



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİK-D-2014-002

**AYDIN İLİNDE BULUNAN SIĞIR ÇİFTLİKLERİNDE
STREPTOCOCCUS UBERIS KÖKENLİ MASTİTİSLERİN VE
VİRULANS GENLERİNİN MULTİPLEX POLİMERAZ
ZİNCİR REAKSİYONU (mPCR) İLE BELİRLENMESİ**

Gıda Yük. Müh. Erdem ÇİÇEK

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Şükrü KIRKAN**

AYDIN-2014

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİK-D-2014-002

**AYDIN İLİNDE BULUNAN SIĞIR ÇİFTLİKLERİNDE
STREPTOCOCCUS UBERIS KÖKENLİ MASTİTİSLERİN VE
VİRULANS GENLERİNİN MULTİPLEX POLİMERAZ
ZİNCİR REAKSİYONU (mPCR) İLE BELİRLENMESİ**

Gıda Yük. Müh. Erdem ÇİÇEK

DANIŞMAN
Prof. Dr. Şükrü KIRKAN

AYDIN-2014

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

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Gıda Yük. Müh. Erdem ÇİÇEK tarafından hazırlanan “AYDIN İLİNDE BULUNAN SIĞIR ÇİFTLİKLERİNDE *STREPTOCOCCUS UBERIS* KÖKENLİ MASTİTİSLERİN VE VİRULANS GENLERİNİN MULTİPLEX POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (mPCR) İLE BELİRLENMESİ” başlıklı tez, 04/07/2014 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- Prof. Dr. K. Serdar DİKER

AÜ, Veteriner Fakültesi

.....

3- Prof. Dr. Şükrü KIRKAN

ADÜ, Veteriner Fakültesi

.....

4- Doç. Dr. Cavit KUM

ADÜ, Veteriner Fakültesi

.....

5- Doç. Dr. Serap SAVAŞAN

ADÜ, Veteriner Fakültesi

.....

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

Prof. Dr. Sacide KARAKAŞ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Mastitis süt veriminde ve kalitesinde azalma ile seyreden, veteriner hekim, laboratuvar ve ilaç giderleri gibi ekonomik giderleri olan bir enfeksiyondur. Bu enfeksiyonu oluşturan pek çok neden vardır ve bakteriler mastitisin oluşumunda önemli bir yere sahiptir. Streptokok enfeksiyonları da bu bakteriyel nedenler arasında hem çevresel hem de bulaşıcı bir karaktere sahiptir. *S. uberis* etkenlerinin bu karakterleri mastitis enfeksiyonlarının teşhisi, tedavisi ve oluşturulmak istenen kontrol programlarının düzenlenmesinde önemli bir etki oluşturur. Ülkemizde mastitisle ilgili pek çok çalışma olmasına karşın *S. uberis* etkeninin virulans dağılımının moleküler tabanda değerlendirildiği çalışmalar sınırlıdır.

Mastitise neden olan streptokok etkenlerinin laboratuvar da konvansiyonel olarak teşhisi hem uzun sürede sonuç vermekte hem de kullanılan biyokimyasal testlerin etkenlere bağlı farklı reaksiyonlar oluşturması nedeniyle hatalı sonuçlar alınmaktadır. Bu nedenle son zamanlarda geliştirilen pek çok moleküler metot hızlı ve güvenilir bir teşhis için tercih edilmektedir. Bu çalışma sonucunda önemli mastitis patojenlerinden biri olan *S. uberis* suşlarında virulans-ilişkili genlerin tespiti ve bunların dağılımının belirlenmesi amaçlanmaktadır. Böylece bu patojenin patojenitesinin daha iyi anlaşılmasına ve kontrolünün daha kolay gerçekleştirilmesine katkıda bulunulabileceği düşünülmektedir.

Araştırmamız, ADÜ Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından VTF-12017 kodlu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
RESİMLER DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
1.1. Mastitis	1
1.2. Mastitisin Önemi	1
1.3. Bulaşıcı ve Çevresel Mastitis	2
1.4. İnfeksiyonun Klinik ve Subklinik Formları	3
1.5. Streptokokkal Mastitisler	4
1.5.1. Streptokokların Taksonomisi	4
1.5.2. Streptokokların Mastitis İnfeksiyonlarındaki Durumu	4
1.5.3. <i>S. agalactiae</i>	6
1.5.4. <i>S. dysgalactiae</i>	8
1.5.5. <i>S. uberis</i>	9
1.6. Streptokok Mastitislerinin Laboratuvar Tanısı	13
1.7. Koruma ve Kontrol	18
2. GEREÇ VE YÖNTEM	19
2.1. Gereç	19
2.1.1. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar	19
2.1.2. PCR’da Kullanılan Buffer, Solüsyon ve Enzimler	19
2.1.3. Primerler	19
2.1.4. PCR’da Kullanılan Alet ve Ekipmanlar	20
2.1.5. Elektroforez Cihazı	20
2.1.5.1. Agarose Jel Hazırlanışı	20
2.1.5.2. Marker	21
2.1.5.3. Etidyum Bromür	21
2.1.5.4. Standart Suş	21
2.2. Yöntem	21

2.2.1. İzolasyon ve İdentifikasyon	21
2.2.1.1. Eskulin Testi	21
2.2.2. DNA Ekstraksiyonu	22
2.2.3. PCR	22
2.2.3.1. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi	24
2.2.3.2. Amplikonların Elektroforez Tankında Yürütülmesi	24
2.2.3.3. Görüntüleme ve Değerlendirme	24
3. BULGULAR	25
3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	25
3.2. PCR Bulguları	25
4. TARTIŞMA	28
5. SONUÇ	35
ÖZET	36
SUMMARY	37
KAYNAKLAR	38
ÖZGEÇMİŞ	44
TEŞEKKÜR	45

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	<i>S. agalactiae</i> , <i>S. dysgalactiae</i> ve <i>S. uberis</i> etkenlerinin konvansiyonel ayırımı	14
Çizelge 2.1.	Multipleks PCR’da kullanılacak oligonükleotid primer dizileri	20
Çizelge 2.2.	<i>S. uberis</i> 16S rRNA gen identifikasyonu için mastermiks hazırlanma oranları	23
Çizelge 2.3.	Virulans ilişkili genlerin identifikasyonu için için mastermiks hazırlanma oranları	23
Çizelge 2.4.	PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı	24
Çizelge 3.1.	<i>S. uberis</i> suşlarının virulans kalıplarının dağılımı	27

RESİMLER

Resim 3.1.	<i>S. uberis</i> spesifik 16S rRNA gen varlığı	25
Resim 3.2.	<i>S. uberis</i> suşlarının virulans genlerinin dağılımı	26

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. İnsan ve hayvan sağlığı, beslenmesi ve ulusal ekonomide çok önemli olan süt ve süt ürünleri, ancak sağlıklı hayvanlardan elde edilebilir. 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 (Blowey ve Edmondson 1995, Khan ve ark 2003; Akan, 2006).

1.2. Mastitisin Önemi

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. 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 oluşmaktadır. Düzenli ve bilinçli kontrol programlarının uygulanması, klinik mastitis olgularının azaltılmasını ve subklinik infeksiyonların da erken teşhis edilmesini sağlamaktadır (Blowey ve Edmondson 1995).

1.3. 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 Edmondson 1995).

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 Edmondson 1995).

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. Sağımçıların 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 (Zadoks ve ark 2005).

Çevresel patojenlerin infeksiyon oluşturması hayvanlar arasında sağım esnasında ya da sağım aralarında çevre teması ile meydana gelir (Oliver ve ark 1998). 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'sinde klinik semptomlar kendini gösterir. Klinik mastitislerin sonucuna bağlı olarak da süt üretiminde, reproduktif aktivitede azalma ve işletme giderlerinin artışı ile ekonomik kayıp şekillenir (Zadoks ve ark 2003).

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 sağımçıların elleri, sağım makineleri gibi sağım esnasında yayılma gösterir. Bu şekilde infekte hayvanlardan sağlıklı hayvanlara mikroorganizmaların geçişi gerçekleşir (Blowey ve Edmondson 1995).

1.4. 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 (Blowey ve Edmondson 1995). 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.

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

1.5. 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 (Zadoks 2004).

1.5.1. Streptokokların Taksonomisi

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. 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).

1.5.2. 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*'nin neden olduğu mastitis infeksiyonlarında azalma görülmüş ancak *S. uberis*'in neden olduğu infeksiyonlarda belirgin düzeyde bir azalmaya rastlanmamıştır (Zadoks ve ark 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. bovis*, *S. parauberis*, *S. equi* ve *S. canis* bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda, çevresel patojen etkenler arasında *S. uberis* ve *S. dysgalactiae* sık olarak izole edilmektedir. Bu etkenlerin yaygın olmasına karşın patogenezi, virulans faktörleri ile ilişkileri net olarak anlaşılamadığı ve etkenlerin heterojen özellikler göstermesi nedeniyle oluşturulmak istenen kontrol stratejileri de başarısız olmuştur (Oliver ve ark 1998).

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 1998).

Bulaşıcı ve çevresel streptokokkal etkenlerin neden olduğu mastitis infeksiyonları için yapılan çalışmalarda yıllara ve işletme tiplerine göre de farklı sonuçlara ulaşılmıştır. Araştırmacılar *S. uberis* türlerinin kum altlık kullanan işletmelerde, talaş kullanan işletmelere göre daha sık infeksiyon oluşturduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca *S. dysgalactiae*’nın daha çok *Actinomyces pyogenes* ile birlikte yaz mastitislerine neden olduğunu bildirmişlerdir (Oliver ve ark 1998).

Sicilya’da yapılan bir çalışmada ise, süttten yapılan izolasyonda % 11,1 oranında streptokoklara rastlanırken, bu oranın % 2,3’lük kısmını *S. agalactiae*’nin oluşturduğu gözlenmiştir (Oliver ve ark 1998).

Tenhagen (2009) 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 identifiye etmişlerdir. 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.

Yeni Zelanda'da klinik mastitislerin % 15,2'sinde *S. uberis*, % 0,6'sında *S. dysgalactiae*, % 0,3'ünde ise *S. agalactiae* izole edilmiştir. İngiltere'de yapılan bir çalışmada da sütlerdeki bakteriyolojik örnekleme sonucunda % 23,5 oranında *S. uberis* etkeni izole edilirken *S. agalactiae* ve *S. dysgalactiae* etkenlerine rastlanmamıştır (Bradley ve ark 2007).

