark 1996).

1.5. *Staphylococcus aureus* Kaynaklı Mastitis

Stafilokoklar ilk defa 1884 yılında Rosenbach tarafından irinli yaralardan izole edilmiştir (Schleifer 1986). Önceki yıllarda Micrococcaceae familyası içinde yer alan Stafilokok cinsi, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'nin son baskısında Bacilli sınıfında Bacillales takımında yer almaktadır. Stafilokok cinsi içerisinde yer alan türler, patojenite kriteri olarak kabul edilen koagulaz enzimi sentezleme yeteneklerine göre koagulaz pozitif stafilokoklar (KPS) ve koagulaz negatif stafilokoklar (KNS) olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. KPS'lar *S. aureus*, *S. intermedius* ve *S. hyicus* türlerini içine almaktadır. Stafilokoklar, Gram pozitif, hareketsiz, sporsuz, katalaz pozitif, oksidaz negatif ve üzüm salkımı şeklinde kümeler tarzında 0.5-1.5 µm çapında koklardan oluşmaktadır. Laboratuvarlarda rutin amaçla kullanılan besiyerlerinde kolayca ürer ve 37°C'de 24-48 saat içinde 2-4 mm çapında düzgün koloniler oluştururlar. Stafilokoklar karotenoidlerden dolayı pigment meydana getirirler. *S. aureus* altın sarısı, *S. epidermidis* ise beyaz renkte koloni oluşturur. Ancak anaerobik koşullarda pigment oluşturma yeteneği ortadan kalkar. Laboratuvarında 10-42 °C'de üreyebilmelerine rağmen optimum üreme sıcaklığı 37 °C'dir. Sporsuz olmasına rağmen dış etkilere ve dezenfektanlara karşı oldukça dayanıklıdır. Kültürlerde +4 °C'de 2-3 ay, -20 °C'de 3-6 ay canlılıklarını koruyabilirler. Stafilokoklar 60 °C'lik ısıya 30 dk dayanabilirler. Fenolde (% 2) 15 dakikada inaktive olurken, % 9'luk NaCl ve sakkarozaya tolerans gösterebilmektedir (Akan 2006).

1.5.1. *Staphylococcus aureus* Kaynaklı Mastitislerinin Patogenezi ve Tanısı

Stafilokokların sahip olduğu toksinler, enzimler, yüzey proteinleri, kapsül ve slime gibi virulans faktörleri mastitislerin patogenezisinde önemli bir yere sahiptir. Bu faktörler konak savunma mekanizmalarından etkenin korunmasına, memede infeksiyon başlatmasına ve invazyonuna yardımcı olurlar. Akut inek mastitislerinde küçük meme kanallarının fibrin pıhtılarıyla hızlı bir şekilde tıkanması, irinli bir sekresyon, fibrin birikimi,

etkilenen dokuların ödematöz şişkinliği görülür. Yangının şiddeti birkaç gün içinde azalmaya başlar ve meme kanallarının etrafında meydana gelen doku üremesine bağlı olarak meme dokusunda atrofi meydana gelir. Kronik ve subklinik mastitiste, somatik hücre sayısında (SHS) artış ve bakterilerin etkilenen meme loblarına invazyonu söz konusudur. Bakterilerin üremesi genellikle sütün toplandığı kanallarda ve daha az olarak alveollerde meydana gelir. Yangısal tabloya bağlı olarak alveollerde atrofi ve süt kanallarında tıkanma şekillenir. Fagositik hücrelerin göçü sonucu yangının geliştiği bölgelerde apse odakları ve fibrozis gelişir. Fibrozis antibiyotiklerin penetrasyonunu sınırlandırdığı gibi fagositozu da önemli düzeyde engeller (Karahana 2005). Akut, kronik ve subklinik mastitis tablolarının dışında bakterilerin sentezlediği toksinler ve doku yıkımı sonucu ortaya çıkan ürünlere bağlı toksemi tablosu ve ölüm de görülebilir (Blood ve ark 1989).

Mastitisli sütlerden izole edilen stafilocokların koagulaz pozitifliğine bakılarak bakterinin *S. aureus* olarak isimlendirilmesi birçok mikrobiyoloji laboratuvarı tarafından yeterli olarak görülmektedir. Ancak *S. aureus* dışında koagulaz pozitif özellik gösteren stafilocok türlerinin de varlığı da göz önüne alındığında koagulaz testinin dışında *S. intermedius* ve *S. hyicus* gibi koagulaz pozitif türlerin *S. aureus*'tan ayrımı için DNase ve Clumping faktör testlerinin de yapılmasının gerekliliği vurgulanmıştır (Yavuz ve ark 2002). Stafilocokların laboratuvarlarda hızlı identifikasyonuna yönelik ticari StaphTrac, Minitex Gram-Positive Set ve Api-STAPH gibi kitler geliştirilmiştir (Goh ve ark 1992). Stafilocokların identifikasyonuna yönelik kısa sürede sonuç veren, sensitivite ve spesifitesi yüksek olan moleküler tekniklerden de yararlanılmaktadır. *S. aureus*'un 16S ve 23S rRNA bölgelerine spesifik primerlerin kullanıldığı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile kısa sürede çok sayıda numunenin identifikasyonu yapılabilmektedir (Riffon ve ark 2001).

1.5.2. *Staphylococcus aureus* Kaynaklı Mastitislerin Tedavisi, Koruma ve Kontrol

S. aureus mastitislerinin tedavisinde meme içi veya parenteral yolla farklı antibiyotik uygulamalarından yararlanılmaktadır. Akut mastitis olgularında hızlı tedaviye başlamak esas olduğundan, kültür sonuçları beklenmeden geniş spektrumlu bir antibiyotik ile yüksek dozlarda tedaviye başlanır. İlacın 24 saat aralıklarla üç kez tekrar uygulanması tedavi şansını artırır. Ancak, laktasyon dönemindeki mastitis olguları antibiyotik uygulaması ile tümüyle sağaltılamaması nedeniyle kuru döneme geçildikten sonra da

sağaltıma devam edilmesi tavsiye edilmektedir. Perakut mastitis olgularında öncelikle memenin tamamen boşaltılması esastır. Parenteral ve meme içi antibiyotik uygulaması ile infekte meme bölümü ve hayvan kurtarılabilir. Antibiyotik tedavisine paralel olarak toksemiye karşı antihistaminik ve elektrolit tedavisi de uygulanır. Mastitislerin kontrolünde en etkin yöntem uygun ve hijyenik sağım prosedürleri ve meme sağlığı kontrol programlarının uygulanmasıdır (Hutton ve ark 1990). İnfekte hayvanların izolasyonu da yeni mastitis vakalarının sayısını azaltmak için başvurulan bir diğer yöntemdir (Wilson ve ark 1995). Mastitislerin aşılama ile eradikasyonu ve kontrolü ulaşılması güç bir hedef olmakla birlikte, mastitis oranının azaltılması, şiddetinin hafifletilmesi ve kendiliğinden iyileşme süresinin kısaltılmasına yönelik yararlanılmaktadır (Yancey 1993).

1.6. Streptokokkal Mastitisler

Streptokok mastitisleri başlangıçta gizli ve yavaş seyretmektedir. Klinik olarak saptanabilecek anormallikler memede hemen görülmez. Genellikle laktasyon döneminde infeksiyon şekillenir ve zaman geçtikçe sütün memede toplanmasına bağlı olarak klinik bulgular da şekillenmeye başlar (Hulbert 2007).

Streptokok cinsi bakteriler insan, hayvan ve bitkiler gibi geniş bir konakçı dağılımına sahiptirler. Bu cins ilk olarak 1884 yılında Rosenbach tarafından tanımlanmış ve 1975 tarihinde Wilson ve Miles tarafından, 1978 yılında ise Jones tarafından bildiri yapılmıştır. Streptokokların sınıflandırılmasında en önemli değişimler 1906 yılında Andrewes-Horder, 1919 yılında Orla-Jensen, 1933 yılında Lancefield ve 1937 yılında ise Sherman tarafından ortaya konmuştur (Khan 2003). Streptokoklar 1918 yılında Rebecca Lancefield tarafından hemolitik özellikleri göz önüne alınarak *Streptococcus haemolyticus* olarak isimlendirilmiştir. Araştırmacı etkenlerin karbonhidrat antijenlerini spesifik serum kullanarak tiplendirmiş ve streptokoklar gruplara ayrılmıştır. Streptokoklar Gram pozitif, yuvarlak, zincir şeklinde diziler yapan, hareketsiz, sporsuz, kapsüllü, insan ve hayvanlarda lokal ve genel bir çok hastalığa neden olan ve onların mukoz membranlarında da normal olarak yaşayabilen bakterilerdir. Mikroskopik bakıda sıvı besiyerlerinde uzun zincirler halinde görülürken, katı besiyerlerinde diplokok şeklinde görülebilirler. Zenginleştirilmiş besiyerlerinde iyi üreme gösterirler (Akan 2006). Streptokoklar Bergey's Manual tarafından Laktobasiller sınıfı altında ayrı bir aile olarak incelenmiştir.

1.6.1. Streptokokların Mastitis İnfeksiyonlarındaki Durumu

Süt sığırcılığında çok yaygın olarak rastlanan ve ekonomik kayıpların şekillendiği mastitis infeksiyonlarında, başlıca *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* ve *S. uberis* etkenleri izole edilmektedir. Mastitis kontrol programları, süt sağımındaki gelişmeler, sağım sonrası hijyen uygulamaları, yaygın olarak kullanılan antibiyotik tedavileriyle *S. agalactiae* ve *S. dysgalactiae*'nın neden olduğu mastitis infeksiyonlarında azalma görülmüş ancak *S. uberis*'in neden olduğu infeksiyonlarda belirgin düzeyde bir azalmaya rastlanmamıştır (Schukken 2003).

Mastitise neden olan etkenlerin bulaşıcı ve çevresel olarak gruplandırılmasıyla ayırım yapılarak etkenlerin patogenezi bu grupta ile izlenmiştir. Bulaşıcı mastitis etkenlerinin meme bezinde yaşayarak çoğalması ve sağım esnasında hayvandan hayvana geçişi şekillenmiştir. Çevresel patojenlerin ise özellikle işletmelerin fazla ve işletme içi hayvan popülasyonunun yoğun olduğu yerlerde infeksiyon oluşturduğu görülmüştür. İnfeksiyona neden olan streptokokkal etkenlerin durumuna bakıldığında *S. agalactiae* dışındaki streptokoklar çevresel patojenler olarak gruplandırılmış, *S. agalactiae* ise bulaşıcı bir patojen olarak nitelendirilmiştir. Mastitisi oluşturan çevresel streptokoklar arasında *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. equinus* (*S. bovis*), *S. parauberis*, *S. equi* ve *S. canis* bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda, çevresel patojen etkenler arasında *S. uberis* ve *S. dysgalactiae* sık olarak izole edilmektedir (Oliver 1988, Todhunter ve ark 1995). Bu etkenlerin yaygın olmasına karşın patogenezlerinde, virulens faktörleri ile ilişkileri net olarak anlaşılamadığı ve etkenlerin heterojen özellikler göstermesi nedeniyle oluşturulmak istenen kontrol stratejileri de başarısız olmuştur (Oliver ve ark 1997).

Karahan (2005) ise, %24,3 oranında streptokok izolasyonu gerçekleştirmiş ve bu streptokoklar içerisinde %10,4 oranında *S. agalactiae* tanımlayan, % 13,9 oranında diğer streptokok türlerini tanımlayan etmiştir.

Şahin ve ark. (1997) ise mastitisli sütlerde streptokok izolasyon oranını % 29,82 olarak bulmuşlar ve bunların, % 14,03'nü *S. agalactiae*, %8,77'sini *S. dysgalactiae* ve %7,02'sini *S. uberis* olarak belirlemişlerdir.

Kanada'da yapılan bir çalışmada ise, 3033 adet süt örneğinde % 6,3 ile *S. uberis* en sık izole edilen streptokok türü iken, *S. dysgalactiae* % 4, *S. agalactiae* ise % 0,1 oranında izole edilmiştir (Riekerink ve ark 2008).

