

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİK-YL-2011-002

**SİĞİR MASTİTİSLERİNDEN *STREPTOCOCCUS*
AGALACTIAE, *STREPTOCOCCUS DYSGALACTIAE* VE
STREPTOCOCCUS UBERIS'İN KÜLTÜR VE MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE TANISI**

Vet. Hek. Barış ÖZPULAT

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Serap SAVAŞAN

AYDIN-2011

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

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Vet. Hek. Barış ÖZPULAT tarafından hazırlanan “SIĞIR MASTİTİSLERİNDEN *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*, *STREPTOCOCCUS DYSGALACTIAE* VE *STREPTOCOCCUS UBERIS*’İN KÜLTÜR VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANISI” başlıklı tez, 13/09/2011 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi :

İmzası:

1- Prof. Dr. Osman KAYA

ADÜ, Veteriner Fakültesi

2- Doç. Dr. Filiz KÖK

ADÜ, Veteriner Fakültesi

3- Yrd. Doç. Dr. Serap SAVAŞAN

ADÜ, Veteriner Fakültesi

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

Doç. Dr. Muharrem BALKAYA
Enstitü Müdürü

Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü 09100- AYDIN
Santral : (256) 218 20 00 Direkt Telefon : 218 20 44 *Fax : (256) 218 20 44

ÖNSÖZ

Mastitis süt veriminde ve kalitesinde azalma ile seyreden, veteriner hekim, laboratuvar ve ilaç giderleri gibi ekonomik giderleri olan bir enfeksiyondur. 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. Streptokok 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 hem çevresel hem de kontagiyöz streptokok etkenlerinin birlikte 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 metod hızlı ve güvenilir bir teşhis için tercih edilmektedir. Bu metodlar streptokok etkenlerinin cins ve tür düzeyinde teşhisi yanında, tür içerisindeki genetik yakınlıkları, moleküler epidemiyolojileri, direnç ve virulens mekanizmaları gibi pek çok özelliğin belirlenmesini sağlamaktadır.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	iv
RESİMLER DİZİNİ	v
1. GİRİŞ	1
2. GEREÇ VE YÖNTEM	16
2.1. Gereç	16
2.1.1. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar	16
2.1.2. İzolasyon ve İdentifikasyon	16
2.1.2.1. Eskulin Testi	16
2.1.2.2. CAMP Testi	17
2.1.3. PCR’da Kullanılan Buffer, Solüsyon, Primer ve Enzimler	17
2.1.4. PCR’da Kullanılan Alet ve Ekipmanlar	17
2.2. Yöntem	17
2.2.1. İzolasyon ve İdentifikasyon	17
2.2.2. DNA Eldesi (Ekstraksiyon)	18
3. BULGULAR	19
3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	19
3.2 PCR Bulguları	19
4. TARTIŞMA	22
5. SONUÇ	27
ÖZET	28
SUMMARY	29
KAYNAKLAR	30
ÖZGEÇMİŞ	36
TEŞEKKÜR	37

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	<i>S. agalactiae</i> , <i>S. dysgalactiae</i> ve <i>S. uberis</i> etkenlerinin konvansiyonel ayırımı	13
Çizelge 2.1.	Multipleks PCR’da kullanılacak oligonükleotid dizileri	18
Çizelge 3.1.	Elde edilen Streptokok suşlarının biyokimyasal aktiviteleri	19

RESİMLER

Resim 3.1.	<i>S. uberis</i> jel elektroforezi	20
Resim 3.2.	<i>S. dysgalactiae</i> jel elektroforezi	20
Resim 3.3.	<i>S. agalactiae</i> jel elektroforezi	21

1. GİRİŞ

Mastitis tüm dünyada özellikle süt sığırcılık işletmelerinde sıklıkla görülen ve süt endüstrisinde büyük ekonomik kayıplara sebep olan meme içi bir enfeksiyondur (Jain, 1979; Schalm ve ark., 1971). Genel anlamda mastitis, meme bezlerinin travmatik etkilere ve meme içerisine çoğunlukla ekzojen veya endojen olarak giren mikroorganizmalara karşı reaksiyon göstermesidir (Blood ve ark., 1979). Meme bezinin yangısal durumuna bağlı olarak oluşan patolojik değişikliklerin sonucunda sütte bir takım fiziksel ve kimyasal değişimler de meydana gelir (Tmanova, 2003). Memeli hayvanların hepsinde görülmekle beraber süt inekleri için ayrı bir önem taşımaktadır. Çünkü süt, özellikle insan beslenmesindeki en önemli gıda kaynaklarından birisi olarak bilinmektedir ve süütün başlıca kaynağı olarak ilk sırada süt ineklerinin gelmesi, sığır mastitisini diğer hayvanlarda görülen mastitislere kıyasla daha fazla önemli kılmaktadır (Batu, 1991). Mastitis toplam sığır hastalıklarının % 26'sını oluşturmaktadır ve bunun neticesinde ortaya çıkan kaybın diğer infertilite ve reproduktif hastalıklardan yaklaşık iki kat fazla olduğu bildirilmiştir (De Graves ve Fetrow, 1993; Philpot, 1984).