1.5.3. *S. agalactiae*

S. agalactiae, kronik hale geçen, zamanla memelerin kör olması ile sonuçlanan çok bulaşıcı mastitise neden olmaktadır. Sıvı kültürlerde zincir şeklinde üreme gösteren etken, *Streptococcocea* ailesine *Streptococcus* cinsine ait olan bir bakteridir. Bakteri, meme kanalları ve sistemlerinde yaşar. Beta hemolitik olan etkenler hemolitik olmayan etkenlere oranla daha patojenik suşlardır. CAMP testi pozitifdir. Serolojik gruplandırma da identifikasyon prosedüründe önemli bir özelliktir ve *S. agalactiae* Lancefield gruplandırmasında B grubunda yer alır. Bu patojen meme kanalına kolonize olarak, meme epitel hücrelerine tutunur. Bu özellik *S. aureus* ve *S. agalactiae* için karakteristiktir. *S. agalactiae* süt kanallarında ve alveollerinde çoğalarak yangısal cevabı tetikler. Damarların genişlemesiyle bol miktarda lökosit süte ve meme dokusuna geçer. Sütün fiziksel ve kimyasal yapısında bozulmalar şekillenir. Sekretorik dokuda yangısal duruma karşı cevap, fibröz doku oluşumu ile şekillenir. Tedavi edilmezse süt kanalları yangısal duruma bağlı olarak kapanır ve süt üretimi azalır, somatik hücre sayısı artar ve involusyon şekillenir. *S. agalactiae* penisilin, ampisilin, sefalosporin, eritromisin, trimetoprim-sülfonamid gibi antibiyotiklere karşı duyarlıdır (Blowey ve Edmondson 1995).

S. agalactiae mastitislerinin genel olarak subklinik seyir göstermesi nedeniyle, etkenin daha kolay ve hızlı bir şekilde teşhis edilmesi için sütün laboratuvar ortamında incelenmesi gerekmektedir (Meiri-Bendek 2002). Teşhisin hızlı ve doğru bir şekilde

gerçekleşmesi için PCR temelli teknikler, yarar sağlamaktadır. Meiri-Bendek (2002) geliştirdiği spesifik primerler ile PCR tekniklerinin *S. agalactiae*'nin teşhisinde daha güvenilir olduğunu bildirmişlerdir.

Dmitriev (2004) yaptığı çalışmada B grubu streptokokların teşhisi için *scpB* genini PCR ile tiplendirme için kullanmışlar ve bu primerlerle gerçekleştirilen PCR'in kültür metoduna göre daha hassas, kolay ve daha kısa sürede sonuç verdiğini ortaya koymuşlardır.

Abdulmawjood ve Lammer (1999), B grubu streptokokların 16S rRNA bölgesine yaptıkları PCR işlemi ile bu gen bölgesinde bulunan değişken V2 bölgesini amplifiye etmişler ve yaptıkları enzim kesimleri ile etkenler arasında benzer bantlar görüntülemişlerdir. Jayarao ve arkadaşları (1992), B grubu streptokoklar da 16S rRNA gen yapısının türler arasında varyasyon göstermediğini ve mastitise neden olan streptokokların identifikasyonunda oldukça yararlı olduğunu belirtmişlerdir. Ancak PCR sonrası işlemlerin, özellikle, enzimle kesim işlemlerinin zaman alıcı ve ek manüplasyonlar gerektirmesinin dezavantaj olduğunu belirlemişlerdir. Forsman ve arkadaşları (1997), B grubundaki streptokokların 16S-23S rRNA gen bölgesinde sekans varyasyonunu kullanarak tür spesifik primerler oluşturmuşlardır. B grubu streptokoklara spesifik bir oligonükleotid primer dizaynı için 16S rRNA geninin V2 bölgesinin türe spesifik varyasyon yapısı karşılaştırma yapılarak kullanılmıştır.

Chatellier (1997) *S. agalactiae* etkenlerine 4 farklı primer ile yaptıkları RAPD-PCR işlemi sonucunda 114 suşta 71 adet farklı RAPD-PCR profili saptarken, serotiplendirme ile 17 farklı profil gözlemişlerdir. RAPD-PCR yönteminin tam olarak anlaşılması için de virulans özelliklerinin başka bir PCR temelli metot ile belirlenmesi gerektiğini belirtmişlerdir. RAPD-PCR profillerinin çeşitliliğini de, coğrafik varyasyonların *S. agalactiae* etkenleri üzerindeki genetik yapı değişimlerine neden olması ile açıklamışlardır. RAPD-PCR sonuçları, *S. agalactiae* etkenlerindeki heterojenitenin sadece farklı serotipler arasında değil aynı zamanda, aynı serotip içerisinde de olduğunu göstermektedir (Sukhanand ve ark 2005).

S. agalactiae nedenli mastitislerin tedavisinde uygun antibiyotiklerin kullanımı ile infeksiyon seyri iyileştirilebilir, ancak tedavi etkinliğinin iyi olması açısından sağım sırasındaki hijyen kurallarına, sağım sonrası meme dezenfeksiyonuna, kuru dönem

tedavisine, kronik enfekte hayvanların sürüden uzaklaştırılmasına ve sağım makinelerindeki optimum performansa dikkat edilmesi gereklidir (Blowey ve Edmondson 1995a).

1.5.4. *S. 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 hippuratu 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 ve ark 1998). 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 enfeksiyonun taşınmasında daha az öneme sahiptir. Etken aynı zamanda tonsillerde bulunduğu için memelerin yalanması esnasında da geçiş mümkündür. Bu durum *S. dysgalactiae*'nın düve mastitislerinde ve kuru dönemdeki hayvanlarda görülme nedenini açıklamaktadır (Blowey ve Edmondson 1995a). 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. Lancefield serogruplandırmasında C grubunda yer alan etken taksonomik çalışmalarda grup L içerisinde *S. equisimilis*, insan enfeksiyonlarında ise G grubu içerisinde *S. dysgalactiae* olarak isimlendirilmiştir. Biyokimyasal testler ve hücre duvarı yapısının değerlendirilmesi temel alınarak, hayvan enfeksiyonlarında serogrup C ve L'ye ait olduğu bulunarak *S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae* olarak tiplendirilmiştir. İnsan enfeksiyonlarında 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 enfeksiyonlarından sorumlu streptokok türlerinin sığır meme bezlerine yerleşerek enfeksiyon yaptığına nadiren rastlanmıştır. Sığırlarda enfeksiyona 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* enfeksiyonu bulunmadığı halde laktasyon döneminde enfeksiyonun görülmesinin, etkenin

çevresel bulaşma yolunu daha çok kullandığını göstermiştir (Colque ve ark 1993, Oliver ve ark 1998).

Hassan ve arkadaşları (2003) 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.

1.5.5. *S. uberis*

S. uberis'in mastitis infeksiyonu ile ilişkisi ilk olarak 1932 yılında Diernhofer tarafından ortaya konmuştur (Oliver ve ark 1998). Bu çalışmalara göre enterokok ailesine ait olduğu düşünülen *S. uberis*'in *Enterococcus* ailesine ait olmadığı, piyojenik streptokok ailesine benzerlikler gösterdiği görülmüştür. 1972 yılında *S. uberis*'in bazı fizyolojik özelliklerini aynı habitatta bulunan diğer 7 tür ile karşılaştırılmış ve *S. uberis*'in iyi tanımlanmış ayrı bir tür olduğunu bulmuştur. 1977 yılında ise Streptokok ailesi *S. pyogenes*, *S. viridans*, *S. lactis* ve enterokoklar ailesi olarak 4 büyük gruba ayrılmıştır. *S. uberis* bu çalışma da viridans grup içerisine girmiştir. *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, meme başı dezenfeksiyonu ve kuru dönem antibiyotik tedavisinin yetersiz ve uygun olmayışı olarak bildirilmiştir (Khan ve ark 2003).

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 (Blowey ve Edmondson 1995a). *S. uberis* etkenleri süt işletmesi, ahır, altlık ve su yalıkları, meralar ve dışkı ile kontamine olan her yerde sık olarak bulunur. Meme bezlerinin buralarla teması sonucu etken alınmış olur (Zadoks 2004, Khan ve ark 2003). Etkenin aynı zamanda ineklerde sindirim sistemine, genital sisteme ve meme bezine kolonize olabildiği görülmektedir (Oliver ve ark 1998, Khan ve ark 2003).

Etkenin bu şekilde pek çok ortama adapte olması biyolojik olarak incelenmiş ve pek çok pseudojen 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 virulans 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 Edmondson 1995a, Khanve ark 2003).

Bazı *S. uberis* suşları lökositler tarafından gerçekleştirilen fagositoza diğer suşlara oranla daha fazla direnç gösterir (Oliver ve ark 1998). 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 Edmondson 1995a).

Yapılan bir çalışmada da, *S. uberis* etkenlerinin meme bezinde duktular dokuda ve sekretorik alveolün luminal bölgesinde üreme gösterdiği gözlenmiştir. Douglas ve arkadaşları (2007), *S. uberis* etkenlerinin uzun süre meme epitelyum hücrelerinde herhangi

bir etki olmaksızın kalabildiğini ve hücre içi bu yerleşimi ile infeksiyonun meme dokusunun derinliklerine yayılarak persiste bir infeksiyon haline geldiğini belirtmişlerdir.

Mastitise neden olan Streptokokların cins ve tür düzeyinde tiplendirilmesi, virulans 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 ayırımını yapmak neredeyse mümkün olmadığı için bu etkenlerin ayırımında da moleküler teşhis metodlarının kullanımı sağlanmış ve DNA hibridizasyon metodları, 16S rRNA sekans analizi gibi yöntemlerin geliştirilmesiyle 2 etken arasındaki ayırım yapılmıştır (Jayarao ve ark 1993).

Williams ve Collins (1990), *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. Aynı çalışmada *S. uberis*'in 16S rRNA nükleotid sekansını genotip 1 ve genotip 2 olarak ayırarak, *S. uberis* genotip 2'yi *S. parauberis* olarak isimlendirmiştir. *S. uberis* ve *S. parauberis*'in 2 yakın tür olması yanında kültürel, morfolojik, biokimyasal ve serolojik olarak ayırımı yapılamadığı için etkenlerin birbirinden sadece DNA hibridizasyon yöntemleri ile ayrılacaklarını bildirmişlerdir.