1984-1994 yılları arasında Amerika'da, Ulusal Mastitis Konseyi'nin yaptığı bir araştırma sonucunda çevresel streptokok türleri %3,9 oranında izole edilirken, *S. agalactiae* %4,3 oranında izole edilmiştir (Oliver ve ark 1997).

Tenhagen ve ark. (2006) ilk laktasyonunda olan ineklerde streptokok izolasyon oranını %12,6 olarak tanımlamışlar, bu oran içinde *S. agalactiae* %0,1, *S. dysgalactiae* %3,4, *S. uberis*'i ise %2,3 oranında tanımlamışlardır. Geri kalan %7'lik kısmın diğer streptokoklar tarafından oluşturulduğunu belirtmişlerdir. Daha yaşlı hayvanlarda izole edilen streptokoklar %31,8 bulunmuş olup bu oranın % 0,1'ni *S. agalactiae*, %13,6'sını *S. dysgalactiae* ve %8,5'ni ise *S. uberis* etkenleri oluşturmuş geri kalanı ise diğer streptokok türleri olarak bulunmuştur.

1.7. *Streptococcus dysgalactiae*

S. dysgalactiae, akut seyirli ve memelerin körleşmesine de neden olan mastitis etkenidir. Streptokokların genel özelliklerini taşımaktadır. *S. agalactiae*'ya çok benzer, ancak metilen mavisini koagule edip, sodyum hippurati hidrolize etmemesiyle ayrılır. *S. dysgalactiae* bulaşıcı özelliğe sahip üçüncü büyük patojen olarak kabul edilir. Çevresel bir etken olarak tanımlanmasına karşın yarı bulaşıcı yarı çevresel bir etken olarak bulunur (Oliver 1997). En sık olarak meme derisinde, özellikle sağım aletlerinin hijyenik olarak kullanılmadığı durumlarda sağım aletleri yüzeylerinde, meme yaralarında, kesiklerde ve çiçek yaralarından izole edilmiştir. Meme bezleri infeksiyonun taşınmasında daha az öneme sahiptir. Etken aynı zamanda tonsillerde bulunduğu için memelerin yalanması esnasında da geçiş mümkündür. Bu durum *S. dysgalactiae*'nin düve mastitislerinde ve kuru dönemdeki hayvanlarda görülme nedenini açıklamaktadır. Meme irritasyonuna neden olan uçan haşere, soğuk hava etkisi gibi durumlarda memelerin yalanması klinik belirtiler oluşuncaya kadar etkenin özellikle meme kanalına kolonize olmasına neden olur (Blowey ve ark 1995). Lancefield serogruplandırmasında C grubunda yer alan etken taksonomik çalışmalarda grup L içerisinde *S. equisimilis*, insan infeksiyonlarında ise G grubu içerisinde *S. dysgalactiae* olarak isimlendirilmiştir. Biyokimyasal testler ve hücre duvarı yapısının değerlendirilmesi temel alınarak, hayvan infeksiyonlarında serogrup C ve L ye ait olduğu bulunarak *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* olarak tiplendirilmiştir. İnsan infeksiyonlarında C ve G serogruplarına ait olan etken *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* olarak tanımlanmıştır. L grubu streptokokların, *S. equisimilis*'in ve G grubun da yer alan

insan infeksiyonlarından sorumlu streptokok türlerinin sığır meme bezlerine yerleşerek infeksiyon yaptığına nadiren rastlanmıştır. Sığırlarda infeksiyona neden olan *S. dysgalactiae* etkenleri non hemolitik ya da alfa hemolitik grup streptokoklar olup homojen yapı gösterir ve bu özellikleri ile L grubunda yer alan beta hemolitik suşlardan, insan G grup streptokoklardan ve *S. equisimilis*'den ayrılmıştır. *S. dysgalactiae*'nın sığırların tonsillerinde, ağız ve vagina mukozasında oldukça fazla miktarda bulunduğu ve kuru dönemde herhangi bir *S. dysgalactiae* infeksiyonu bulunmadığı halde laktasyon döneminde infeksiyonun görülmesinin, etkenin çevresel bulaşma yolunu daha çok kullandığını göstermiştir (Colque ve ark 1993, Oliver ve ark 1997).

Hassan ve ark. (2000) PCR yöntemi ile Lancefield serogruplandırmasında C, G ve L gruplarına ait *S. dysgalactiae* suşlarını 16S-23S rDNA ya göre tiplendirmiş ve serolojik olarak heterojenite gösteren farklı serogruplardaki *S. dysgalactiae* etkenlerini çapraz reaksiyon göstermeden PCR yöntemi ile tanımlamışlardır.

1.8. *Streptococcus uberis*

S. uberis'in mastitis infeksiyonu ile ilişkisi ilk olarak 1932 yılında Diernhofer tarafından ortaya konmuştur (Oliver ve ark 1997). Bu çalışmalara göre enterokok ailesine ait olduğu düşünülen *S. uberis*'in *Enterococcus* ailesine ait olmadığı, piyojenik streptokok ailesine benzerlikler gösterdiği görülmüştür. Roguinsky 1977 yılında *S. uberis*'in bazı fizyolojik özelliklerini aynı habitatta bulunan diğer 7 tür ile karşılaştırmış ve *S. uberis*'in iyi tanımlanmış ayrı bir tür olduğunu bulmuştur. Facklam 1977 yılında Streptokok ailesini *S. pyogenes*, *S. viridans*, *S. lactis* ve enterokoklar ailesi olarak 4 büyük gruba ayırmıştır. *S. uberis* bu çalışma da viridans grup içerisine girmiştir. Her iki çalışmada da biyokimyasal testler ve serolojik yöntemler kullanılmıştır. *S. uberis*'in oluşturduğu mastitislerde ise kronik hafif seyirli, sütte hafif değişikliklere neden olan bir infeksiyon şekli gözlenmektedir (Akan 2006). *S. uberis* çevresel bir patojen olarak klinik vakalardan yüksek oranda izole edilirken, subklinik mastitis vakalarında laktasyondaki hayvanlarda ve kuru dönem periyodunda predominant bir etken olarak izole edilir. *S. uberis* nedenli mastitislerde sürü içerisinde infeksiyon oranında artış görülür. *S. uberis*, streptokok nedenli düve mastitislerinde laktasyonun ilk 5 gününde görülen infeksiyonlarda sık olarak rastlanan bir etkidir. *S. uberis* nedenli mastitislerin diğer streptokok nedenli mastitislerden farkı, etkenin meme yüzeylelerinde ve ineğin diğer vücut bölgelerinde bulunabilme özelliğidir (Colque ve ark 1993). Bu yüzden *S. uberis* nedenli mastitis

olgularının büyük oranda nedeni, teat dipping ve kuru dönem antibiyotik tedavisinin yetersiz ve uygun olmayışı olarak bildirilmiştir (Khan 2002).

Kronik mastitise neden olan *S. uberis* etkenlerinin bulaşıcı etkenlerle de yakın ilişkide olabileceği tahmin edilmektedir. Etkenin sağım esnasında inekten ineğe geçişi de söz konusudur. Serbest yetiştiricilikte *S. uberis* suşlarının hayvanlar arasındaki geçişi, ineklerin memelerini yalaması ya da sinekler aracılığı ile söz konusu olmaktadır. Özellikle yaz aylarında, enfekte hayvanlarla sağlıklı hayvanların aynı yere yatma eğilimleri etkenin geçişini arttırmaktadır. *S. uberis* etkenleri süt işletmesi, ahır, altlık ve su yalakları, meralar ve dışkı ile kontamine olan her yerde sık olarak bulunur. Meme bezlerinin buralarla teması sonucu etken alınmış olur (Zadoks 2004, Khan 2003). Etkenin aynı zamanda ineklerde sindirim sistemine, genital sisteme ve meme bezine kolonize olabildiği görülmektedir (Oliver ve ark 1997, Khan ve ark 2003).

Etkenin bu şekilde pek çok ortama adapte olması biyolojik olarak incelenmiş ve pek çok pseudogen yapısına sahip olduğu, yapısında bakteriyofaj adaları ve genomik adalar bulundurduğu görülmüştür. Bu durum da *S. uberis* 'in farklı ekolojik ortamlara nasıl uyum sağladığını açıklamaktadır. Diğer streptokok türleri ile yapılan karşılaştırmalarda en fazla *S. agalactiae* ve *S. zooepidemicus* ile benzerlik gösterdiği bulunmuştur. *S. uberis* etkenlerinin buldukları işletmelere göre farklılık gösterdiğini belirlemişler, predominant olan etkenlerin daha fazla virulens özelliğe sahip olduğunu belirtmişlerdir (Zadoks ve ark 2003).

S. uberis mastitislerinde çoğunlukla infeksiyon aniden başlar ve memede şişme, sütte pıhtı oluşumu, genel durum bozukluğu ve ateş görülür. Meme bezinde bakterinin opsonizasyonu zayıf şekillenir ve buna bağlı olarak da fagositoz olayında lökositler tarafından yıkılma da zorlaşır. Antimikrobiyel tedavi oldukça önemlidir ve çoğu vakada seyir iyi görünürken bazı durumlarda infeksiyon tekrarlayabilir. Kuru dönemdeki hayvanlarda yaygın olarak infeksiyonu şekillendiren etkene karşı sağaltım kuru dönemin ilk 2 ve son 2 haftasında önemlidir ve özellikle son iki haftada uygulanan tedavi, başarıyı artırır (Blowey ve ark 1995a, Khan 2003).

Bazı *S. uberis* suşları lökositler tarafından gerçekleştirilen fagositoza diğer suşlara oranla daha fazla direnç gösterir (Oliver ve ark 1997). Bu durum, özellikle *S. uberis* etkenlerinin kazein varlığında gösterdikleri fagositoz direnci ile açıklanmaktadır. Yapılan

deneysel çalışmalarda, *S. uberis* etkenlerinin kazeinli ve kazeinsiz ortamlarda fagositoza gösterdiği dirence bakılmış, kazein bulunduğu durumlarda fagositoza karşı direncin daha fazla olduğu görülmüştür (Blowey ve ark 1995a).

Mastitise neden olan Streptokokların cins ve tür düzeyinde tiplendirilmesi, virulens özelliklerinin belirlenmesi, antibiyotik dirençliliklerinin ortaya çıkarılması, etkenlerin birbirlerine epidemiyolojik ve genetik anlamda yakınlıklarının tayini için pek çok çalışma yapılmış ve bu çalışmaların sonucunda da her geçen gün yeni veriler elde edilmiştir (Zadoks ve ark 2003).

Mastitis etkeni olan *S. uberis* ve *S. parauberis*'in serolojik ve biyokimyasal testlerle ayrımını yapmak neredeyse mümkün olmadığı için bu etkenlerin ayrımında da moleküler teşhis metotlarının kullanımı sağlanmış ve DNA hibridizasyon metotları, 16S rRNA sekans analizi gibi yöntemlerin geliştirilmesiyle 2 etken arasındaki ayırım yapılmıştır (Jayarao ve ark 1993).

Williams ve ark. (1991), *S. uberis*'in rRNA yapısını kodlayan DNA yapısının polimorfizmini temel alarak etkeni moleküler yöntemlerle incelemiş *S. uberis*'in ribozomal RNA yapısını kodlayan DNA'yı rastgele primerlerle çoğaltarak enzimlerle kesmiş ve *S. uberis* etkenlerinin tür içinde varyasyonlarını belirlemişlerdir. *S. uberis* tip 1 ve tip 2 olarak ayrılan etkenlerden *S. uberis* tip 2'nin *S. parauberis* olarak ayrılmasını sağlamışlardır. Taksonomik değerlendirmenin yanında epidemiyolojik değerlendirmede de bu gen profillerini kullanarak ayırım yapmışlardır. Ayrıca *S. uberis*'in 16S rRNA nükleotid sekansını genotip 1 ve genotip 2 olarak ayırarak, *S. uberis* genotip 2'yi *S. parauberis* olarak isimlendirmişdir. *S. uberis* ve *S. parauberis*'in 2 yakın tür olması yanında kültürel, morfolojik, biokimyasal ve serolojik olarak ayrımı yapılamadığı için etkenlerin birbirinden sadece DNA hibridizasyon yöntemleri ile ayrılacaklarını bildirmişlerdir (Williams ve ark 1991).

Khan (2002) ve Jayarao ve ark. (1991b) *S. uberis* ve *S. parauberis* etkenleri arasındaki moleküler farklılığı RFLP-PCR analizi ile ortaya koymuşlardır. Hassan ve ark. (2001) konvansiyonel olarak ayrımı yapılamayan *S. uberis* ve *S. parauberis* suşlarına 16S rRNA, 23S rRNA ve 16S-23S rRNA genlerine spesifik primerler ile yaptıkları PCR işlemi ile ayrımı sağlamışlardır.

Yapılan moleküler çalışmalarda *S. uberis*'in tek tip bir organizma olmadığı ve moleküler olarak farklılık gösterdiği görülmüştür. Jayarao ve ark. (1992) *S. uberis*'in klinik mastitis durumları dışında bir sürüdeki suşların klonal olarak benzerlik oranını % 20-100 gibi değişen oranda bulmuşlardır.

Jayarao ve ark. (1994) 42 adet *S. uberis* etkenini önce konvansiyonel metotlar ile tiplendirmeye çalışmışlar ve 27 adet *S. uberis* etkeninin spesifik biokimyasal özellikleri gösterdiğini saptarken 15 suşun farklı biyokimyasal karakterler gösterdiğini belirlemişlerdir. Restriksiyon kesimleri ile aynı hayvandan farklı laktasyon zamanlarında alınan sütlerde ise yakın ilişkili *S. uberis* suşlarını tamamen tanımlamışlardır. Ancak biokimyasal testlerin yakın ilişkili *S. uberis* etkenlerinin ayırımında yetersiz kaldığı belirtilmiş ve enzim kesimlerinin ise farklılaşmayı etkili bir şekilde sağladığı görülmüştür. Farklı hayvanlardan izole edilen birkaç benzer klon yapısını ise hayvanlar arasında geçiş sonucu şekillenen bakteri yapısına bağlamışlardır. Etkenlerin heterojen bir yapı göstermesine rağmen bazen tek bir çiftlikteki hayvanlarda eş bantların görülmesi de infeksiyonun seyri esnasında hayvandan hayvana bulaşmanın olabileceğini göstermiştir (Khan ve ark 2003, Zadoks ve ark 2003). Zadoks ve ark. (2004) farklı ortamlardan izole edilen *S. uberis* etkenlerine yapılan tiplendirme sonucunda etkenlerin aynı yapıda olduklarını görmüşlerdir. Jayarao ve ark. (1996) bir sürüde farklı hayvanlardan ve laktasyonun farklı zamanlarından toplanan meme sekresyonlarında benzer DNA izlerinin yaygın olduğunu da göstermişlerdir. *S. uberis*'in subklinik olgularında etkenler arasında heterojenite olduğu, klinik olgulardaki etkenlerde ise bu heterojenitenin daha az olduğunu belirlemişlerdir.

Douglas ve ark. (2000), aynı çiftlik orijinli *S. uberis* etkenlerinde genetik olarak birbirinden bağımsız ve benzerlik göstermeyen bantlarla karşılaşmış, çok az benzerlik bulmuştur.

McDonald ve ark. (2005), *S. uberis* etkenlerine OPA primerleri ile yaptıkları RAPD-PCR çalışmasında aynı ve farklı çiftliklerdeki farklı hayvanlardan sağlanan *S. uberis* etkenlerinde benzer profiller görmüşlerdir. Profiller incelendiğinde örneklerin orijinlerinin farklı olsa bile aynı RFLP-PCR profillerini oluşturduğu gözlenmiştir. Kullanılan OPA primerlerinden ikisi tüm *S. uberis* suşlarında aynı profilleri verirken, bir OPA primeri ise sadece bir *S. uberis* suşunda farklı bant profili oluşturmuştur. Araştırmacılar

bakterinin DNA yapısındaki küçük bir mutasyonun bu etkiyi yaratabileceği görüşüne varmışlardır.

Zadoks ve ark. (2003), persiste infeksiyonların çoğunlukla tek bir suş tarafından, tekrarlı infeksiyonların ise farklı suşlar tarafından oluşturulduğunu belirtmişlerdir. Bir hayvanda birden fazla meme lobunun enfekte olduğu durumlarda ise tüm infeksiyonun tek bir suş tarafından oluşturulduğu ve dominant suşlardan ileri gelen infeksiyonlarda kronik bir karakterin oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Yaptıkları RAPD-PCR tiplendirmesinde 111 *S. uberis*'den 12 tanesini, 41 izolattan ise 7 adetini tiplendirmişlerdir. Etkenlerin yakınlıklarına baktıklarında ise 17 adet farklı profil görüntülemişler ve 17 adet farklı profilden sadece 2 profili dominant olarak belirlemişlerdir.

S. uberis etkenlerinde varyasyonun bu derece yüksek olması, *S. uberis*'in çevrede oportünistik bir etken olarak bulunmasına bağlanmıştır. Bu heterojenik yapının oluşmasında aynı zamanda coğrafi bölgelere bağlı farklılıklarında etkili olduğu belirtilmiştir (Hawari ve ark 2008). Farklı profillerin olması etkenlerin farklı çevre orijinli olduğunu ve etkenlerin etkili bir şekilde kontrol edilebilmesi için de sürüler arası ve coğrafi alanlara bağlı farklılıkların göz önüne alınmasının gerekliliği üzerinde durulmuştur.

Zadoks ve ark. (2003) *S. uberis* etkenlerinin mastitis kontrol programları oluşturmada önemli bir bariyer olduğunu belirtmiş bunun nedenini de etkenlerin epidemiyolojisinin belirlenememiş olması ile açıklamışlardır. Araştırmacılar *S. uberis* infeksiyonlarının epidemiyolojilerinin anlaşılması için daha fazla çalışmaya gerek olduğunu, özellikle RAPD-PCR yönteminde kompleks bant profillerinin görülmesi nedeni ile bu yöntemi standart hale getirmenin zor olduğunu belirtmişlerdir (Zadoks ve ark 2003).

1.9. Streptokok Mastitislerinin Laboratuvar Tanısı

Streptokoklara bağlı mastitis infeksiyonlarının belirlenmesi için laboratuvar teşhis metotları uygulanmalıdır. Bunun için süt örnekleri, kanlı agara (%5-7 koyun kanlı) ekilir ve 37°C'de 24-48 saat inkübasyondan sonra üreme meydana gelen besiyerlerindeki kolonilere Gram boyama, katalaz ve oksidaz testi uygulanarak Gram pozitif kok, katalaz ve oksidaz testi negatif özellik gösteren etkenler *Streptococcus* spp. olarak tanımlanır.

Tür düzeyinde ayırım yapmak için, CAMP, eskulin, sodyum-hippurat ve karbonhidrat fermentasyon testleri uygulanır (Ilgaz ve ark 2000).

S. agalactiae etkenleri mikroskopik bakıda uzun zincirler halinde görülür. Lancefield gruplandırmasında B grubunda yer alan etkenler, CAMP testi pozitif, eskulin negatif, sodyum-hippurat testi pozitifdir. *S. dysgalactiae* etkenleri Lancefield gruplandırmasında C grubunda bulunurlar ve sodyum hippuratu hidrolize etmezler, bu özellikleri ile *S. agalactiae*'dan ayrılırlar. *S. uberis* eskulin ve sodyum-hippurat testi pozitifdir ve bazı suşları CAMP pozitif özellik gösterir. *S. uberis* etkenleri serolojik olarak heterojenite gösterir (Jankezovic ve ark 2009).

Streptokokların hemagglütinasyon oluşturma özellikleri Wibawan ve ark. (1993) tarafından araştırılmış, yapılan çalışmada B grubu streptokoklarda %43,4 oranında hemagglütinasyon özelliğine rastlanmıştır. Bu özelliğin daha yaygın olarak G grubu streptokoklarda görüldüğü göze çarparken daha az oranda C ve D grubu streptokok türlerinde belirlenmiştir. Ekin ve ark, (2006) B grubu streptokokların %11,6'sında hemagglütinasyon pozitifliği saptamışlardır. Kurl ve ark. (1989) 130 adet B grubu streptokok etkeninde sadece bir izolatta hemagglütinasyon özelliğini pozitif bulurken, C grubuna ait 35 izolattan 5'inde bu özelliği pozitif olarak tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, hemagglütinasyon özelliğinin bakterinin mukozal yüzeylere tutunmasında etkili olduğu ancak test sonuçlarının bakterilerin in vitro ortamda üretildiği koşullar ve besiyerinden etkilendiğini saptamışlardır.

Jiang ve ark. (1996) *S. agalactiae* ve *S. uberis* etkenlerinde bulunan CAMP yapısını karşılaştırdıkları çalışmada, her iki etkende bulunan CAMP faktör yapısının ve CAMP faktör yapısına karşı oluşan antikorların benzer olduğunu göstermişlerdir. *S. uberis* etkenlerinin CAMP testinde %19'unun pozitif olduğu ve eskulin testinde ise %11 oranında negatif olduğu belirlenmiştir. Hassan ve ark. (2002) CAMP özelliği negatif olan *S. agalactiae* suşlarını moleküler olarak incelemişler ve ilgili primer ile yaptıkları PCR sonucunda genotipik olarak CAMP pozitifliği saptamışlardır. Araştırmacılar bu farklılığı ekspresyon hatasına bağlamışlardır. *S. uberis*, *S. canis* ve *S. pyogenes* etkenlerinde fenotipik olarak belirlenen CAMP pozitifliği moleküler olarak da doğrulanmış ve bu gen bölgesinin *S. agalactiae* ile yakın ilişkili olduğu gösterilmiştir (Hassan ve ark 2000).

Kawata ve ark. (2004) Lancefield serogruplandırmasının daima türe spesifik sonuçlar vermediğini, bazı durumlarda atipik reaksiyonlarla karşılaşıldığını bildirmişlerdir. Fortin ve ark. (2003), izole ettikleri streptokoklara uyguladıkları Lancefield gruplandırmasında hatalı identifikasyon sonuçları almışlardır.

Devriese (1999), Lancefield serogruplandırmasını genellikle beta hemolitik özellik gösteren streptokok türleri için tanımlamış, hemoliz özelliği bulunmayan ya da alfa hemoliz gösteren streptokok türlerinin serogruplandırması için kullanımda grup spesifik antijenlerin bulunmaması gibi durumlarda kullanımının hatalı sonuçlar vereceğini belirtmiştir. Araştırmacı bu serotiplendirme yönteminde aynı grup spesifik antijenlerin farklı streptokok türleri üzerinde olabileceği gibi farklı antijenik yapılarında aynı streptokok türleri üzerinde bulunabileceğini belirtmiştir.

Kawata ve ark. (2004), streptokokların identifikasyonunda kullanılan Lancefield gruplandırmasının daima türe spesifik sonuçlar vermediğini bazı durumlarda atipik reaksiyonlarla karşılaşıldığını belirlemiş, PCR temeline dayalı teşhis metotlarının laboratuarlarda uygulanması ile her türün kısa zamanda daha az maliyetle daha doğru identifiye edilebileceğini bildirmişlerdir. Oliver ve ark. (1998), PCR temelli teşhis metotlarının kullanımı ile bir laktasyonda infeksiyon oluşturan etkenlerin gelecek laktasyondaki durumlarının veya oluşabilecek yeni infeksiyonların belirlenebileceğini bildirmişlerdir. Aynı zamanda PCR temelli yöntemler ile etkenlerin alttiplerinin, infeksiyon epidemiyolojisinin, aşı ve ilaç uygulamalarının belirlenebileceğini bildirmişlerdir.

Mastitis infeksiyonlarında moleküler metotların kullanımı ile araştırmalar bir veya birkaç etken yönünde olurken bazı çalışmalarda mastitise neden olan streptokokların yanı sıra *E. coli*, *S. aureus* gibi bakterilerde teşhis edilebilmektedir. Aynı zamanda süttten yapılan ekstraksiyon metotları da geliştirilerek PCR etkinliğinin artışı amaçlanmıştır (Riffon ve ark 2001).