Khan (2003), Jayarao ve arkadaşları (1991b) ise *S. uberis* ve *S. parauberis* etkenleri arasındaki moleküler farklılığı RFLP-PCR analizi ile ortaya koymuşlardır. Hassan ve arkadaşları (2001) konvansiyonel olarak ayırımı yapılamayan *S. uberis* ve *S. parauberis* suşlarına 16S rRNA, 23S rRNA ve 16S-23S rRNA genlerine spesifik primerler ile yaptıkları PCR işlemi ile ayırımı sağlamışlardır.

Yapılan diğerk moleküler çalışmalarda *S. uberis*'in tek tip bir organizma olmadığı ve moleküler olarak farklılık gösterdiği görülmüştür (Jayarao ve ark 1990). Baseggio ve arkadaşları (1997), mastitise neden olan 3 streptokokkal etken arasında *S. uberis*'in en heterojen grup olduğunu göstermiş, 10 işletmede 21 alt tip bulmuş ve sadece bir işletmede benzer 2 bant profili gözlemlenmişlerdir. Jayarao ve arkadaşları (1992) *S. uberis*'in klinik mastitis durumları dışında bir sürüdeki suşların klonal olarak benzerlik oranını % 20-100 gibi değişen oranda bulmuşlardır.

Jayarao (1990) 42 adet *S. uberis* etkenini önce konvansiyonel metotlar ile tiplendirmeye çalışmışlar ve 27 adet *S. uberis* etkeninin spesifik biyokimyasal 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 identifiye etmişlerdir. 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 arkadaşları (2005) farklı ortamlardan izole edilen *S. uberis* etkenlerine yapılan tiplendirme sonucunda etkenlerin aynı yapıda olduklarını görmüşlerdir. Jayarao ve arkadaşları(1992) 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 (2007), aynı çiftlik orijinli *S. uberis* etkenlerinde genetik olarak birbirinden bağımsız ve benzerlik göstermeyen bantlarla karşılaşmış, çok az benzerlik bulmuştur.

Riffon (2001), *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 RAPD-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 (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. Farklı profillerin olması etkenlerin farklı çevre orijinli olduğunu ve etkenlerin etkili bir şekilde kontrol edilebilmesi için de sürüler arası ve coğrafik alanlara bağlı farklılıkların göz önüne alınmasının gerekliliği üzerinde durulmuştur (Riffon ve ark 2001).

Zadoks (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).

1.6. 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 (Leigh 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 (Çizelge 1.1.). *S. uberis* etkenleri serolojik olarak heterojenite gösterir (Leigh 2000).

Çizelge 1.1. *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* ve *S. uberis* etkenlerinin konvansiyonel ayırımı

	CAMP	Eskulin	Na-Hippurat	MacConkey	Lancefield
<i>S. agalactiae</i>	+	-	+	-	B
<i>S. dysgalactiae</i>	-	-	-	-	C
<i>S. uberis</i>	-	+	+	-	-

Streptokokların hemagglütinasyon oluşturma özellikleri Wibawan ve arkadaşları (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. Araştırmacılar, hemagglütinasyon özelliğinin bakterinin mukozal yüzeylere tutunmasında etkili olduğu ancak test sonuçlarının bakterilerin in vitro ortamda üretildiği koşullar ve besiyerinden etkilendiğini saptamışlardır (Leigh 2000).

McDonald (2005), CAMP pozitif özelliğinin *S. uberis* etkenlerinde % 9 oranında görülebileceğini belirtmişlerdir. Jiang ve arkadaşları (1996) *S. agalactiae* ve *S. uberis* etkenlerinde bulunan CAMP yapısını karşılaştırdıkları araştırmada, her iki etkende bulunan CAMP faktör yapısının ve CAMP faktör yapısına karşı oluşan antikörlerin benzer olduğunu göstermişlerdir. *S. uberis* etkenlerinin CAMP testinde % 19'unun pozitif olduğu ve eskulin testinde ise % 11 oranında negatif olduğu belirlenmiştir (Odierno ve ark 2006). Hassan ve arkadaşları (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 2002).

Khan (2003), streptokokların ayırımında Lancefield serogruplandırmasının tüm streptokok türlerini doğru sınıflandıramadığını, çünkü grup spesifik antijenlerin her zaman bulunmadığını, farklı türler arasında benzer antijenlerin olduğunu ya da tek bir tür içerisinde birden fazla antijenin bulunabileceğini belirtmişlerdir.

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 (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 arkadaşları (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 süten yapılan ekstraksiyon metodları 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 ark2003).

Duarte (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 arkadaşları (2005), farklı enzim kesimleri ile streptokokların tür düzeyinde ayırımını yapmışlardır. Tek reaksiyonda daha kısa sürede uygulanan RFLP-PCR metodunu konvansiyonel metotlara göre daha etkin bulmuşlardır. Forsman ve arkadaşları (1997), stafilokok ve streptokoklar için geliştirdikleri spesifik primerler ile etkene yönelik teşhis yapmışlardır. Phuektes ve arkadaşları (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 (2000), *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.

Baseggio (1997), 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 (2003), farklı bölgelerden izole ettikleri 41 adet *S. uberis* suşuna yaptıkları genotiplendirme çalışmalarında kullandıkları OPE4 primeri ile 41 etkende 19 adet farklı profil yapısı gözlemlemişler, 2 adet etkende ise benzer profil bulmuşlar ancak bu örneklerle yapılan PFGE tiplendirmesinde etkenlerin farklı olduklarını görüntülemişlerdir.

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

Odierno (2006), *S. uberis* suşları için uyguladıkları RFLP-PCR ve konvansiyonel testler sonucunda RFLP-PCR yönteminin % 100 oranında doğru identifikasyon yaptığı ancak konvansiyonel test sonuçlarının etkene bağlı olarak PCR yöntemini desteklemediğini bildirmişlerdir.

Wieliczko (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 cyclus programındaki farklılığa dayandırmışlar ve aynı zamanda bulguların tekrar edilebilirliğinin düşük olduğunu bu nedenle RAPD-PCR yönteminde optimizasyon şartının olduğunu vurgulamışlardır.

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

Jayarao (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.

1.7.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 iř gücü olmakta ve tedavi masrafları asgariye inmektedir. Streptokok infeksiyonlarının kontrol edilmesi içinde belirli kritik kontrol noktaları oluşturulmuştur. Sağım sırasındaki hijyen kuralları, kuru dönem tedavisi, sağım öncesi ve sonrası meme dezenfeksiyonu, kronik infekte hayvanların sürüden uzaklaştırılması, sağım makinelerinin optimum şartlarda kullanımı bu kontrol noktalarını oluşturur (Blowey ve Edmondson 1995a).

Streptokokkal infeksiyonların tedavisi için etkenlerin duyarlı olduğu penisilin grubu antibiyotikler kullanılabilir. Hem laktasyon döneminde hem de kuru dönemde bu şekilde sağaltım ile % 60- 90 oranında başarı sağlanır. Alınacak diğer koruyucu önlemler etkenin çevresel veya kontagiyz yapısına bağlı olarak seçilir. Çevresel streptokok infeksiyonlarında çevresel şartlar iyileştirilmelidir (Zadoks ve ark 2005).

Bu çalışmada, mastitisli sütlerden sığırlarda önemli mastitis etkenlerinden olan *Streptococcus uberis* izolasyonu ve tür spesifik hedef genler ile identifikasyonu yapılarak, virulans genlerinin varlığı ve dağılımınının multiplex Polimeraz Zincir Reaksiyonuyla ortaya konması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.Gereç

Bu çalışmada Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na getirilen mastitis problemi gösteren hayvanlara ait sütler ile çeşitli işletmelerden steril koşullarda ve uygun örnekleme ile alınan, toplam 200 adet süt örneği incelendi. Laboratuvara getirilen süt örneklerinden elde edilen izolatlar, koloni görünümü, Gram boyama ve katalaz testi ve konvensiyonel testler ile identifikasyonları sonucu *S.uberis* suşları ayrıldı ve moleküler çalışmalar için -20 °C deep freeze'de saklandı.

2.1.1. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar

Süt örneklerinden *S. uberis* izolasyon ve identifikasyonunda kanlı agar (Oxoid®, CM0055), Brain-Hearth Broth (Oxoid®, CM1135), Ninhidrin ayracı (Merck) kullanıldı.

2.1.2.PCR'da Kullanılan Buffer, Solüsyon ve Enzimler

İzole edilen *S. uberis* suşlarının virulans genlerinin PCR temelli tekniklerle identifikasyonu ve tiplendirilmesi amacıyla, Taq Polimeraz (Bioron 101005), 10X PCR buffer (Ambresco O658), 25 mM MgCl₂ (Fermentas 6703, Litvanya), 10 mM dNTP set (Larova LR 0200), DNA marker (Fermentas 00028313, Litvanya), Agaroz (PronA agaroz 8012), 6X Loading dye (Fermentas R0611), Ethidium Bromide, TBE solüsyonu, primerler kullanılmıştır.

2.1.3. Primerler

S. uberis identifikasyonu ve virulans ilişkili genlerin tespiti için araştırmamızda kullanılan primerler Çizelge 2. 1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Multipleks PCR’da kullanılan oligonükleotid primer dizileri (Reinoso ve ark 2011)

<i>S. uberis</i> patojenite faktörü	Virulans Genleri	Primer Dizilimi (5’-3’)	Hedef Bölge (bp)
-	16S rRNA gen	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGA CGGGTGTACAACTCTCGTGGT	1400
CAMP	<i>cfu</i>	TATCCCGATTGTCAGCCTAC CCTGGTCAACTTGTGCAACTG	205
Hyaluronik asit	<i>hasA</i>	GAAAGGTCTGATGCTGAT TCATCCCCTATGCTTACAG	600
	<i>hasB</i>	TCTAGACGCCGATCAAGC TGAATTCCYATGCGTCGATC	300
	<i>hasC</i>	TGCTTGGTGACGATTTGATG GTCCAATGATAGCAAGGTACAC	300
Yüzey dehidrojenaz proteini	<i>gapC</i>	GCTCCTGGTGGAGATGATGT GTCACCAGTGTAAGCGTGGA	200
Laktoferrin bağlayıcı	<i>lbp</i>	CGACCCTTCAGATTGGATTC TAGCAGCATCACGTTCTTCG	698
Solvent aktif taşıma	<i>oppF</i>	GGCCTAACCAAAACGAAACA GGCTCTGGAATTGCTGAAAG	419
Plazminojen aktivasyon	<i>pauA/</i> <i>pauB</i>	GAGATTCTCTCTAGATATCA GGGCTGCAGATCCGTTAAAAAATGACATTAATAT	1200
Serin proteaz	<i>skc</i>	CTCCTCTCCAACAAAGAGG GAAGGCCTTCCCCTTTGAAA	800
Epitel hücre invazyon	<i>sua</i>	ACGCAAGGTGCTCAAGAGTT TGAACAAGCGATTTCGTCAG	776

2.1.4.PCR’da Kullanılan Alet ve Ekipmanlar

DNA Thermal Cycler (Eppendorf), elektroforez tankı ve güç kaynağı, UV transillüminatörlü bilgisayarlı jel dokümantasyon sistemi, santrifüj (Eppendorf), steril kabin (Thermo Class II 2020), vorteks (Nuve), hassas terazi (Aesculap) kullanıldı.

2.1.5. Elektroforez Cihazı

Elektroforez işlemi Biorad® marka, elektroforez tankında, görüntüleme işlemi Vilber Lourmat (Germany) marka transillüminatör cihazında gerçekleştirildi.

2.1.5.1. Agarose Jel Hazırlanışı

Agarose (Prona)	2 g
TAE (0,5x)	100 ml

Buffer, şişe içerisindeki agarozun üzerine ilave edilip, karıştırıldı ve mikrodalga fırında yaklaşık 3 dk. kaynatılan karışım, 50°C'ye kadar soğutuldu. Etidyum brömür ilave edildikten sonra, halen sıvı halde olan karışım, jel kalıbının içerisine yavaşça, kabarcık bırakmayacak şekilde döküldü ve içerisine yükleme kuyucuklarını oluşturacak olan taraklar yerleştirilerek, 15–20 dakika oda ısısında soğumaya bırakıldı. Soğutulan jel, kalıptan çıkarılarak, elektroforez tankına dikkatlice yerleştirildi.

2.1.5.2. Marker

Marker olarak 100 bp lik DNA ladder (Fermentas®) kullanıldı.

2.1.5.3. Etidyum Bromür

Elektroforez işleminden önce görüntüleme için jelin boyanmasında Biochemica® marka % 1'lik Ethidium Bromür 50°C'ye kadar soğutulan agaroz jel içerisine 3 µl miktarında eklenerek kullanıldı.

2.1.5.4. Standart Suş

Tüm testlerde kalite kontrol suşu olan *Streptococcus uberis* ATCC 700407 kontrol olarak kullanıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. İzolasyon ve İdentifikasyon

Laboratuara getirilen süt örneklerinden kanlı agarlara ekimler yapılarak 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda besiyerlerinde yapılan değerlendirmelerde 1-3 mm çapında, S tipli koloniler seçilerek Gram boyama yöntemi ile boyandı. Mikroskopik olarak Gram pozitif kok şeklinde olan kolonilere katalaz testi yapıldı ve katalaz negatif koloniler *Streptococcus spp.* olarak kabul edildi (Akan 2006, Winn ve ark 2006).

2.2.1.1. Eskulin Testi

İzole edilen streptokok kolonilerinden Edward's mediuma ekimler yapılarak 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda koyu kahve-siyah renkli koloniler *S. uberis* için pozitif, açık kahve renkli ya da renksiz koloniler negatif olarak

kabul edildi. Tür düzeyinde identifikasyon amacıyla eskulin testi kullanıldı. İzole edilen streptokokların saklanması amacıyla gliserinli Bain-Heart Broth kültürleri -20 °C' ye kaldırıldı (Fortin ve ark 2003, McDonald ve ark 2005).

2.2.2. DNA Ekstraksiyonu

200 adet süt örneğinden izole edilen *S. uberis* suşları belirlendi ve DNA ekstraksiyonu aşamasına geçildi. İzole edilen suşların DNA izolasyonu genomik DNA ekstraksiyon kiti (Fermentas®) ile prosedüre uygun olarak yapıldı. Ayrılan DNA'lar PCR çalışmaları yapılana kadar cryo tüplerde -20 °C derin dondurucuda saklandı.

Fermentas® DNA Isolation Kit Prosedürü:

*Bir öze dolusu *S. uberis* kültürü 400 µl lizis solusyonu ile süspanse edildi. 65°C'de 5 dk inkübe edildi.

*600 µl kloroform ilave edildikten sonra 10.000 rpm.de 2 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı.

*800 µl presipitasyon solusyonu pelet üzerine ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 1-2 dakika karıştırıldı.

*10.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra DNA içeren pelet 1.2 M NaCl solusyonunda çözdürüldü.

*300 µl etanol eklendikten sonra 10 dakika -20°C'de bekletildi. 10.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra % 70'lik etanol ile yıkandı. Daha sonra 100 µl steril distile suda çözüldü. Her bir PCR reaksiyonu için 5 µl template DNA kullanıldı.

2.2.3. PCR

Fenotipik olarak *S. uberis* olduğu belirlenen tüm suşlarda 16S rRNA ve virulans ilişkili genlerin varlığı incelendi.

Master Mikslerin Hazırlanışı: Araştırmamızda *S. uberis* primerleri amplifikasyon için kullanılmıştır. Master miskin hazırlanması aşamasında; 20 ng DNA örneği, her primerden 1µM, 0.4 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 1X reaksiyon buffer, 1.5 U Taq DNA polimeraz verilen oranlarda kullanılarak toplamda 50 µl hacme ulaşılmıştır (Reinoso ve ark 2011). *S. uberis* 16S rRNA gen identifikasyonu için kullanılan malzemeler ve volümleri Çizelge 2.2.'de belirtilmiştir. Virulans ilişkili genlerin identifikasyonu için yapılan PCR işleminde 100 mM'lık *cfu*, *hasA*, *hasB*, *hasC*, *gapC*, *lbp*, *oppF*, *pauA/pauB*, *skc* ve *sua*

primerlerinden her biri 40 µM olacak şekilde birleştirilerek primer miksleri hazırlanmıştır. Virulans ilişkili genlerin identifikasyonu için kullanılan malzemeler ve volümleri Çizelge 2.3.'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.2. *S. uberis* 16S rRNA gen identifikasyonu için mastermiks hazırlanma oranları (Reinoso ve ark 2011)

Malzeme (Ticari)	İstenen Son Miktar (µl)
Taq Buffer 1(+KCl,- MgCl ₂) (1X)	5 µl
MgCl ₂ (1.5mM)	3 µl
dNTP (0.4mM)	0.5 µl
Primer16S rRNA (for)	1 µl
Primer16S rRNA (rev)	1 µl
Taq DNA Polimeraz (1.5U)	0.5 µl
ddH ₂ O	37 µl
Template DNA (20 ng)	2 µl
TOPLAM	50 µl

Çizelge 2.3. Virulans ilişkili genlerin identifikasyonu için mastermiks hazırlanma oranları(Reinoso ve ark 2011)

Malzeme (Ticari)	İstenen Son Miktar (µl)
Taq Buffer 1(+KCl,- MgCl ₂) (1X)	5 µl
MgCl ₂ (1.5mM)	3 µl
dNTP (0.4mM)	0.5 µl
Primer miks (for)	1 µl
Primer miks (rev)	1 µl
Taq DNA Polimeraz (1.5U)	0.5 µl
ddH ₂ O	37 µl
Template DNA (20 ng)	2 µl
TOPLAM	50 µl

Mastermikslere hazırlandıktan sonra 0,2 mL'lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine 48'er µl hazırlanan mastermiksten ilave edildi. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA'dan 2'şer µl alınıp, ilgili tüplerin içerisine eklendi ve ağızları sıkıca kapatıldı. Hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme cihazlarına yüklenip, programlandı. *S. uberis* ve virulans ilişkili genlerinin identifikasyonu için hazırlanan mastermikslerin PCR analizlerinde kullanılan ısıl döngü ve süre diyagramı (Reinoso ve ark 2011)Çizelge 2.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.4. PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı (Reinoso ve ark 2011)

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	95°C	3 dk
Denatürasyon	35	95°C	30 sn
Bağlanma		55°C	30 sn
Uzama		72°C	1 dk
Son Uzama	1	72°C	5 dk
Bekletme	1	4°C	∞ dk

2.2.3.1. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi

6x loading dye boyasından pipetin ucuna 3 µl kadar alınıp, daha sonra elde edilen 10 µl PCR ürünleriyle karıştırıldı. Oluşturulan karışımdan 10 µl alınarak, jeldeki uygun pozisyondaki kuyucuğa yüklendi.

2.2.3.2. Amplikonların Elektroforez Tankında Yürütülmesi

Hazırlanmış olan jele, istenilen örnekler ve markerların yüklemesi yapıldıktan sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonlara bağlanarak, 100 voltluk akımda 40 dk yürütüldü.

2.2.3.3. Görüntüleme ve Değerlendirme

Süre sonunda yürütülen jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki odacığa yerleştirilerek, UV ışığı altında fotoğraflanıp, değerlendirildi.

Değerlendirmede 16S rRNA primeri için 1400 bp, *cfu* primeri için 205 bp, *hasA* primeri için 600 bp, *hasB* ve *hasC* primerleri için 300 bp, *gapC* primeri için 200 bp, *lbp* primeri için 698 bp, *oppF* primeri için 419 bp, *pauA/pauB* primeri için 1200 bp, *skc* primeri için 800 bp ve *sua* primeri için 776 bp fragment uzunluğunda bant aralıkları arandı (Reinoso ve ark 2011).

3. BULGULAR

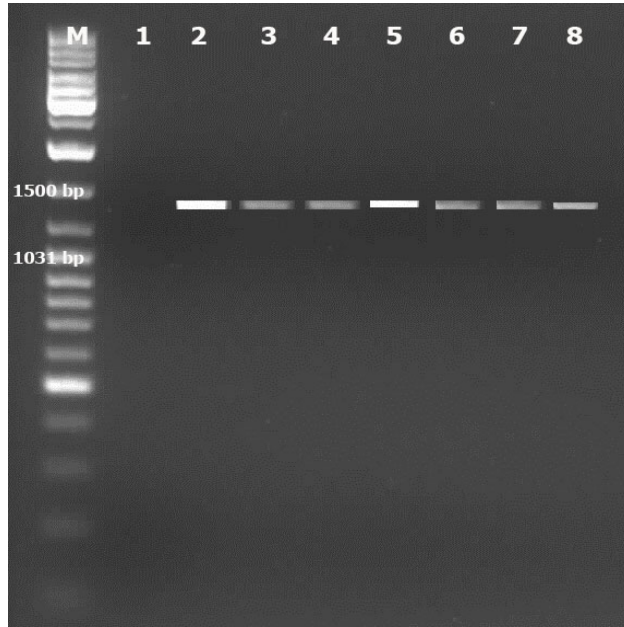
Bu çalışmada, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na getirilen mastitis problemi gösteren hayvanlara ait sütler ile çeşitli işletmelerden sağlanan toplam 200 adet süt örneği *S. uberis* yönünden incelendi. İzole edilen etkenlerin tür düzeyinde virulans-ilişkili gen dağılımının belirlenmesi amacıyla multipleks PCR metodu uygulandı.