Moleküler temelli teşhis metotlarının farklı uygulama şekilleri ile mastitis infeksiyonlarında streptokokların teşhisi daha hızlı ve uygulanabilir hale gelmiştir. Rastgele primerlerin kullanımı ile yapılan RAPD-PCR testi ile etken identifikasyonu ve etkenin epidemiyolojik durumu belirlenebilmiştir. Etkenlerin süttten direkt identifikasyonunda bu yöntem başarılı sonuçlar vermiştir (Gillespie ve ark 1997).

Duarte ve ark. (2005), B grubu streptokoklar için uyguladıkları RAPD-PCR prosedüründe mikroorganizmaların tiplendirilmesinde bu yöntemin kullanılabilceğini, ancak sonuçların yorumlanmasında ek tiplendirme metotlarının kullanılmasının güvenilirliği arttırdığını göstermişlerdir. Genel olarak farklı serotipler arasındaki ayrımı yüksek oranda bulmuşlardır. Araştırmacılar moleküler yöntemlerin kullanımının fenotipik metotlara oranla daha iyi sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. McDonald ve ark. (2005), Jayarao ve ark. (1992) farklı enzim kesimleri ile streptokokların tür düzeyinde ayrımını yapmışlardır. Tek reaksiyonda daha kısa sürede uygulanan RFLP-PCR metodunu konvansiyonel metotlara göre daha etkin bulmuşlardır. Phuektes ve ark. (2003) mastitis infeksiyonlarının teşhisinde multiplex PCR testini bir tarama testi olarak kullandıklarında *S. agalactiae*, *S. uberis* ve *S. dysgalactiae* etkenleri yanında *S. aureus*'u da bu test ile hızlı bir şekilde teşhis etmişlerdir. Aynı zamanda somatik hücre sayıları ile etken izolasyonu karşılaştırması yapmış ve somatik hücre sayısının yüksek olduğu durumlarda *S. agalactiae* etkenlerinin paralel olarak daha fazla izole edildiği daha sonra da *S. dysgalactiae* ve *S. uberis* etkenlerinin gözlemlendiğini bildirmişlerdir.

Martinez ve ark. (2001), *S. agalactiae* etkenlerinin teşhisi için 16S rRNA bölgesine yaptıkları PCR ve enzim kesimleri ile hedef bantların sekans analizlerini yaparak spesifik primerler geliştirmişlerdir. Bu spesifik primerler ile süttten direkt streptokok teşhisini yapmışlardır.

Bert ve ark. (1996), PFGE ile yaptıkları streptokok tiplendirmesinde farklı işletmelerden izole edilen etkenlere bakıldığında *S. agalactiae* izolatları arasında birbirine eş ve benzer bantlar bulurken, *S. dysgalactiae* suşlarının restriksiyon örneklerinin *S. agalactiae*'dan daha kompleks ve farklı olduğunu, en büyük farklılığa ise *S. uberis* etkenlerinin sahip olduğu ve etken izolatlarının restriksiyon kesimlerinin de büyük farklılık gösterdiğini görmüşlerdir. Ayrıca PFGE sonuçlarına göre *S. agalactiae* ve *S. dysgalactiae* etkenlerinin farklı işletmelerde sürü bazında benzer profillere sahip olduğu görülürken *S. uberis* etkenlerinin işletmeler arası ve işletme için de en fazla varyasyon gösteren etken olduğunu belirtmişlerdir.

Gillespie ve ark. (2003), farklı bölgelerden izole ettikleri 41 adet *S. uberis* suşuna yaptıkları genotiplendirme çalışmalarında kullandıkları OPE4 primeri ile 41 etkende 19 adet farklı profil yapısı gözlemlenmişler, 2 adet etkende ise benzer profil bulmuşlar ancak

bu örneklere yapılan PFGE tiplendirmesinde etkenlerin farklı olduklarını görüntülemişlerdir.

Taylor ve ark. (2003), streptokokların identifikasyonunda RNA yapılarını amplifiye ederek enzim kesimi uygulamışlar, böylece etkenlerin tür bazında identifikasyonunda RFLP-PCR yöntemini kullanmışlardır.

Wieliczko ve ark. (2002) *S. uberis* etkenlerine OPE4 primeri ile yaptıkları RAPD-PCR sonucunda etkenler arasındaki profil farklılıklarını belirlemişler ve bazı bantları görüntüleyememişlerdir. Bu durumu da kullanılan DNA miktarındaki ve termal cyler programındaki farklılığa dayandırmışlar ve aynı zamanda bulguların tekrar edilebilirliğinin düşük olduğunu bu nedenle RAPD-PCR yönteminde optimizasyon şartının olduğunu vurgulamışlardır.

Zadoks ve ark (2003), da yaptıkları RAPD-PCR testinde, farklı profiller belirlemişler ve bu yöntemde kompleks bant profillerinin görülmesinden kaynaklanan standardizasyon zorluğunu belirtmişlerdir.

Jayarao ve Oliver, (1994) yaptıkları RAPD-PCR değerlendirmesinde sonuçları klasik biyokimyasal sonuçlarla karşılaştırmışlar ve konvansiyonel yöntem ile ayrılamayan yakın genotipli etkenleri bu yöntem ile ayırabilmişlerdir. Araştırmacılar bu RAPD-PCR yönteminin kültürel ve biokimyasal testlere bağlı atipik reaksiyonlardan etkilenmediğini de ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar 1996 yılında yaptıkları çalışmada ise, 40 adet farklı primerden OPE4 ve OPA20 primerlerini seçerek bu primerleri streptokok türlerinin identifikasyonunda kullanmışlardır. RAPD-PCR sonucuna göre oluşan birden fazla bant profili içerisinde ortak bantlar bulunarak etkenlerin tür düzeyinde identifikasyonu yapılmıştır.

1.10. Koruma ve Kontrol

Mastitisli bir ineği tedavi etmek yerine o ineği mastitise karşı korumak çok daha ekonomiktir. Bu nedenle işletmelerdeki inekleri koruma altına alan bir program uygulanmalıdır. Bu programlar ile daha az mastitis olgusu, daha az süt kaybı, daha az iş gücü olmakta ve tedavi masrafları asgariye inmektedir (Baştan 2009). Streptokok infeksiyonlarının kontrol edilmesi içinde belirli kritik kontrol noktaları oluşturulmuştur.

Sağım sırasındaki hijyen kuralları, kuru dđnem tedavisi, sağım öncesi ve sonrası meme dezenfeksiyonu, kronik infekte hayvanların sürüden uzaklaştırılması, sağım makinelerinin optimum Őartlarda kullanımı bu kontrol noktalarını oluşturur (Blowey ve ark 1995a).

Streptokokkal infeksiyonların tedavisi için etkenlerin duyarlı olduğu penisilin grubu antibiyotikler kullanılabilir. Hem laktasyon dđneminde hem de kuru dđnemde bu Şekilde sağaltım ile %60- 90 oranında başarı sağlanır. Alınacak diğer koruyucu önlemler etkenin çevresel veya kontagiyöz yapısına bağlı olarak seçilir. Çevresel streptokok infeksiyonlarında evresel Őartlar iyileştirilmelidir (Pitkala 2004).

Bu alışmada Aydın ilindeki subklinik mastitisli süt sığırlarından toplanan süt rnelerindeki *Staphylococcus* ve *Streptococcus* türlerinin izole edilmesi ve tanımlanması amaçlanmıştır. Buna ek olarak, tanımlanan türlerin çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları araştırılmıştır. Çalışma sonuçlarının gelecekte ilimizde ortaya çıkabilecek mastitis olgularının teşhis ve tedavisinde fayda sağlayabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte ülkemizin farklı bđlgelerine ait mastitis etkeni organizmaların özelliklerinin belirlenmesi amacı ile gelecekte yapılabilir çalışmalar için bđlgeye ait veri bankası sunması açısından çalışma sonuçları önemli bilgiler sunmaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Bu çalışmada Aydın ili ve çevresindeki süt sığırcılığı işletmelerinde bulunan hayvanlardan Kaliforniya Mastitis Test ile subklinik mastitis problemi gösterdiği belirlenen hayvanlara ait sütler steril koşullarda alınan, toplam 100 adet süt örneği biyokimyasal yöntemlerle *S. aureus*, *S. uberis* ve *S. dysgalactiae* yönünden incelendi. Araştırmamız için ADÜ-HADYEK'den 12.08.2014 tarih ve VI. Oturum 64583101/2014/091 sayılı yazı ile etik kurul izni alınmıştır.

2.1.2. Besiyerleri, Ayıraçlar, Solusyonlar ve Antibiyotik Diskleri

2.1.2.1. Besiyerleri

2.1.2.1.1. Blood Agar (Merck 1. 10886)

Blood Agar 40 g

Distile su 1000 ml

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlanmış, onbeş dakika otoklav edildikten sonra, 50°C'ye kadar soğutulup, içine % 7 oranında steril insan kanı ilave edildi.

2.1.2.1.2. Mannitol Salt Phenol Red Agar (MSA) (Merck 1.05404)

MSA ayırt edici ve seçici bir besi yeridir. Stafilokokların saf olarak elde edilmesi ve laboratuvarında tanımlanabilmesi açısından önemli olan mannitol fermantasyonunun gözlenebilmesi için MSA kullanıldı.

Mannitol Salt Phenol Red Agar 108 g

Distile su 1000 ml

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlanıp, onbeş dakika otoklavda sterilize edildikten sonra, 50°C'ye kadar soğutulup petrilere döküldü.

2.1.2.1.3. Mueller-Hinton Agar (MHA) (Oxoid CM 129)

Mueller-Hinton Agar..... 38 g
Distile su..... 1000 ml

pH: 7,3±0,2

Besiyeri 38 g olacak şekilde distile su içinde kaynatılarak eritilip 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi. 45–50 °C'a soğutulup steril petri kutularına 12,5 ml döküldü.

2.1.2.1.4. Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (% 20 Gliserinli) (Oxoid CM 0225)

BHIB 8 g
Gliserin 20 ml
Distile su..... 80 ml

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlanıp, 0,5 ml miktarda ependorf tüplere dağıtıldıktan sonra 121°C'de onbeş dakika otoklavda sterilize edildi.

2.1.2.1.5. Trypton Soya Broth (TSB) (% 7,5 Tuzlu) (Oxoid CM 129)

TSB..... 8 g
NaCl..... 75 g
Distile su..... 1000 ml

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlandı. 5 ml miktarda tüplere dağıtıldı. 121°C'de onbeş dakika otoklavda sterilize edildi.

2.1.2.1.7. DNase Test Agar (Merck 1.10449)

Triptoz..... 20 g
NaCl..... 75 g
Deoksiribonükleik asit..... 2 g
Agar agar..... 15 g
Distile su..... 1000 ml

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlandı. 121°C'de onbeş dakika otoklavda sterilize edildi. 12,5'er ml miktarda steril petrilere döküldü.

2.1.2.1.8. Todd-Hewitt Buyyonu

Özellikle beta hemolitik streptokokların serolojik incelemeleri amacıyla kültürlerinin yapılmasında kullanılan bir besiyeridir.

Beyin-kalp infüzyonu 500ml

Kazein veya Et peptonu 20g

D-Glikoz 2g

NaCl 2g

Na₂HPO₄ 0.4g

Na₂CO₃ 2.5g

Yukarıdaki maddeler 700 ml kadar distile suda çözüldükten sonra besiyeri pH'sı 7.8'e ayarlanır. Besiyeri hacmi distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

2.1.2.1.9. Safralı Esculinli Agar

Sığır eti ekstresi 3g

Pepton 5g

Agar 15g

Sığır safrası 40g

Ferric citrate 0.5g

Distile su 900ml

Yukarıdaki maddeler ısı ile eritildikten sonra otoklav sterilizasyonu yapılır. Sterilizasyon sonrası 50 °C'ye soğutulan besi yerine aşağıdaki maddeler eklenir.