3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

İncelenen 200 süt örneğinden biyokimyasal testler ile 35 (% 17.5)'inden *Streptococcus uberis* izolasyon ve identifikasyonu gerçekleştirildi.

3.2.PCR Bulguları

Polimeraz zincir reaksiyonu ile konvansiyonel olarak identifiye edilen *S. uberis* suşları incelendiğinde toplam 35 adet izolatın tamamında (% 100) 1400 bp fragment uzunluğunda 16S rRNA geni tespit edilmiştir (Resim 3.1).

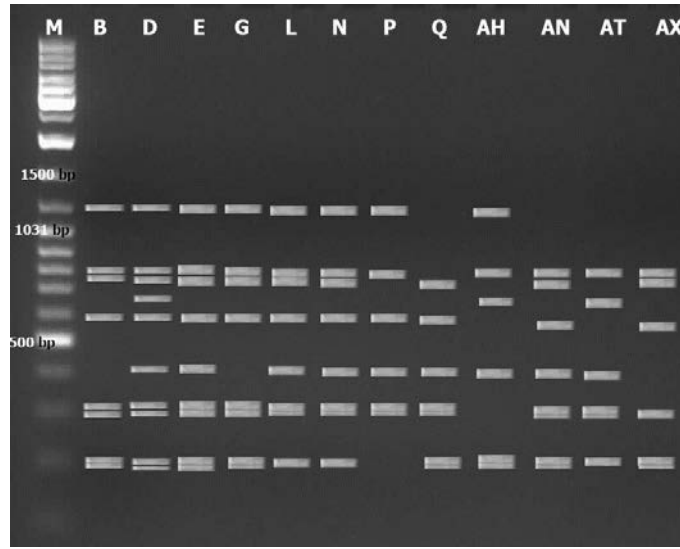


Resim 3.1. *S. uberis* spesifik 16S rRNA gen varlığı

M: Marker (100 bp), 1: Negatif Kontrol, 2: Pozitif Kontrol (*S. uberis* ATCC 700407), 3-8: *S. uberis* pozitif örnekler

Araştırmamızda izole edilen suşların % 68, 5'inin sırasıyla E, D, B, Q, AH, AN kalıplarında yer aldığı görülmektedir.

Virulans genleri tek olarak incelendiğinde, 32 (% 91) suştan *hasB*, 32 (% 91) suştan *gapC*, 32 (% 91) suştan *skc*, 30 (% 86) suştan *cfu*, 30 (% 86) suştan *hasC*, 30 (% 86) suştan *hasA*, 29 (% 83) suştan *sua*, 28 (% 80) suştan *oppF*, 25 (% 71) suştan *pauA*, 9 (% 26) suştan *Ibp* geni identifiye edilmiştir. *pauB* genine ise rastlanmamıştır (Resim 3.2).



Resim 3.2. *S. uberis* suşlarının virulans genlerinin dağılımı

M: Marker, B: *cfu*, *hasA*, *hasB*, *hasC*, *gapC*, *pauA/B*, *skc*, *sua* virulans kalıbı, D: *cfu*, *hasA*, *hasB*, *hasC*, *gapC*, *Ibp*, *oppF*, *pauA/B*, *skc*, *sua* virulans kalıbı, E: *cfu*, *hasA*, *hasB*, *hasC*, *gapC*, *oppF*, *pauA/B*, *skc*, *sua* virulans kalıbı, G: *cfu*, *hasA*, *hasB*, *hasC*, *gapC*, *pauA/B*, *skc*, *sua* virulans kalıbı, L: *hasA*, *hasB*, *hasC*, *gapC*, *oppF*, *pauA/B*, *skc*, *sua* virulans kalıbı, N: *hasA*, *hasB*, *hasC*, *gapC*, *oppF*, *pauA/B*, *skc*, *sua* virulans kalıbı, P: *hasA*, *hasB*, *hasC*, *oppF*, *pauA/B*, *skc* virulans kalıbı, Q: *cfu*, *hasA*, *hasB*, *hasC*, *gapC*, *oppF*, *sua* virulans kalıbı, AH: *cfu*, *gapC*, *Ibp*, *oppF*, *pauA/B*, *skc* virulans kalıbı, AN: *cfu*, *hasA*, *hasB*, *hasC*, *gapC*, *oppF*, *skc*, *sua* virulans kalıbı, AT: *cfu*, *hasB*, *hasC*, *Ibp*, *oppF*, *skc* virulans kalıbı, AX: *cfu*, *hasA*, *hasB*, *gapC*, *skc*, *sua* virulans kalıbı

S. uberis izolatlarının virulans ilişkili genleri incelendiğinde 3 (% 8,57) izolatın kalıp B (*cfu*, *hasA*, *hasB*, *hasC*, *gapC*, *pauA/B*, *skc*, *sua*)'de, 4 (% 11.4) izolatın kalıp D (*cfu*, *hasA*, *hasB*, *hasC*, *gapC*, *Ibp*, *oppF*, *pauA/B*, *skc*, *sua*)'de, 8 (% 22.8) izolatın kalıp E (*cfu*, *hasA*, *hasB*, *hasC*, *gapC*, *oppF*, *pauA/B*, *skc*, *sua*)'de, 2 (% 5.7) izolatın kalıp G (*cfu*, *hasA*, *hasB*, *hasC*, *gapC*, *pauA/B*, *skc*, *sua*)'de, 2 (% 5.7) izolatın kalıp L (*hasA*, *hasB*, *hasC*, *gapC*, *oppF*, *pauA/B*, *skc*, *sua*)'de, 2 (% 5.7) izolatın kalıp N (*hasA*, *hasB*, *hasC*, *gapC*, *oppF*, *pauA/B*, *skc*, *sua*)'de, 1 (% 2.85) izolatın kalıp P (*hasA*, *hasB*, *hasC*, *oppF*, *pauA/B*, *skc*)'de, 3 (% 8,57) izolatın kalıp Q (*cfu*, *hasA*, *hasB*, *hasC*, *gapC*, *oppF*, *sua*)'da,

3 (% 8,57) izolatın kalıp AH (*cfu*, *gapC*, *Ibp*, *oppF*, *pauA/B*, *skc*)’de, 3 (% 8,57) izolatın kalıp AN (*cfu*, *hasA*, *hasB*, *hasC*, *gapC*, *oppF*, *skc*, *sua*)’de, 2 (% 5.7) izolatın kalıp AT (*cfu*, *hasB*, *hasC*, *Ibp*, *oppF*, *skc*)’de, 2 (% 5.7) izolatın da kalıp AX (*cfu*, *hasA*, *hasB*, *gapC*, *skc*, *sua*)’de yer aldığı saptanmıştır (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. *S. uberis* suşlarının virulans kalıplarının dağılımı

İzolatlar	Virulans kalıpları											
	B	D	E	G	L	N	P	Q	AH	AN	AT	AX
<i>S. uberis</i> (n:35)	3	4	8	2	2	2	1	3	3	3	2	2

4.TARTIŞMA

Mastitis, süt yönlü yetiştiriciliğin en önemli problemidir. İneklerde mastitis, modern işletmeler de dahil olmak üzere tüm işletmelerde görülen bir enfeksiyondur ve önemli ekonomik kayıplara neden olur. İneklerde subklinik mastitislerde şekillenen ekonomik kayıpların, klinik mastitislere göre daha fazla olduğu ortaya konmuştur. Mastitis, verim ve ürün kayıpları ile tedavi masrafları birlikte değerlendirildiğinde süt yönlü yetiştiricilikte en fazla ekonomik kayba neden olan sorunların başında gelmektedir. Özellikle modern intansif yetiştiricilikte % 40'a varan oranlarda mastitis sıklığı gözlenebilmektedir. Tüm hijyenik uygulamalara rağmen, mastitis probleminin sürmesi, medikal koruma yollarını gündeme getirmiş ve aşuların da dahil olduğu kontrol programlarının geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. Ancak bir enfeksiyona karşı etkili bir mücadele yürütmek için, kesin etiyopatogenezisin ve bununla ilişkili epidemiyolojinin, bölge hatta sürü bazında bilinmesi gerekmektedir (Akan ve ark 2008).

Mastitis, son derece komplike bir etiyolojiye sahip olduğundan dolayı mevcut koşullarda eradikasyonu mümkün olmayan bir yetiştirme hastalığıdır. Ülkemizde mastitisin yol açtığı ekonomik kayıplarla ilgili herhangi bir istatistiki veriye kolayca ulaşılacak şekilde birlikte diğer ülkelerde yapılan çalışmalarda süt sığırcılık işletmelerinde endemik olarak seyreden hayvan hastalıkları arasında en fazla ekonomik kaybın mastitis, özellikle subklinik mastitis nedeniyle ortaya çıktığı bildirilmiştir. Türkiye'de subklinik mastitislerin büyük bir çoğunluğuna gram pozitif kok mikroorganizmaların yol açtığı yapılan araştırmalar sonucunda ortaya konmuştur (Arda ve ark 1981).

Bakteriyel nedenler başta olmak üzere çeşitli nedenlere bağlı olarak şekillenen meme dokusu yangısı mastitis olarak tanımlanır. Mastitis enfeksiyonuna bağlı olarak süt veriminde azalma ve buna bağlı oluşan çeşitli sonuçlara bağlı olarak bu enfeksiyon 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 streptokokal mastitislerin identifikasyon prosedüründe izlenecek işlemler oldukça önemlidir. Bu çalışmada, mastitisli sütlerden etken izolasyonu ve *S. uberis*

etkeninin mastitis etiolojisindeki rolleri ve izole edilen suşların virulans ilişkili genlerinin dağılımı moleküler yöntemler ile belirlenerek, izole edilen suşların tiplendirilmesi ve virulans genlerinin dağılımı ile ilgili bilgilerin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Sığırlarda mastitis bütün dünyada yaygın olarak görülmekte ve önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Mastitis patojenleri genelde taşınma esnasında kontajiyöz rota gösterenler ve memeyi çevresel rezervuarlardan infekte edenler olarak 2 gruba ayrılmaktadır. Birçok streptokokkal tür meme patojeni olarak izole edilenler arasındadır. *Streptococcus uberis* sığır mastitislerinde görülen önemli bir patojendir ve hem sağılan hem de sağılmayan ineklerde çoğunlukla subklinik ve klinik intramamiler enfeksiyonlarla ilişkilendirilmektedir. Bu türler mandıra çevresinde ubiquitöz oldukları için sıklıkla sorun oluşturmaktadır. Sağım hijyeninin artırılması kontajiyöz patojenler sonucu mastitis oluşumunu azaltmakla beraber, çevresel türlerde etkin bir sonuç meydana getirmemektedir (Leigh 2000).

Süt örneklerinden streptokokların izolasyon oranları farklılık göstermektedir. Piepers ve arkadaşları (2007), inceledikleri süt örneklerinin % 2,3'ünden *S. dysgalactiae*, % 0,3'ünden *S. uberis* ve *S. agalactiae* izole etmişler ve izolasyon oranının düşük olmasını çiftlikte yapılan düzenli bakteriyolojik yoklamaya dayandırmışlardır. Sampimon ve arkadaşları (2009) *S. uberis* prevalansını %1,1 bulurken, *S. dysgalactiae* prevalansını % 0,9 olarak bulmuş ve *S. agalactiae* etkenine rastlamamışlardır. Tenhagen ve arkadaşları (2009) inek sütlerinden izole ettikleri streptokokların % 0,1'ni *S. agalactiae*, % 3,4'nü *S. dysgalactiae*, % 2,3'nü *S. uberis* olarak tanımlamışlardır. Unnerstad ve arkadaşları (2009) inek sütlerinde *S. dysgalactiae* oranını % 15,6, *S. uberis* oranını % 11,1 bulmuşlar ancak *S. agalactiae* izole edememişlerdir. İngiltere'de yapılan bir çalışmada (Bradley ve ark 2007) sütlerdeki bakteriyolojik örnekleme sonucunda % 23,5 oranında *S. uberis* etkeni izole edilirken *S. agalactiae* ve *S. dysgalactiae* etkenlerine rastlanılmamıştır.

Bentley ve arkadaşları (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 arkadaşları (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 arkadaşları (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, Dakman (2000) inek mastitis olgularından % 12,8 oranında *Streptococcus* spp. izolasyonu yapmış ve bu streptokokların % 4,5’inin *S. agalactiae* olduğunu bildirmiştir. 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 tanımlanmış etmiştir.

Şahin ve arkadaşları ise (1997), sütlerden streptokok izolasyon oranını % 29,82 olarak bulmuş, ve bunların % 14,03 *S. agalactiae*, % 8,77 *S. dysgalactiae* ve % 7,02 *S. uberis* olarak tanımlanmış etmiştir.

Bu çalışmadaki elde edilen ortalama izolasyon oranı, daha önce Türkiye’de yapılan çalışmalardan elde edilen bulgularla paralel düzeyde bulunmuştur. Bu bulgu, ortalama streptokok izolasyon oranı üzerinden değerlendirildiğinde süt inekçiliği yapan işletmelerde mastitis kontrol programlarının uygulanmasındaki eksiklikten ortaya çıkabilmektedir. Diğer çalışmalarda elde edilen izolasyon oranları aynı düzeydedir.

Jayarao ve arkadaşları (1992) RFLP-PCR yönteminde 11 farklı enzim kullanarak tek enzim kesimleri ile mastitise neden olan streptokokları tür düzeyinde tanımlanmış etmişlerdir.

McDonald ve arkadaşları (2005) RFLP-PCR yönteminde ikili enzim kombinasyonlarını tek reaksiyonda kullanarak streptokokların tür düzeyinde tanımlanmalarını gerçekleştirmişlerdir.

Streptokokların tür düzeyinde tanımlanmaları için farklı moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler özellikle *S. uberis*’in tanımlanmasında kullanılmaktadır (Khan ve ark 2003).

Duarte ve arkadaşları (2005), RFLP-PCR yöntemini konvansiyonel metotlara göre tek reaksiyonda daha kısa sürede teşhis sağlanması bakımından etkin bir metot olarak belirlemişlerdir. Odierno ve arkadaşları (2006) RFLP-PCR metodu ile konvansiyonel testlerin uygulanması sonrasında RFLP-PCR yönteminin % 100 doğru tanımlanma oranı olduğunu bildirmişlerdir.

yaptığını, ancak konvansiyonel test sonuçlarının RFLP-PCR yöntemini tam olarak desteklemediğini bildirmişlerdir.

Jayarao ve Oliver (1994) RAPD-PCR değerlendirmesinde sonuçları klasik biyokimyasal sonuçlarla karşılaştırmış ve konvansiyonel yöntem ile ayıramayan yakın genotipli etkenleri bu yöntem ile ayırmıştır.

Duarte ve arkadaşları (2004), B grubu streptokoklar için uyguladıkları RAPD-PCR prosedüründe mikroorganizmaların tiplendirilmesinde bu yöntemin kullanılabilceğini ancak sonuçların yorumlanmasında ek tiplendirme metotlarının kullanılmasının güvenilirliği arttırdığını göstermişlerdir.

Chatellier ve arkadaşları (1997), *S. agalactiae* etkenleri için yaptıkları RAPD-PCR yönteminde 114 suşda 71 adet profil saptamışlar ve bu profil farklılıklarının işletmelerin buldukları coğrafik alanlardan kaynaklanabileceğini belirlemişlerdir.

Çalışmamızda identifiye edilen *S. uberis* etkenleri, ülkemizdeki yapılan diğer araştırmalara oranla aynı düzeyde bulunmuştur. Aydın bölgesinde söz konusu bakteriyel etkenin varlığı ortaya konmuştur ve düzenli koruma kontrol stratejileri sayesinde *S. uberis* kaynaklı mastitis vakalarının insidensinin düşürülmesi ve dolayısıyla ekonomik kayıpların asgari düzeye indirilmesinin mümkün olabileceği sonucuna varılmıştır.

Tez çalışmamızda bakteriyolojik kültür ve biyokimyasal identifikasyon yöntemiyle *Streptococcus uberis* olarak identifiye edilen 35 izolatın tamamı 16S rRNA genine spesifik primer kullanılarak yapılan PCR sonucunda yine *S. uberis* olarak identifiye edilmiştir. Kullanılan primerin yüksek bir spesifiteye sahip olması diğer gen bölgelerine göre daha stabil olan 16S rRNA geninden türetilmeleri, PCR ile identifikasyon işleminin güvenilir ve hızlı bir metot olarak rutin teşhis laboratuvarlarında uygulanabileceğini göstermiştir. Son zamanlarda yetiştirme hastalıkları arasında ekonomik olarak en büyük kayba yol açan mastitise neden olan etkenlerin teşhisi için zaman kaybı ve etkenlerin fenotipik özelliklerinin stabil olmaması nedeniyle sensitivite ve spesifitesi daha düşük olan konvansiyonel metotların yerine daha spesifik ve sensitivitesi yüksek olan ve kısa sürede sonuç veren moleküler metotların kullanılmasının daha faydalı olacağı önerilmektedir.

S. uberis süt sürülerinde büyük kayıplar meydana getiren önemli bir mastitis patojenidir ancak patogenezi ile ilişkili virulans faktörleri tam olarak anlaşılamamıştır (Oliver ve ark 1998). *S.uberis* etkeninde bulunan birçok varsayılan virulans-ilişkili gen tanımlanmıştır. Bunlar arasında hiyalüronik asit kapsülü tarafından sağlanan fagositoza direnç, *pauA*, *pauB*, ve *skc* gibi plazminojen aktivatör proteinleri, laktoferrin bağlayıcı proteinler, *sua* geni tarafından sağlanan epitelyum hücrelere tutunma ve invazyon, CAMP faktör, yüzey dehidrogenaz proteini *gapC* ve çözünümlü maddelerin taşınmasını sağlayarak sütte üremeye rol alan *opp* proteinleri yer almaktadır (Almeida ve ark 2006).

Hassan ve arkadaşlarının (2002) yaptığı çalışmada fenotipik olarak CAMP negatif bulunan *S. agalactiae* izolatlarında *cfb* geni yönünden PCR ile pozitiflik saptanmıştır. Bu durum *cfb* genine spesifik PCR analizinin, streptokokların biyokimyasal karakterizasyonunda önemli kriterlerden biri olarak kabul edilen CAMP reaksiyonundan doğabilecek yanlış negatiflik durumlarının önüne geçebileceğini göstermektedir.

Ülkemizde değişik bölgelerde yapılan araştırmalarda Ekin ve arkadaşları (1998) sığır sütlerinden elde edilen *S. agalactiae* izolatlarının fenotipik olarak % 73.3'ünde CAMP testi yönünden pozitiflik bildirmiştir. Bir başka çalışmada ise sığır orjinli streptokok izolatlarında % 26.3 oranında CAMP testi yönünden pozitiflik rapor edilmiştir (Ekin 2004). Bu test, genel olarak streptokokların identifikasyonlarında belirleyici bir test olarak kabul edilmesine rağmen daha önce yapılan çalışmalara göre CAMP testinden identifikasyon için etkin düzeyde faydalanılamayacağı görülmektedir. Reinoso ve arkadaşları (2011), yaptıkları çalışmada *cfu* geni dağılımını % 76.9 olarak saptamışlardır.

S. uberis etkenlerinde CAMP faktörünün kodlanmasında görevli olan *cfu* geni, çalışmamızda 30 (% 86) adet suştan identifiye edilmiştir. Bu sonuçlar, çalışmamızda elde edilen bulgular ile paralellik göstermiştir. Dolayısıyla *cfu* gen identifikasyonunun *S. uberis* tanısında hızlı ve güvenilir bir şekilde identifikasyon için kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Kapsül formasyonunda görevli olan *has* operonu, *hasA*, *hasB* ve *hasC* gen lokuslarından oluşmaktadır ve bu genler kapsül formasyonu için esansiyel olan genleri teşkil etmektedir (Ward ve ark 2001). *hasA*, *hasB* ve *hasC* gen identifikasyon oranları çalışmamızda sırasıyla % 83, % 91 ve % 86 olarak tespit edilmiştir. Reinoso ve arkadaşları (2011) ise *hasA* genini % 74.3, *hasB* genini % 66.6, *hasC* genini ise % 89.7 oranında

identifiye etmişlerdir. Elde edilen bulgulara göre streptokokal mastitis vakalarında kapsül formasyonunun enfeksiyonun gelişiminde önemli rolü olduğu görülmektedir.

oppF geni ise *S. uberis* etkenlerinin sütte üreyebilmeleri için önemli bir role sahiptir (Smith ve ark 2002). Çalışmamızda *oppF* gen identifikasyon oranı % 80 olarak saptanmıştır. Reinoso ve arkadaşları (2011) ise *oppF* genini % 64.1 oranında identifiye etmişlerdir. Zadoks ve arkadaşlarının (2005) yaptıkları çalışmada da bu genin tüm suşlardan izole edilemediği bildirilmiştir. Elde edilen bulgular, çalışmamızdaki veriler ile korelasyon göstermektedir.