Esculin 1g

Saf su 100ml

2.1.2.1.10. Kaliforniya Mastitis Test Ayracı (Immucell®)

Alkil Benzen Sülfonat

pH indikatörü

Ayraçlar, süt ile karıştırılarak enfeksiyonun derecesine göre subklinik mastitis şüphesi taşıyan hayvanların sütleri toplandı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Süt Örneklerinden *S. aureus* ve *Streptococcus* Türlerinin İzolasyonu

Steril tüplere konulan her bir süt örneğinden bir öze dolusu %5 koyun kanı içeren kanlı agara ekilerek, 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kanlı agarda hemoliz, pigmentasyon özelliği gösteren, koloniler seçilerek saf koloni elde etmek için Tryptic Soy Agar (TSA) petrilere tekrar ekilerek, 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda tek koloni halinde ayrılan örneklerden birer koloni, 4 ml Tryptic Soy Broth (TSB) içine inoküle edilerek gece boyu 37 °C'de 24 saat çalkalanarak inkübe edilmiş, inkübasyon sonrası %15 oranında steril gliserol içerecek şekilde stoklanmışlardır. Kısa süreli çalışma stokları -20 °C'de uzun süreli, çalışma stokları ise -80 °C'de saklanmışlardır.

2.2.2. *S. aureus* ve *Streptococcus* Türlerinin Tespiti İçin Gram Boyama

Elde edilen örneklerin Gram (+) *Staphylococcus* ve *Streptococcus* cinslerine ait olup olmayacağını tespit etme amacıyla Gram boyama uygulanmıştır. Gram boyama için, örnekten temiz bir lam üzerine steril öze ile 2-3 öze dolusu su konulmuş ve 24 saatlik bakteri kültüründen de öze ile alınarak su ile karıştırılarak lam üzerine yayılmıştır. Lam havada kurutulduktan sonra alevden geçirilerek fikse edilmiş ve kristal viyole ile 1 dk boyanmıştır. Bu süre sonunda boya dökülmüş ve lam üzerine lügol çözeltisi damlatılarak 1 dakika beklenmiş ve bu süre sonunda lügol çözeltisi dökülerek kurutma kağıdı ile kurulanmıştır. Lam %96'lık etil alkole daldırılıp çıkarılarak 10-15 saniye süreyle alkol ile yıkanmış daha sonra ise saf su ile yıkanarak kurutma kağıdı ile kurulanmıştır. Son olarak lam üzerine safranin damlatılarak 30 saniye süreyle boyanmış ve örnek saf su ile yıkanarak kurulandıktan sonra mikroskopta incelenmiştir. Mikroskopta Gram (+) özellik gösteren yuvarlak biçimli bakteriler aranmıştır (Winn ve ark 2006).

2.2.3. *S. aureus* ve *Streptococcus* Türlerinin Katalaz Testi ile Ayrımı

Gram (+) bakteriler olan *S. aureus* ve *Streptococcus* türlerini ayırmada katalaz testi uygulanmıştır. Bu uygulamada besiyeri üzerinde üreyen kolonilerden steril öze ile alınıp temiz bir lam üzerine aktarıldıktan sonra üzerine 1-2 damla %3'lük H₂O₂ damlatılır. Katalaz enzimi oluşturan bakteriler H₂O₂'i su ve oksijene ayrıştırırlar. Ortamdaki oksijen çıkışı kabarcık oluşumu ile belirlendiğinden, test sonucu kabarcıklar meydana geldiğinde katalaz (+),

kabarcıklar oluşmadığında ise katalaz (-) olarak değerlendirilir. *Streptococcus*'lar katalaz (-), *S. aureus* ise (+)'dir (Winn ve ark 2006).

2.2.4. *S. aureus* Tespitinde Koagulaz Testi

Koagulaz testi, *S. aureus*'un diğer *Staphylococcus* 'lardan ayırt edilmesinde önem taşıyan bir deneydir. Çalışmada kullanılan bakterilerin koagulaz testleri tüpte gerçekleştirilmiştir. Ancak birkaç tane örnek için lam üzerinde gerçekleştirilen koagulaz testlerinden de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Steril bir deney tüpü içerisine 0.8 ml serum fizyolojik ve 0.2 ml EDTA'lı tavşan plazması (Bactident Coagulase, 1.13306.0001 Merck) eklenmiştir. Kanlı agarlı petri üzerinde 24 saat inkübasyon sonrası oluşan bir koloni, öze ile alınıp plazma içerisinde ezilerek emülsifiye edilir. 37 °C'deki su banyosuna bırakılarak 1, 2, 4, 8 ve 24. saatlerde pıhtının oluşması gözlemlenir. *S. aureus* gibi koagulaz enzimine sahip türlerin kan plazmasını koagüle etmesi sonucunda test tüpünde katılaşma meydana gelirse, test sonucu koagulaz (+), katılaşma meydana gelmiyorsa koagulaz (-) olarak değerlendirilir. Araştırmamız için koagulaz (+) olan suşlar değerlendirmeye alınmıştır (Winn ve ark 2006).

2.2.5. B Grubu *Streptococcus*'ların İdentifikasyonu için CAMP (Christie, Atkins, Munch-Peterson) Testi

Lancefield B grubu *Streptococcus*'ların (*S. agalactiae*) identifikasyonu için CAMP testi kullanılır. Koyun kanlı agar üzerine düz bir hat boyunca beta toksin üreten *S. aureus* türü ekilir. Bu ekim çizgilerine dik doğrultuda, *Staphylococcus* ekim çizgisine dokunduramamaya dikkat ederek, incelenecek mikroorganizmanın 2-3 cm uzunlukta çizgi ekimi yapılır. Her petriye 4-5 organizma ekilebilir. Petriyer 37 °C'de 18-24 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda, *Streptococcus* ve *Staphylococcus* 'ların üreme yapıları incelenir. Birbirlerine yakın oldukları yerde ok başı şeklinde hemoliz meydana gelirse CAMP testi pozitif kabul edilir. *S. aureus*'un beta lizini ile *S. agalactiae*'nın ekstrasellüler ürünü birlikte hareket ederek büyük bir beta hemoliz oluşturur. Koyun kanlı agara kontrol organizması olarak *S. aureus* ATCC 25923 ekilmiştir. *Streptococcus* olarak ise *S. agalactiae* veya *S. pyogenes* kullanılmıştır. *Staphylococcus* çizgilerine dik açı yapacak şekilde ekilen *S. agalactiae*'da inkübasyon sonrası ok başı şeklinde hemoliz görülür ve CAMP (+) olarak değerlendirilmiştir. Aynı şekilde ekilen *S. pyogenes*'da inkübasyon sonrası ok başı şeklinde hemoliz görülmediğinden CAMP (-) olarak değerlendirilmiştir (Winn ve ark 2006).

2.2.6. D Grubu *Streptococcus*'ları Diğer *Streptococcus*'lardan Ayırmak için Safralı-Eskulinli Agar Testi

Şüpheli koloniden iğne ile alınan örnekten besi yerinin yüzeyine çizgi ekimi yapılmıştır ve 35 °C'de inkübe edilmiştir. Her gün üreme olup olmadığına ve üreme olmuş ise siyahlanma oluşup oluşmadığına bakılmıştır. Genellikle 48 saatte bazen de 3 günde sonuç alınabilir. Üreme ve siyahlanma varsa pozitif, yoksa negatif olarak değerlendirilmiştir (Winn ve ark 2006).

2.2.7. Disk Difüzyon Yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

İdentifiye edilen *S. aureus* ve *Streptococcus* türlerinin antibakteriyel duyarlılık ve dirençlilik testleri disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır. Türler yatık besi yerlerinden kanlı agar besi yerine pasajlanıp, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen yeni kültürlerden Tryptic Soy Broth besiyerlerine 0.5 ml McFarland'a uygun süspansiyonlar hazırlanmıştır. Her bakteri türü için ayrı hazırlanan süspansiyonlardan 15 dakika içinde steril eküvyon ile inokulum tekniğe uygun olarak 25 ml'lik steril mueller hinton agar besiyerinin üzerine aşılanmıştır (NCCLS; National Committee for Clinical Laboratory Standards). *S. aureus* ATCC 25923 suşu disk difüzyonu yönteminde kontrol olarak kullanılmıştır.

Araştırmamız için Florfenikol, Neomisin, Sefuroksim, Enrofloksasin, Trimetoprim-Sulfometoksazol, Danofloksasin, Amoksisilin-Klavulanik asit, Penisilin, Oksitetrasiklin ve Ampisilin antibiyotik diskleri ticari olarak satın alınmıştır (Oxoid®). Saat yönünde verilen numaralarla hazırlanan protokole göre plakların yüzeyine, plak kenarından 15 mm birbirinden 25-30 mm aralıklarla olacak şekilde antibiyotik diskleri, dispenser yardımı ile yerleştirilmiştir. Petriler 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Disklerin etrafında oluşan inhibisyon zon çapları kumpasla ölçülerek duyarlılık ve dirençlilik oranları NCCLS'nin belirlediği değerlere göre saptanmıştır (NCCLS 2008).

3. BULGULAR

Bu çalışmada Aydın ili ve çevresindeki süt sığırcılığı işletmelerinde bulunan hayvanlardan Kaliforniya Mastitis Test ile subklinik mastitis problemi gösterdiği belirlenen hayvanlara ait sütler steril koşullarda alınan, toplam 100 adet süt örneği biyokimyasal yöntemlerle *S. aureus*, *S. uberis* ve *S. dysgalactiae* yönünden incelenmiştir. İzole edilen bakteriyel suşların biyokimyasal olarak identifikasyonu yapılmış ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmiştir.

Steril tüplere konulan her bir süt örneğinden bir öze dolusu %5 koyun kanı içeren kanlı agara ekilerek, 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kanlı agarda hemoliz özelliği gösteren koloniler seçilerek saf koloni elde etmek için Tryptic Soy Agar (TSA) petrilere tekrar ekilerek, 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda tek koloni halinde ayrılan örneklerden birer koloni, 4 ml Tryptic Soy Broth (TSB) içine inoküle edilerek gece boyu 37 °C'de 24 saat çalkalanarak inkübe edilmiş, inkübasyon sonrası %15 oranında steril gliserol içerecek şekilde stoklanmışlardır. Kısa süreli çalışma stokları -20 °C'de uzun süreli, çalışma stokları ise -80 °C'de saklanmıştır.

3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

İncelenen 100 süt örneğinin 28 (%28)'inden *S. aureus*, 21 (% 21)'inden *S. uberis*, ve 8 (% 8)'inden *S. dysgalactiae* izolasyonu gerçekleştirildi. Toplam 43 (% 43) örnekte ise bakteriyel üreme saptanmadı. Örneklerde bulunan toplam bakteri sayısı Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Örneklerde bulunan toplam bakteri sayısı

Türler	İzolasyon Sayısı	Yüzde
<i>S. aureus</i>	28	28
<i>S. uberis</i>	21	21
<i>S. dysgalactiae</i>	8	8

3.2. Antibiyogram Bulguları

Araştırmamızda tanımlanmış *S. aureus*, *S. uberis* ve *S. dysgalactiae* suşlarının disk difüzyon tekniği ile antibiyotik duyarlılıkları incelenmiştir. Antibiyotik duyarlılık testlerinde Florfenikol, Neomisin, Sefuroksim, Enrofloksasin, Trimetoprim-Sulfometoksazol, Danofloksasin, Amoksisilin-Klavulanik asit, Penisilin, Oksitetrasiklin ve Ampisilin antimikrobiyel ajanlarını ihtiva eden diskler kullanılmıştır. Test sonucunda bakteriyel izolatlarının Amoksisilin- Klavulanik asit'e duyarlılık oranı % 65, Ampisilin ve Sefuroksim'e duyarlılık oranı % 60, Trimetoprim-Sulfometoksazol'e duyarlılık oranı % 100, Florfenikol'e duyarlılık oranı % 100 olarak belirlenmiştir. İzole edilen bakteriyel suşlar Penisilin'e ve Neomisin'e 100 dirençli, Oksitetrasiklin'e % 85 dirençli, Enrofloksasin'e ve Danofloksasin'e ise % 70 oranında dirençli saptanmıştır. Antibiyotik duyarlılık oranları Çizelge 3.2.'de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. Elde edilen izolatların antibiyotik duyarlılık oranları

Antibiyotikler	<i>S. aureus</i>			<i>S. uberis</i>			<i>S. dysgalactiae</i>		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Penisilin	-	-	28	-	-	21	-	-	8
Neomisin	-	-	28	-	-	21	-	-	8
Enrofloksasin	-	9	19	-	6	15	-	2	6
Oksitetrasiklin	-	5	23	-	3	18	-	1	7
Danofloksasin	-	8	20	-	6	15	-	2	6
Amoksisilin-Klavulanik asit	18	10	-	14	7	-	5	3	-
Ampisilin	15	13	-	12	9	-	4	4	-
Sefuroksim	17	11	-	13	8	-	4	4	-
Trimetoprim-Sulfometoksazol	28	-	-	21	-	-	8	-	-
Florfenikol	28	-	-	21	-	-	8	-	-

4. TARTIŞMA

Bakteriyel nedenler başta olmak üzere çeşitli nedenlere bağlı olarak şekillenen meme dokusu yangısı mastitis olarak tanımlanır. Mastitis infeksiyonuna bağlı olarak süt veriminde azalma ve buna bağlı oluşan çeşitli sonuçlara bağlı olarak bu infeksiyon süt yönlü yetiştiricilik yapan bir işletme için oldukça önemli ekonomik kayıplar şekillendirir. Streptokoklar mastitise neden olan önemli bakteriyel patojenlerdir. Bu patojen etkenlerin kendi aralarında çevresel ve bulaşıcı olarak sınıflandırılmaları, mastitis probleminin çözümünde etkene spesifik yönetim prosedürü ve tedavi uygulamalarının başarısını artırır. Bu nedenle streptokokkal mastitislerin identifikasyon prosedüründe izlenecek işlemler oldukça önemlidir. Bu çalışmada, mastitisli sütlerden etken izolasyonu ve Streptokokların mastitis etiyojisindeki rolleri klasik kültür yöntemi ile belirlenerek, izole edilen izole edilen suşların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Mastitis, hazırlayıcı birçok etkenin yanısıra bakteriler, mantarlar, algler ve virüsler gibi birçok mikroorganizmalar tarafından oluşturulmaktadır fakat çoğunlukla bakteri kaynaklıdır (Akay ve ark 1993). Polimikrobiyal etiyojiye sahip olan mastitise yol açan 100'ün üzerinde mikroorganizma olduğu bilinmekte ve bunlar çevrede, ineğin kıllarında, derisinde ve meme kanallarında bulunmaktadır. Enfeksiyona yol açan mikroorganizmaların yaklaşık %95'ini *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* ve *Escherichia coli*, %5'ini ise diğer mikroorganizmalar oluşturmaktadır (Atasever ve ark 2008).

Bir çalışmada Yıldız (2003); subklinik mastitislerde 43 adet (%39.45) *S. aureus*, 25 adet (%22.94) *S. epidermidis*, 18 adet (%16.51) identifikasyonu yapılamayan *Staphylococcus* türleri, 6 adet (%5.50) *Corynebacterium pyogenes*, 5 adet (%4.59) *Str. agalactiae* ve 12 adet (%11.01) bakteri izole edilmeyen meme lobu belirlenirken, klinik mastitisli süt örneklerinde, 6 adet (%31.58) *S. aureus*, 5 adet (%26.32) *S. epidermidis*, 3 adet (%15.78) identifikasyonu yapılamayan *Staphylococcus* türleri, 2 adet (%10.53) *E. coli*, 1 adet (%5.26) *Str. agalactiae* ve 2 adet (%10.53) bakteri izole edilemeyen meme lobu belirlemiştir. Tedaviye yanıt ve iyileşme oranlarında stafilokok türlerinin diğerlerine göre daha düşük kaldığını gözlemlemiştir.

S. aureus en yaygın görülen kronik mastitis tiplerine neden olan bakteridir. Bazı sığırlar buzağılamadan sonra klinik mastitise yakalansa da enfeksiyon genelde subklinikdir ve sütte ya da memede fark edilebilir değişiklikler olmadan somatik hücre sayısında artışlara neden olur. Bakteri, enfekte olmuş sığırın meme bezlerine, süt kanallarına ve memelerdeki lezyonlarına yerleşir ve bulaşıcıdır. Enfeksiyon, kontamine olmuş *S. aureus* bakterisinin enfekte olmuş bir salgı meme bezinden süt sağım zamanı enfekte olmamış bir başka salgı meme bezine bulaşır ve bakteri süt kanalına penetre olur. Bir kere yerleşmiş olan *S. aureus* enfeksiyonu antibiyotik tedavisine cevap vermez ve enfekte sığırlar sürüden uzaklaştırılmak zorundadır (Paterson 2013).

En önemli *S. aureus* rezervlerinden biri meme yapıları olsa da sığırın meme dışı bölgelerinde de bakteriye rastlanmıştır. Bu nedenlerle geçmişten günümüze kadar mastitisin tedavisi, ortadan kaldırılması ve koruma-kontrolü ile ilgili bir çok araştırma yapılmıştır. Ancak, mastitisin etiyolojisinde çok sayıda faktörün rol oynamasından dolayı bu hastalığı yok etmek mümkün olmamıştır. Bu açıdan hastalıktan kaynaklı zararları en aza indirmek amaç edinilmiştir (Rişvanlı 2001).

S. aureus suşlarının epidemiyolojik olarak tanımlanması ile kaynağı belirlenmiş olan mastitis hastalığının tedavisi gerçekleştirilebilir ve kalitesi yüksek, insan sağlığına elverişli sütler elde edilebilir. Kullanılabilecek ideal tiplendirme yöntemlerinin; ayırım gücü yüksek, tekrarlanabilir, kolay uygulanabilir, sonuçları kolay yorumlanabilir, bilgisayara bağlı analiz ve veri tabanları ile uyumlu ve çok kompleks yapıda olmaması gibi özelliklere sahip olmaları gerekmektedir (Kıran 2011, Dijkshoorn ve ark 2000).

Türkiye’de mastitislerin yaygınlığını ve mastitislere neden olan mikroorganizmaların belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda farklı Stafilokok izolasyon oranları bulunmuştur. Türütoğlu ve arkadaşları (1995), Marmara bölgesinde % 28.1 *S. aureus* ve % 23.1 *S. epidermidis*, Kuyucuoğlu ve ark (2001) Afyon bölgesinde % 40.1 *S. aureus*, Ergün ve arkadaşları (2004), % 42.4 KNS ve % 25.1 *S. aureus*, Gürtürk ve arkadaşları (1998) Van ve yöresinde % 41 oranında Stafilokok türü izole etmişlerdir.

Yurtdışında yapılan çalışmalarda Tenhagen ve arkadaşları (2006) Almanya’da % 9.1 KNS ve % 5.7 *S. aureus*, Giannechini ve arkadaşları (2002) Uruguay’da % 62.8 *S. aureus* ve % 7.4 KNS, Pitkälä ve arkadaşları (2004) Finlandiya’da % 49.6 KNS ve % 10.2

S. aureus, Workineh ve arkadaşları (2002) Etopya'da % 40.5 *S. aureus* ve % 16.5 KNS izole etmişlerdir.

Ateş ve arkadaşlarının Konya bölgesinde yaptıkları çalışmada mastitisli sütlerden izole edile *S. aureus* türlerinin Penisilin'e % 28.1, Tetrasiklin'e % 50.2, Kanamisin'e % 37.2, Eritromisin'e % 68.1, Ampisilin'e % 37.8, Streptomisin'e % 32.4, Sefalosporinlere % 72.4 oranında duyarlı buldukları bildirilmiştir.

Çalışmamızda ise izole edilen *S. aureus* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları incelendiğinde bakteriyel izolatlarının Amoksisilin- Klavulanik asit'e duyarlılık oranı % 65, Ampisilin ve Sefuroksim'e duyarlılık oranı % 60, Trimetoprim-Sulfometoksazol'e duyarlılık oranı % 100, Florfenikol'e duyarlılık oranı % 100 olarak belirlenmiştir. İzole edilen bakteriyel suşlar Penisilin'e ve Neomisin'e 100 dirençli, Oksitetrasiklin'e % 85 dirençli, Enrofloksasin'e ve Danofloksasin'e ise % 70 oranında dirençli saptanmıştır.

Süt örneklerinden streptokokların izolasyon oranları farklılık göstermektedir. Tenhagen ve ark. (2006) inek sütlerinden izole ettikleri streptokokların %0,1'ni *S. agalactiae*, %3,4'nü *S. dysgalactiae*, %2,3'nü *S. uberis* olarak tanımlamışlardır. Beare ve ark. (2009) inek sütlerinde *S. dysgalactiae* oranını %15,6, *S. uberis* oranını % 11,1 bulmuşlar ancak *S. agalactiae* izole edememişlerdir. İngiltere'de yapılan bir çalışmada (Bohnsack ve ark 2004) sütlerdeki bakteriyolojik örnekleme sonucunda %23,5 oranında *S. uberis* etkeni izole edilirken *S. agalactiae* ve *S. dysgalactiae* etkenlerine rastlanılmamıştır.

Bentley ve ark. (1993) mastitisli sütlerden izole edilen 206 Gram pozitif kokun sadece üçünün *S. parauberis* olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, *S. parauberis* etkenlerinin *S. uberis*'den ayrımının zor olduğunu ve buna bağlı olarak epidemiyolojileri hakkında sınırlı bilgi bulunduğunu belirtmişlerdir. Pitkala ve ark. (2008) Finlandiya'da yaptıkları çalışmada 137 adet *S. uberis* izolatının ikisini *S. parauberis* olarak tanımlamışlar ve *S. parauberis* suşlarının antibiyotik dirençliliklerinin *S. uberis* ile benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir. Devriese ve ark. (1999) klinik ve subklinik mastitislerden izole edilen katalaz negatif ve eskulin pozitif Gram pozitif kokların, çoğunlukla *S. uberis* olarak tanımlanmış olduğunu ve yeterince doğru tanımlanmadığını bildirmişlerdir.

Türkiye’de yapılan çalışmalarda, Karahan (2005) incelediği mastitisli süt örneklerinden % 24,3 oranında *Streptococcus* spp. izole etmiş ve izole edilen etkenlerin %10,4’ü *S. agalactiae* ve %13,9’unu diğer streptokoklar olarak tanımlamıştır. Şahin ve ark. (1997) ise, sütlerden streptokok izolasyon oranını %29,82 olarak bulmuş, ve bunların %14,03 *S. agalactiae*, %8,77 *S. dysgalactiae* ve %7,02 *S. uberis* olarak tanımlamıştır.

Pitkala ve ark. (2008) Finlandiya’da yaptıkları çalışmada 137 adet *S. uberis* izolatının ikisini *S. parauberis* olarak tanımlamışlar ve *S. parauberis* suşlarının antibiyotik dirençliliklerinin *S. uberis* ile benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir. Devriese ve ark. (1999) klinik ve subklinik mastitislerden izole edilen katalaz negatif ve eskulin pozitif Gram pozitif kokların, çoğunlukla *S. uberis* olarak tanımlanmış olduğunu ve yeterince doğru tanımlanmadığını bildirmişlerdir.

Giannechini ve ark. (2002), Uruguay’ın bir bölgesinde yaptıkları çalışmada süt ineklerinden izole ettikleri türlerin antibiyotiklere duyarlılığını test etmişler, *S. agalactiae* ve *S. uberis*’e ait bütün izolatların penicillin ve ampicillin’e %100 oranında duyarlı, *S. agalactiae*’ların ise %96.6 oranında erythromycin’e duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir.