Plazminojeni plazmine çeviren serin proteaz enzimleri, ekstrasellüler matriks proteinlerinin degradasyonu ve dokularda bakteriyel etkenlerin kolonize olabilmesi için gerekli komponentlerdir. Ayrıca sütte bulunan endojen plazminojenlerin aktivasyonu sonucu süt proteinleri hidrolize uğrar, böylece *S. uberis* üremesi için gerekli olan moleküller ortaya çıkmaktadır (Reinoso ve ark 2011). Bu enzimlerin sentezinde sorumlu olan *skc* geni, çalışmamızda % 91 oranında identifiye edilmiştir. Reinoso ve arkadaşları (2011) ise yaptıkları çalışmada *skc* genini % 63 oranında identifiye etmişlerdir.

Plazminojen aktivasyonu ve meme içi kolonizasyon ile ilişkili olarak saptanan *pauA* geni (Reinoso ve ark 2011) çalışmamızda % 71 oranında izole edilmiştir. Reinoso ve arkadaşları ise bu genin identifikasyon oranını % 61.5 olarak saptamıştır. *pauB* geni ise çalışmamızda identifiye edilmemiştir. Ward ve arkadaşlarının (2003) yaptıkları çalışmada ise sadece 1 adet *S. uberis* suşunda *pauB* geni identifiye edilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda *pauB* genlerinin ekspresyonunun meme içi enfeksiyonların oluşmasında rolü olmadığı ortaya konmuştur.

Subklinik sığır mastitis vakalarının yaygın etkeni olan *S. uberis* etkeninin tür düzeyinde ve virulans genlerinin genotipik ilişkilerini tespit tespit etmeye yönelik olarak multipleks PCR tabanlı moleküler analizlerin güvenilir bir şekilde kullanılabilceği saptanmıştır.

Ayrıca bu çalışmada *S. uberis*'in moleküler identifikasyonu için kullanılan *hasA*, *hasB* ve *hasC* gen operonunun PCR amplifikasyonu sonucunda identifikasyon oranlarındaki homojenitenin yakın oranda tespit edilmesi, bu gen bölgesinin sığır orjinli *S. uberis* etkenlerinin hızlı ve güvenilir şekilde identifikasyonuna olanak sağladığını

göstermiştir. Bu çalışmada kullanılan moleküler metotların subklinik mastitis vakalarında önemli bir sorun olarak karşımıza çıkan *S. uberis* suşları arasında virulent tiplerin saptanmasında yararlı olabileceği ve infeksiyonun patojenitesinin saha suşları bazında ortaya konulabilmesine katkıda bulunabileceği tespit edilmiştir.

Bu bulgular eşliğinde alınacak önemli kontrol ve stratejilerinin *S. uberis* kaynaklı mastitis insidensinde önemli derecede azalma sağlayacağı düşünülmektedir. Böylece konakçı çevre ve etken üçgeninde etkin olan çeşitli faktörler sebebiyle eradikasyonu veya kontrolünün oldukça zor olan *S. uberis* mastitislerine karşı uygulanacak etkili kontrol programları ile hem hayvan sağlığı açısından hem de halk sağlığı açısından önemli ilerlemeler sağlanabilecektir. Ayrıca *S. uberis* suşlarının ilave genotipik metotlar ve yeni virulans genlerinin tespitine yönelik metotların ortaya konulması ile birlikte detaylı genetik analiz çalışmalarına hız verilmesinin daha spesifik sonuçlar alınmasında ve bu etkenlerin epidemiyolojik özellikleri hakkında daha ayrıntılı bilgi edinilmesinde faydalı olacağı düşünülmektedir.

5. SONUÇ

Tez çalışmamızda incelenen 200 süt örneğinin 35 (% 17.5)'inden *Streptococcus uberis* izolasyonu gerçekleştirildi. Konvansiyonel metotlarla izole edilen 35 adet suşun tür düzeyinde moleküler identifikasyonu ve virulans ilişkili genlerin varlığı araştırılmıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonu ile konvansiyonel olarak identifiye edilen *S. uberis* suşları incelendiğinde toplam 35 adet izolatin tamamında (% 100) 1400 bp fragment aralığında 16S rRNA geni tespit edilmiştir. Araştırmamızda izole edilen suşların % 68.5'inin sırasıyla E, D, B, Q, AH, AN kalıplarında yer aldığı görülmüştür. Virulans genleri tek olarak incelendiğinde, 32 (% 91) suştan *hasB*, 32 (% 91) suştan *gapC*, 32 (% 91) suştan *skc*, 30 (% 86) suştan *cfu*, 30 (% 86) suştan *hasC*, 30 (% 86) suştan *hasA*, 29 (% 83) suştan *sua*, 28 (% 80) suştan *oppF*, 25 (% 71) *pauA*, 9 (% 26) suştan *Ibp* geni identifiye edilmiştir. *pauB* genine ise rastlanmamıştır.

Sonuç olarak mastitis vakalarından izole edilen *S. uberis* etkenlerinin virulans genlerinin dağılımı incelendiğinde etkenin patojenitesi açısından kapsül formasyonunu eksprese eden genlerin önemli role sahip olduğu, ayrıca serin proteaz enzimi sentezinde görevli olan genlerin de dikkate değer oranda dağılım gösterdiği ortaya konulmuştur. Ayrıca *S. uberis* suşlarının ilave genotipik metotlar ve yeni virulans genlerinin tespitine yönelik metotların ortaya konulması ile birlikte detaylı genetik analiz çalışmalarına hız verilmesinin daha spesifik sonuçlar alınmasında ve bu etkenlerin epidemiyolojik özellikleri hakkında daha ayrıntılı bilgi edinilmesinde faydalı olacağı düşünülmektedir.

ÖZET

Aydın İlinde Bulunan Sığır Çiftliklerinde *Streptococcus uberis* Kökenli Mastitislerin ve Virulans Genlerinin Multiplex Polimeraz Zincir Reaksiyonu (mPCR) ile Belirlenmesi

Bu çalışmada, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na getirilen toplam 200 adet süt örneği *Streptococcus uberis* yönünden incelendi. İzole edilen etkenlerin tür düzeyinde virulans ilişkili gen dağılımının belirlenmesi amacıyla multipleks PCR metodu uygulandı.

İncelenen 200 süt örneğinin 35 (%17.5)'inden *Streptococcus uberis* izolasyonu gerçekleştirildi.

Polimeraz zincir reaksiyonu ile konvansiyonel olarak tanımlanan *S. uberis* suşları incelendiğinde toplam 35 adet izolatın tamamında (% 100) 1400 bp fragment aralığında 16S rRNA geni tespit edilmiştir. Virulans genleri tek olarak incelendiğinde, 32 (% 91) suştan *hasB*, 32 (% 91) suştan *gapC*, 32 (% 91) suştan *skc*, 30 (% 86) suştan *cfu*, 30 (% 86) suştan *hasC*, 30 (% 86) suştan *hasA*, 29 (% 83) suştan *sua*, 28 (% 80) suştan *oppF*, 25 (% 71) *pauA*, 9 (% 26) suştan *Ibp* geni tanımlanmıştır. *pauB* genine ise rastlanmamıştır.

Sonuç olarak mastitis vakalarından izole edilen *S. uberis* etkenlerinin virulans genlerinin dağılımı incelendiğinde etkenin patojenitesi açısından kapsül formasyonunu eksprese eden genlerin önemli role sahip olduğu ortaya konulmuştur, ayrıca serin proteaz enzimi sentezinde görevli olan genlerin de dikkate değer oranda dağılım gösterdiği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Streptococcus uberis*, mastitis, virulans genleri, mPCR

SUMMARY

Detection of Virulence Genes in *Streptococcus uberis* Isolated from Bovine Mastitis in Aydın Province by Multiplex Polymerase Chain Reaction (mPCR)

In this study, a total of 200 milk samples were brought to Adnan Menderes University Faculty of Veterinary Medicine Department of Microbiology and examined with regard of *Streptococcus uberis*. The multiplex PCR method was applied in order to determine the prevalence of virulence associated genes.

35 (% 17.5) *Streptococcus uberis* isolation was made from the examined 200 milk samples.

The strains which were conventionally identified as *S. uberis* were examined with Polymerase Chain Reaction and in complete (% 100) 35 isolates, 16S rRNA gene was detected. While virulence associated genes are examined individually, *hasB* was identified out of 32 (91 %) strains, *gapC* was identified out of 32 (91 %) strains, *skc* was identified out of 32 (91 %) strains, *cfu* was identified out of 30 (86 %) strains, *hasC* was identified out of 30 (86 %) strains, *hasA* was identified out of 30 (86 %) strains, *sua* was identified out of 29 (83 %) strains, *oppF* was identified out of 28 (80 %) strains, *pauA* was identified out of 25 (71 %) strains, *Ibp* was identified out of 9 (26 %) strains. There was not made any *pauB* gene identification.

As a result, when the prevalence of virulence genes are examined which belongs to *S. uberis* agents that are isolated from mastitis cases, it is exhibited that the genes which expresses the capsule formation play an important role with regard to the pathogenicity of the agent, in addition, it is seen that the genes which employ the synthesis of serine protease enzymes shown significant prevalence.

Keywords: *Streptococcus uberis*, mastitis, virulence genes, mPCR

KAYNAKLAR

Abdulmajood A, Lämmler C. Amplification of 16S ribosomal RNA gene sequences for the identification of Streptococci of Lancefield group B. Research in Veterinary Science 1999.67: 159-162.

Akan M. *Staphylococcus* infeksiyonları, *Streptococcus* infeksiyonları, “Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar)”, Editörler, N Aydın ve J Paracıkoğlu, İlke Emek Yayınları, Ankara, 2006. 5-29.