Arjantin’de ise 3 adet *S. uberis*, 36 adet *S. agalactiae* ve 8 adet *S. dysgalactiae* spp. olmak üzere toplam 47 adet *Streptococcus* suşunun penicillin G, erythromycin ve clindamycin direnci disk difüzyonu ve MIC ile belirlendiğinde, penicillin G’ye karşı bütün izolatların duyarlı olduğu buna ilaveten erythromycin ve clindamycin direncinin sırasıyla %27.6 ve %25.5 oranında olduğu bulunmuştur (Denamiel ve ark 2005).

Çalışmamızda ise izole edilen *S. uberis* ve *S. dysgalactiae* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları incelendiğinde bakteriyel izolatlarının Amoksisilin- Klavulanik asit’e duyarlılık oranı % 65, Ampisilin ve Sefuroksim’e duyarlılık oranı % 60, Trimetoprim-Sulfometoksazol’e duyarlılık oranı % 100, Florfenikol’e duyarlılık oranı % 100 olarak belirlenmiştir. İzole edilen bakteriyel suşlar Penisilin’e ve Neomisin’e 100 dirençli, Oksitetrasiklin’e % 85 dirençli, Enrofloksasin’e ve Danofloksasin’e ise % 70 oranında dirençli saptanmıştır.

5. SONUÇ

Mastitis mikroorganizmaların sebep olduğu önemli bir meme bezi hastalığıdır. Mastitise bağlı olarak her yıl büyük ekonomik kayıplar meydana gelmektedir. Hastalık tarafından ortaya çıkan ekonomik kayıplar sadece süt veriminde azalma ile sınırlı olmayıp, hastalığın tedavisi, sürüden hastalıklı hayvanların çıkarılması gibi harcamaları da kapsamaktadır. Ayrıca önemli bir gıda kaynağı olan sütün kalitesindeki bozulma halk sağlığı açısından da olumsuz sonuçlara sebep olmaktadır.

Araştırmamızda, toplam 100 adet hayvana ait subklinik mastitisli süt örneklerinden *S. aureus*, *S. uberis* ve *S. dysgalactiae* türlerinin izolasyonu ve identifikasyonu yapılmıştır. Süt örneklerinin % 43'ünde bakteriyel üreme görülmemiştir. Çalışma sonucunda *S. aureus* türlerinin izolasyon yüzdesi % 28 ve *S. uberis* ve *S. dysgalactiae* türlerinin izolasyon yüzdesi ise sırasıyla % 21 ve % 8 oranında gerçekleşmiştir.

Çalışmamızda identifikasyon için kullandığımız standart biyokimyasal prosedürler sonuçları ülkemizde mastitis çalışmalarında izole edilen etkenler ile karşılaştırıldığında benzer sonuçlar verdiği görülmüştür. Dolayısıyla klasik biyokimyasal yöntemlerin güvenilirliği doğrulanmış ve uygulanabilir olduğu ortaya koyulmuştur.

Araştırmamız sayesinde süt üretimi için oldukça önem taşıyan subklinik tipteki mastitis olgularındaki patojenlerin izolasyonu ve identifikasyonu, hastalığın ülkemiz geneli ve Aydın ili çevresi için gelecek çalışmalara ışık tutulacaktır. Geçmişte ülkemizde yapılmış ve gelecekte yapılacak çalışmalar ülkemiz için hastalığın teşhis ve tedavi politikalarının belirlenmesinde etkili olabilecektir. Antibiyotik tedavisinin uygulanacağı durumlarda hem *S. aureus* ve hem de *Streptococcus* türlerinin var olduğu sürülerde çalışmamızda da saptanan farklı antibiyotik duyarlılıklarının olabileceği göz önüne alınmalıdır.

ÖZET

Subklinik Mastitisli Sığırlardan *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* ve *Streptococcus dysgalactiae* Etkenlerinin İzolasyonu ve Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Bu çalışmada, subklinik mastitisli sütlerden *S. aureus*, *S. uberis* ve *S. dysgalactiae* türlerinin izolasyonu mastitis etiolojisindeki rollerini klasik kültür yöntemi ile belirlemek, ayrıca izole edilen suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Aydın ili ve çevresindeki süt sığırcılığı işletmelerinde bulunan hayvanlardan Kaliforniya Mastitis Test ile subklinik mastitis problemi gösterdiği belirlenen hayvanlara ait sütler steril koşullarda alınan, toplam 100 adet süt örneği biyokimyasal yöntemlerle *S. aureus*, *S. uberis* ve *S. dysgalactiae* yönünden incelenmiştir.

Çalışmamızın sonucunda *S. aureus* türlerinin izolasyon yüzdesi % 28 ve *S. uberis* ve *S. dysgalactiae* türlerinin izolasyon yüzdesi ise sırasıyla % 21 ve % 8 oranında gerçekleşmiştir. Süt örneklerinin % 43'ünde bakteriyel üreme görülmemiştir.

Çalışmamızda izole edilen suşların antibiyotik duyarlılıkları incelendiğinde bakteriyel izolatlarının Amoksisilin- Klavulanik asit'e duyarlılık oranı % 65, Ampisilin ve Sefuroksim'e duyarlılık oranı % 60, Trimetoprim-Sulfometoksazol'e duyarlılık oranı % 100, Florfenikol'e duyarlılık oranı % 100 olarak belirlenmiştir. İzole edilen bakteriyel suşlar Penisilin'e ve Neomisin'e 100 dirençli, Oksitetrasiklin'e % 85 dirençli, Enrofloksasin'e ve Danofloksasin'e ise % 70 oranında dirençli saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: Mastitis, *S. aureus*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae*

SUMMARY

Isolation and Determination of Antibiotic Susceptibilities of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* Agents From Cattle with Subclinical Mastitis

In this study, isolation of *S. aureus*, *S. uberis* and *S. dysgalactiae* from subclinically mastitic milk samples by classical culture methods and determination of their roles in epidemiology of mastitis was aimed. A total of 100 milk samples which were taken from animals that were determined to have subclinical mastitis problem by California Mastitis Test, found in dairy cattle farms of Aydın province region were detected in the point of *S. aureus*, *S. uberis* and *S. dysgalactiae* by biochemical methods.

As a result, the isolation percentage of *S. aureus* was found as 28 %, the isolation percentage of *S. uberis* and *S. dysgalactiae* were found to be as 21 % and 8 % respectively. There was not detected any bacterial growth from the milk samples in the ratio of 43 %.

The antibiotic susceptibilities of the isolates are 65 % to Amoxicillin-Clavulanic acid, 60 % to Ampicillin and Cefuroxim, and 100 % to Trimethoprim-Sulphamethoxazole and Florfenicol. The isolated bacterial strains were resistant to Penicillin and Neomycin in the ratio of 100 %, resistant to Oxytetracycline in the ratio of 85 %, resistant to Enrofloxacin and Danofloxacin in the ratio of 70 %.

Key Words: Mastitis, *S. aureus*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae*

KAYNAKLAR

- Akay Ö, İzgür, M, Esendal Ö, Çetin C. İnek sütlerinden izole edilen streptokok suşlarının sero-gruplandırılması. Doğa-Tr. J.Vet.Anim.Sci. 1993; 17: 89-95.
- Akan M. *Staphylococcus* infeksiyonları. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). Ed. Nejat Aydın, Jale Paracıkoğlu. İlke Emek Yayınları, Ankara 2006.
- Arda H, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N, Kahraman M, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür M, Diker KS. Özel Mikrobiyoloji 4.Baskı, Ankara: Medisan Yayın Serisi No:26 s. 31-44, Ankara 1997.
- Atasever S, Erdem H. Süt sığırlarında mastitis ile sütün elektriksel iletkenliği arasındaki ilişkiler, OMÜ Zir. Fak. Dergisi 2008; 23(2): 131-136.
- Ateş M, Erganis O, Çorlu M, Serpek B. Konya yöresindeki mastitisli ineklerden elde edilen süt örneklerinin mikrobiyel florası ve LDH aktivitesi. Turk J Vet Anim Sci 1991; 16: 19-29.
- Baştan A. Mastitisten Korunmada Temel İlkeler. In: İneklerde Meme Hastalıkları. Hatipoğlu Basım ve Yayım Tic.Ltd.şti. 2009; s:84-105.
- Beare PA, Unsworth N, Andoh M, Voth DE, Omsland A, Gilk SD, Williams KP, Sobral BW, Kupko JJ, Porcella SF, Samuel JE, Heinzen RA. Comparative genomics reveal extensive transposon-mediated genomic plasticity and diversity among potential effector proteins within the genus *Coxiella*. *Infect. Immun.* 2009 77: 642-656
- Bentley RW, Leigh JA, Collins M. Development and use of species-specific oligonucleotide probes for differentiation of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis*. *J. Clin.Microbiol* 1993; 31: 57-60.
- Bert F, Picard B, Branger C, Lambert-Zechovsky N. Analysis of genetic relationships among strains of groups A, C and G streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis. *J. Med. Microbiol.* 1996; 45: 278-284.
- Blood DC, Radostis OM. Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs and horses. Bailliere Tindall, London, 1989.
- Blowey R, Edmondson P. Mastitis-Causes, Epidemiology and Control. In: Mastitis Control in Dairy Herds. Publish.Farming Press. Books. 1995a NY. USA. p.:27-35.
- Blowey R, Edmondson P. Diseases of the Udder and Teat. In: *Mastitis Control in Dairy Herds*. Publish.Farming Press. Books. NY. USA. 1995b p:176-181.
- Bohnsack JF, Whiting AA, Martinez G, Jones N, Adderson EE, Detrick S, Bonkowsky AN, Bisharat N, Gottschalk M. Serotype III *Streptococcus agalactiae* from bovine milk and human neonatal infections. *Emer.Infect.Dis.* 2004; 10:1412-1418.
- Colque JI, Devriese LA, Haesebrouck F. Streptococci and enterococci associated with tonsils of cattle. *Lett.Appl.Microbiol.* 1993; 16: 72-74.

- De Graves FJ, Fetrow J. Economics of Mastitis Control. *Vet. Clin. North Am: Food Animal Practice* 1993; 9, 421-434.
- Denamiel G, Llorente P, Carabella M, Rebuelto M, Gentilini E. Anti microbial Susceptibility of *Streptococcus* spp. Isolated from Bovine Mastitis in Argentina. *J. Vet. Med.* 2005; 52, 125–128.
- Devriese LA, Hommez J, Laevens H Pot B, Vandamme P, Haesebrouck F. Identification of aesculin-hydrolyzing streptococci, lactococci, aerococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. *Vet. Microbiol.* 1999; 70: 87-94.
- Dijkshoorn L, Ursing BM, Ursing JB. Strain, clone and species: comments on three basic concepts of bacteriology, *J. Med. Microbiol.* 200; 49: 397-401.
- Douglas VL, Fenwick SG, Pfeiffer DU, Williamson NB, Holmes CW. Genomic typing of *S. uberis* isolates from cases of mastitis ,in New Zealand dairy cows using pulsed field gel electrophoresis. *Vet.Microbiol.* 2000; 75: 27-41.
- Duarte RS, Bellei BC, Miranda OP, Brito MAVP, Teixeira LM. Distribution of antimicrobial resistance and virulence-related genes among brazilian group B streptococci recovered from bovine and human sources. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 97–103.
- Ekin İH, Gürtürk K. Characterization of bovine and human group B streptococci Isolated in Turkey. *J. Medical Microbiol.* 2006; 55: 517–521.
- Ergün Y, Aslantaş Ö, Cantekin Z, Doğruer G. Hatay ilindeki aile tipi süt sığırcılığı işletmelerinde subklinik mastitislerin epidemiyolojisi. *Vet Bil Derg* 2004; 20, 25-28.
- Fortin M, Messier S, Paré J, Higgins R. Identification of catalase- negative, non-beta-hemolytic, gram-positive cocci isolated from milk samples. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41: 106-109.
- Giannechini R, Concha C, Rivero R, Delucci I, Moreno López J. Occurrence of clinical and subclinical mastitis in dairy herds in the West Littoral Region in Uruguay. *Acta Vet Scand* 2002; 43, 221-230.
- Gillespie BE, Oliver SP. Comparison of an automated ribotyping system, pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic dna fingerprinting for genotyping *Streptococcus uberis*. *NMC Annual Meeting.* 2003; p.:350-351.
- Goh SH, Byrne SK, Zhang JL, Chow AW. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. *J Clin Microbiol* 1992; 30, 1642-1645.
- Gürtürk K, Boynukara B, Ekin İE, Gülhan T. Van ve yöresindeki ineklerde subklinik mastitisin etiyolojisi üzerine bir çalışma. *Y.Y.Y. Vet Fak Derg* 1998; 9, 1-4.
- Hadimli HH, Erganiş O. Mastitis ve bağışıklık. *Veterinarium* 2001; 13(1), 37-42.

Hassan AA, Abdulmawjood A, Yıldırım AÖ, Fink K, Lämmler C, Schlenstedt R. Identification of streptococci isolated from various sources by determination of cfb gene and other CAMP-factor genes. *Can. J. Microbiol.* 2000; 46: 946- 951.

Hassan AA, Khan IU, Abdulmawjood A, Lämmler C. *Evaluation of per methods for rapid identification and differentiation of Streptococcus uberis and Streptococcus parauberis.* *J. Clin Microbiol.* 2001 39: 1618–1621.

Hassan AA, Akineden Ö, Lämmler C, Huber-Schlenstedt R. Molecular characterization of phenotypically CAMP-negative *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. *J. Vet. Med. B.* 2002; 49: 257-259.

Hawari AD, Al-Dabbas F. Prevalence and distribution of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Jordan prevalence and distribution of mastitis. *Am. J. Anim. Vet. Sci.* 2008; 3: 36-39.

Hulbert SJ, Cursons RT, Benavides MG, Williamson JH, Summers EL, Pryor SM, Woolford MW. Isolation of *Streptococcus uberis* from Different Sites of The Dairy Cow. In: *Mastitis In Dairy Production Current knowledge and future solutions.* Edit: Hogeveen, H. Wageningen Academic Publishers. Netherlands 2007; p: 635-641.

Hutton CT, Fox LK, Hancock DD. Mastitis control practices: Differences between herds with high and low milk somatic cell counts. *J Dairy Sci* 1990; 73(4), 1135-1143.

İlgaz A, Ak S, Horoz H. Trakya bölgesinde sığır mastitisinden sorumlu başlıca bulaşıcı ve çevresel bakteriyel etkenler ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *İ.Ü. Vet. Fak. Derg.* 2000; 2.

Janzekovic M, Brus M, Mursec B, Vinis P, Stajniko D, Cus F. Mastitis detection based on electric conductivity of milk. *J.A.M.M.E.* 2009; 34: 39-46.

Jayarao BM, Oliver SP, Tagg JR, Matthews KR. Genotypic and phenotypic analysis of *Streptococcus uberis* Isolated from bovine mammary secretions. *Epidemiol Infect.* 1991; 107: 543-55.

Jayarao BM, Doré JJ, Oliver SP. Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA of *Streptococcus* and *Enterococcus* species of bovine origin. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30: 2235-2240.

Jayarao BM, Oliver SP. Polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting for identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* Species isolated from bovine milk. *J. Food Protect.* 1993; 57: 240-245.

Jayarao BM, Gillespie BE, Oliver SP. Application of randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting for species identification of bacteria isolated from bovine milk. *J. Food Protect.* 1996; 59: 615-620.

Jiang M, Babiuk LA, Potter AA. Cloning, sequencing and expression of the CAMP factor gene of *Streptococcus uberis*. *Microbial Pathogenesis* 1996; 20: 297–307.

Kalmus P, Aasmae B, Karssin A, Orro T, Kask K. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2011, 53:4.

Karahan M. Mastitisli inek sütlerinden izole edilen Streptokok ve Stafilokok etkenlerinde genetik polimorfizmin araştırılması. Doktora Tezi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ 2005.

Kawata K, Anza T, Senna K, Kikuchi N, Ezawa A, Takahashi T. Simple and rapid PCR method for Identification of streptococcal species relevant to animal infections based on 23S rDNA sequence. *FEMS Microbiol.Lett.* 2004; 237: 57-64.

Khan IU, Hassan AA, Abdulmajood A, Lämmler C, Wolter W, Zschöck M. Identification and epidemiological characterization of *S. uberis* isolated from bovine mastitis using conventional and molecular methods. *J.Vet. Sci.* 2003; 4: 213-24.

Kıran F, Osmanağaoğlu Ö. Laktik asit bakterilerinin (LAB) identifikasyonunda/tiplendirmesinde kullanılan moleküler yöntemler, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 2011; 27(1): 62-74.

Kurl DN, Haataja S, Finne J. *Hemagglutination activities of group B, C, D, and G Streptococci:demonstration of novel sugar-specific cell-binding activities in Streptococcus suis.* *Infect. Immun.* 1989; 57: 384-389.

Kuyucuoğlu Y, Uçar M. Afyon bölgesi süt ineklerinde subklinik ve klinik mastitislerin görülme oranları ve etkili antibiyotiklerin tespiti. *Vet. Hek. Mikrobiol. Derg.* 2001; 1,19-24.

Martinez G, Harel J, Higgins R, Lacouture S, Daignault D, Gottschalk N. Characterization of *S. agalactiae* isolates of bovine and human origin by random amplified polymorphic DNA analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 38: 71-78.

McDonald W, Fry B, Deighton M. Identification of *Streptococcus spp.* causing bovine mastitis by RFLP-PCR of 16S-23S ribosomal DNA. *Vet.Microbiol.* 2005; 111: 241-246.

Milner P, Page KL, Hillerton JE. The Effects of early antibiotic treatment following diagnosis of mastitis detected by a change in the electrical conductivity of milk. *J Dairy Sci* 1996; 80(5), 859-863.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard. 3rd ed. Document M31-A3, vol 28 No. 8. Villanova. Pa. National Committee For Clinical Laboratory Standards, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

Oliver SP, Gillespie BE, Jayarao BM. Detection of new and persistent *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* Intramammary Infections by polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *FEMS Microbiol. Lett.* 1998; 160: 69-73.

- Paterson GK, Morgan FJE, Harrison EM, Peacock SJ, Parkhill J, Zadoks RN, Holmes MA. Prevalence and properties of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bovine bulk tank milk in Great Britain, J. Antimicrob. Chemother. 2013; doi:10.1093/jac/dkt417, 1-5.
- Phuektes P, Browning GF, Anderson G, Mansell PD. Multiplex PCR as a mastitis screening test for *S.aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* and *S. uberis* in bulk milk samples. J.Dairy Res. 2003; 70: 149-155.
- Phuektes P, Mansell PD, Browning GF. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis. J. Dairy Sci. 2001; 84: 1140-1148.
- 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, 2433-41.
- Pitkala A, Koort J, Björkroth J. Identification and antimicrobial resistance of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* isolated from bovine milk samples. J.Dairy Sci. 2008; 91: 4075-4081.
- Riekerink RGM, Barkema OHW, Kelton DF, Scholl D. Incidence rate of clinical mastitis on dairy farms. J.Dairy Sci. 2008; 91: 1366-1377.
- Riffon R, Sayasith K, Khalil H, Dubreuil P, Drolet M, Lagace J. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. J Clin Microbiol. 2001; 39, 2584-2589.
- Rişvanlı A, Kalkan C. İneklerde meme papillomatozisi ile mastitis arasındaki ilişki. Vet. Bil. Derg. 2001; 17(3): 143-147.
- Schleifer KH. Gram Positive Cocci. "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 1". Ed. PHA Sneath, NS Mair, ME Sharpe, JG Holt. Williams and Wilkins, Baltimore 1986.
- Schukken YH, Wilson D, Welcome F, Tikofsky LG, Gonzalez RN. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. Vet. Res. 2003; 34: 579-596
- Şahin M, Çolak A, Otlu S, Aydın F, Genç O, Güler MA, Oral H. Kars yöresi ithal simental ineklerde subklinik ve klinik mastitislerin görülme oranı ve etkili antibiyotiklerin belirlenmesi. Kafkas Üniv.Vet.Fak.Derg. 1995; 3: 49-55.
- Taylor DL, Ward PN, Rapier CD, Leigh JA, Bowler LD. Identification of a differentially expressed oligopeptide binding protein (OppA2) in *Streptococcus uberis* by representational difference analysis of cDNA. J. Bacteriol. 2003; 185: 5210-5219.
- 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, 2542-2541.

Türütoğlu H, Ateşoğlu A, Salihlioğlu H, Öztürk M. Marmara bölgesi süt ineklerinde mastitise neden olan etkenler. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg.* 1995; 26, 125-137.

Wibawan WT, Lammler C, Seleim R, Pasaribu FN. Haemagglutinating adhesin of group B streptococci isolated from cases of bovine mastitis mediates adherence to HeLa cells. *J. Gen. Microbiol.* 1993 139: 2173-2178.

Wieliczko RJ, Williamson JH, Cursons RT, Lacy-Hulbert SJ, Woolford MW. *Molecular typing of S. uberis strains isolated from cases of bovine mastitis.* *J. Dairy Sci.* 2002; 85: 2149-2154.

Williams AM, Collins MD *DNA fingerprinting of Streptococcus uberis based on polymorphism of DNA encoding rRNA.* *Lett. Appl. Microbiol.* 1991; 12: 23-28.

Wilson DJ, Gonzalez. RN, Sears PM. Segregation or use of separate milking units for cows infected with *Staphylococcus aureus*: effects on prevalence of infection and bulk tank somatic cell count. *J Dairy Sci.* 1995; 78(9), 2083-2085.

Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.* Lippincott Williams-Wilkins. PA.,USA. 2006.

Workineh S, Bayleyegn M, Mekonnen H, Potgieter LN. Prevalence and aetiology of mastitis in cows from two major Ethiopian dairies. *Trop Anim Health Prod* 2002; 34:19-25.

Yavuz MK, Esendal ÖM. Mastitisli inek sütlerinden izole edilen Stafilokokların tür düzeyinde identifikasyonu ve bazı özelliklerinin belirlenmesi. *Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg.* 2002; 13, 19-27.

Yancey RJ. Recent Advances in Bovine Vaccine Technology. *J. Dairy Sci.* 1993; 76(8), 2418-2436.

Yıldız A. Laktasyondaki subklinik ve klinik mastitisli sütçü ineklerde lincomycin-neomycin kombinasyonu ile meme içi tedavinin etkinliği, *F. Ü. Sağlık Bil. Dergisi* 2003; 17(1): 65-69.

Zadoks R, Gillespie BE, Barkema HW, Sampimon OC, Oliver SP, Schukken YH. Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. *Epidemiol. Infect.* 2003; 130: 335-349.

Zadoks R. Environmental Mastitis. *Nodpa News* 2004; 4: 13-14.

ÖZGEÇMİŞ

31.12.1979 Kırklareli/Babaeski doğumluyum.İlkokulu Babaeskide bulunan Fevzi Çakmak İlkokulunda okudum.Daha sonra sırasıyla Babaeski Ortaokulu ve Babaeski Süper Lisesinde okudum.Üniversiteyi Adnan Menderes Üniversitesi Fen-edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde okudum.Üniversiteden sonra Manisa/Kırkağaç Komanda Eğitim alayında kısa dönem er olarak askerliğimi yaptım.Askerden sonra önce Burger King firmasının müdürlük eğitimine katıldım.3 ay eğitimden sonra İstanbul ve Kuşadasında bulunan Burger King Restoranlarında müdürlük yaptım.Oradan istifa ederek Kuşadasında bulunan Çavuşoğlu Tuborg-Uludağ Meşrubat Bayiinde Satış Temsilciliği yaptım.Didim ve Davutlar-Güzelçamlı bölgelerinde çalıştım.En son İzmir'de A101 marketlerinde personel olarak çalışmaya başladım.Şu an hala Aydın'da A101 markatlerinin Girne Mahallesi şubesinde çalışmaktayım.

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamda ilgi, yardım ve hoőgörösünü eksik etmeyen değerli danıőmanım Prof. Dr. Osman KAYA'ya, araőtırmanın her aőamasında yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ile Araştırma Görevlilerine, destek ve anlayıőlarından dolayı aileme sonsuz teşekkür ederim.