Akan M, İzgür M, Cantekin Z, Tosun G, Çetin S. Mastitisli sütlerden izole edilen bakterilerin virulans faktörlerinin konvansiyel ve moleküler yöntemlerle saptanması. Ankara Üniversitesi Açık Erişim Sistemi 2008 Erişim [http://acikarsiv.ankara.edu.tr/browse/5329/, Erişim tarihi: 15.05.2014].

Almeida RA, Luther DA, Park HM, Oliver SP. Identification, isolation, and partial characterization of a novel *Streptococcus uberis* adhesion molecule (SUAM). Veterinary Microbiology 2006. 115: 183–191.

Arda M, İstanbulluoğlu E. Mastitislere sebep olan aerobik-mikroaerofilik anaerobik bakterilerin izolasyon ve identifikasyonları üzerinde çalışmalar. Doğa Bilim Dergisi 1981. 5: 125-130.

Baseggio N, Peter DM. Strain differentiation of isolates of streptococci from bovine mastitis by pulsed-field gel electrophoresis. Molecular and Cellular Probes Volume 11, Issue 5, 1997, 349–354.

Bentley RW, Leigh JA, Collins M. Development and use of species-specific oligonucleotide probes for differentiation of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis*. Journal of Clinical Microbiology 1993. 31: 57-60.

Blowey R, Edmondson P. Mastitis-Causes, Epidemiology and Control. In: Mastitis Control in Dairy Herds. Farming Press. Books, 1995. NY. USA. p.:27-35.

Bradley AJ, Leach KA, Breen JE, Green LE, Green MJ. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales, 2007. 24;160(8):253-7.

Chatellier S, Harel J, Brousseau R. Phylogenetic diversity of *Streptococcus suis* strains of various serotypes as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison. International Journal of Systematic Bacteriology, 1997.48: 581-589.

Colque JI, Devriese LA, Haesebrouck F. Streptococci and enterococci associated with tonsils of cattle. Letters in Applied Microbiology, 1993. 16: 72-74.

Dakman A. Mastitise neden olan B grubu streptokokların teşhisinde konvansiyonel testler ile hemaglutinasyon testinin karşılaştırılması. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Ankara, 2000.

Devriese LA, Homme 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. *Veterinary Microbiology*, 1999. 70: 87-94.

Dmitriev A, Suvorov A, Shen AD. Clinical diagnosis of group B streptococci by scpB gene based PCR. *Indian Journal of Medical Research*, 2004. 119 (Suppl): 233-236.

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. *Veterinary Microbiology*, 2007. 5: 27-41.

Duarte RS, Miranda OP, Bellei BC, Brito MAVP, Teixeira LM. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004. 42: 4214-4222.

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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005. 49:97-103.

Ekin İH. İneklerde Subklinik mastitis olgularından izole edilen Streptokokların serogruplandırılması ve çeşitli biyokimyasal özellikleri üzerine araştırmalar. YYÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Van, Yüksek Lisans Tezi, 1998.

Ekin İH. Sığır ve insanlardan izole edilen Grup B streptokokların serotiplendirilmesi ve çeşitli biyokimyasal özellikleri ile karşılaştırılması. YYÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Van, Doktora Tezi, 2004.

Forsman P, Tilsala-Timisjärvi A, AlatossavaT. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiology*, 1997. 143:3491-3500.

Fortin M, Messier S, Paré J, Higgins R. Identification of catalase-negative, non-beta-hemolytic, gram-positive cocci isolated from milk samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003. 41: 106-109.

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.

Hassan AA, Khan IU, Abdulmawjood A, Lämmle C. Evaluation of PCR methods for rapid identification and differentiation of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001. 39: 1618-1621.

Hassan AA, Akineden Ö, Lämmle C, Huber-Schlenstedt RB. Molecular characterization of phenotypically CAMP-negative *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 2002. 49:257-259.

Hassan AA, Abdulmawjood A, Yıldırım AÖ, Fink K, Lammler C, Schlenstedt R. Identification of streptococci isolated from various sources by determination of cfb gene and other CAMP-factor genes. *Canadian Journal of Microbiology*, 2003. 6:946-951.

Jayarao BM, Gillespie BE, Oliver SP. Application of randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting for species identification of bacteria isolated from bovine milk. *Journal of Food Protection*, 1990.59:615-620.

Jayarao BM, Oliver SP, Tagg JR, Matthews KR. Genotypic and phenotypic analysis of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mammary secretions. *Epidemiology and Infection*, 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 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. *Journal of Food Protection*, 1994. 57: 240-245.

Jiang M, Babiuk LA, Potter AA. Cloning, sequencing and expression of the CAMP factor gene of *Streptococcus uberis*. *Microbial Pathogenesis*, 1996.20:297–307.

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 Microbiology Letters*, 2004. 237: 57-64.

Khan IU, Hassan AA, Abdulmawjood A, Lämmler C, Wolter W, Zschöck M. Identification and epidemiological characterization of *S. uberis* isolated from bovine mastitis using conventional and molecular methods. *Journal of Veterinary Science*, 2003. 4: 213-24.

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*. *Infection and Immunity*, 1989. 57: 384-389.

Leigh JA. Vaccines against bovine mastitis due to *Streptococcus uberis* current status and future prospects. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2000.480: 307-311.

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. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000. 38: 71-78.

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

- Meiri-Bendek I, Lipkin E, Friedmann A, Leitner G, Saran A, Friedman S, Kashi YA. PCR-based method for the detection of *Streptococcus agalactiae* in milk. *Journal of Dairy Science*, 2002. 85(7):1717-23.
- Odierno L, Calvinho L. Conventional Identification of *Streptococcus uberis* Isolated from Bovine Mastitis in Argentinean Dairy Herds. *Journal of Dairy Science*, 2006. 89(10): 3886–3890.
- 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 Microbiology Letters*, 1998. 160: 69-73.
- Phuektes P, Browning GF, Anderson G, Mansell PD. Multiplex PCR as a mastitis screening test for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* in bulk milk samples. *Journal of Dairy Research*, 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. *Journal of Dairy Science*, 2001. 84: 1140-1148.
- Piepers S, De Meulemeester L, de Kruif A, Opsomer G, Barkema HW. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. *Journal of Dairy Research*, 2007. 74 478-483.
- Pitkala A, Koort J, Björkroth J. Identification and antimicrobial resistance of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* isolated from bovine milk samples. *Journal of Dairy Science*, 2008. 91: 4075-4081.
- Reinoso EB, Lasagno MC, Dieser SA, Liliana M. Distribution of virulence-associated genes in *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis. *FEMS Microbiology Letters*, 2011. 318, 183–188.
- Riekerink RGM, Barkema OHW, Kelton DF, Scholl D. Incidence rate of clinical mastitis on dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 2008. 91: 1366-1377.
- Riffon RK, Sayasith H, Khalil P, Dubreuil M. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001.39: 2584-2589.
- Sampimon O, Barkema HW, Berends I, Sol J, Lam T. Prevalence of intramammary infection in Dutch dairy herds. *Journal of Dairy Research*. 2009.76: 129-136.
- Smith AJ, Kitt AJ, Ward PN, Leigh JA. Isolation and characterization of a mutant strain of *Streptococcus uberis*, which fails to utilize a plasmin derived beta-casein peptide for the acquisition of methionine. *Journal of Applied Microbiology*, 2002. 93: 631–639.

Sukhanand S, Dogam B, Ayodele MO, Zadoks RN, Graver MPJ, Dumas NB, Schukken, YH, Boor KJ, Wiedmann M. Molecular subtyping and characterization of bovine and human *Streptococcus agalactiae* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005. 43, 1177–1186.

Şahin M, Çolak A, Otlı 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 Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1997. 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. *Journal of Bacteriology*, 2003. 185:5210–5219.

Tenhagen B, Hansen I, Reinecke A, Heuwieser W. Prevalence of pathogens in milk samples of dairy cows with clinical mastitis and in heifers at first parturition. *Journal of Dairy Research*, 2009. 76,179–187.

Ward P, Field T, Ditcham W, Maguin E, Leigh J. Identification and disruption of two discrete loci encoding hyaluronic acid capsule biosynthesis genes hasA, has B, and has C in *Streptococcus uberis*. *Infection and Immunity*, 2001. 69: 392–399.

Ward PN, Field TR, Rapier CD, Leigh JA. The activation of bovine plasminogen by PauA is not required for virulence of *Streptococcus uberis*. *Infection and Immunity*, 2003. 71:7193–7196.

Wibawan WT, Lammler C, SeleimR, Pasaribu FN. Haemagglutinating adhesin of group B streptococci isolated from cases of bovine mastitis mediates adherence to HeLa cells. *Journal of General Microbiology*, 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. *Journal of Dairy Science*, 2002. 85:2149-2154.

Williams AM, Collins MD. DNA fingerprinting of *Streptococcus uberis* based on polymorphism of DNA encoding rRNA. *Letters in Applied Microbiology*, 1990. 12: 23-28.

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. p:683-684.

Zadoks R, Gillespie BE, Barkema HW, Sampimon OC, Oliver SP, Schukken YH. Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. *Epidemiology and Infection*, 2003.130:335-349.

Zadoks R. Environmental Mastitis. Part 1. *Nodpa News*, 2004.4:13-14.

Zadoks RN, Schukken HY, Wiedmann M. Multilocus sequence typing of *Streptococcus uberis* provides sensitive and epidemiologically relevant subtype information and reveals positive selection in the virulence gene pauA. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005. 43: 2407–2417.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Aydın'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Aydın'da, lise öğrenimini Bursa A.O.S. Fen Lisesinde tamamladı. 1998 yılında Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümünü kazandı. 1 yıl Hacettepe Üniversitesi Yabancı Diller Y.O.'nda İngilizce eğitimi aldıktan sonra 2004 yılında Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümünden mezun oldu. 2004 yılından itibaren T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığında Gıda Kontrolörü olarak çalışmaktadır. 2005 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimime başladı. 2008-2009 Bahar yarıyılında Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora öğrenimime başladı.

İyi derecede İngilizce bilmektedir. Evli ve bir çocuk babasıdır.

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamda ilgi, yardım ve hoőgörösünü eksik etmeyen ADÜ Veteriner Fakóltesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Baőkanı Prof. Dr. Osman KAYA'ya ve araőtırmanın her aşamasında yardımlarını ve desteklerini gördüğüm danışmanım Prof. Dr. Dr. Şükrü KIRKAN'a, laboratuvar çalışmaları aőamalarında desteklerini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Uğur PARIN'a ve Dr. Saadet GÜRPINAR'a, Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine, tez çalıőmamda hep yanımda olan aileme sonsuz teşekkür ederim.