Birçok ülkede süt işletmelerinde yapılan gözlemler göstermiştir ki inekler arasında mastitisin prevalansı % 50, bir meme lobundaki enfeksiyon oranı ise % 25 civarındadır (Blood ve ark., 1979). Mastitis kontrol programlarının uygulanması ve bu programların devamlılığının sağlanması, özellikle kapasiteleri büyük olan süt işletmelerinde, ekonomik verimliliğin en önemli göstergesidir. Ancak ülkemizde özellikle süt yönlü yetiştiricilikte işletme kapasitelerinin küçük olması ve henüz verimlilik merkezli mastitis kontrol programlarının oluşturulamaması nedeniyle, süt üretiminde büyük ekonomik kayıplar ortaya çıkmaktadır (Atasever ve Erdem, 2008; Topçu, 2008). Sağlıklı süt, sağlıklı hayvanlardan elde edildiği için, hayvan sağlığını korumak ve mastitis olgularını erken teşhis etmek temel hedeftir. Süt endüstrisinde mastitis nedenli ekonomik kayıplar, süt kalitesinin ve süt veriminin azalması, buna bağlı olarak da ilaç ve veteriner hizmet kullanımının artması ve yem giderlerinin artışı sonucunda ortaya çıkmaktadır (Taponen ve Myllys, 1995). Aynı zamanda, enfeksiyonun tedavisi için kullanılan antibiyotiklerin sütte kalıntı bırakması, bilinçsiz olarak ilaç kullanımına bağlı gelişen antibiyotik dirençli bakteriler, tedavi olanaklarının sınırlandırılması gibi olumsuz etkiler oluşmaktadır (Meiri-Bendek ve ark., 2002; Ferguson ve ark., 2007). Düzenli ve bilinçli kontrol programlarının

uygulanması, klinik mastitis olgularının azaltılmasını ve subklinik infeksiyonların da erken teşhis edilmesini sağlamaktadır (Cremonesi ve ark., 2006; Østerås ve ark., 2006).

Mastitise neden olan etkenler arasında bakteriler önemli bir yere sahiptir (Phuektes ve ark., 2001a; Chotar ve ark., 2006; Unnerstad ve ark., 2009). Mastitis olgularından birçok etken izole ve identifiye edilmiştir. Bu etkenlerin büyük bir kısmını bakteriler oluşturmaktadır. İneklerde mastitis olgularının %95'inden *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* ve *Escherichia coli* izole edilse de 130'dan fazla mikroorganizma mastitis oluşturduğu bildirilmiştir (Hillerton 2005). Memelerdeki anatomik bozukluklar ve travmalar da infeksiyonun yerleşimini ve oluşumunu hızlandırmaktadır (Blowey ve Edmondson,1995b).

Anatomik bozukluklara bağlı mastitis olgularında; memelerin doğmasal olarak bozuk anatomik yapısı, hayvanın yaşı, ırkı gibi etkiler, süt veriminin fazla olması, laktasyonun dönemi (aktif involusyon, peripartum periyot, erken laktasyon vb.), beslenme durumları (Se ve Vit. E eksiklikleri), süt ineklerini infeksiyona duyarlı kılmaktadır (Blowey ve Edmondson, 1995b; Tmanova, 2003).

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 (Botts ve ark. 1979). 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 bulaşırlar). 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 (Sampimon ve ark., 2009).

Çevresel patojenlerin infeksiyon oluşturmaları hayvanlar arasında sağım esnasında ya da sağım aralarında çevre teması ile meydana gelir (Oliver ve ark, 1997). 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'sin de klinik semptomlar kendini gösterir. Klinik mastitislerin sonucuna bağlı olarak da süt üretiminde, reproduktif aktivitede azalma ve işletme giderlerinin artışı ile ekonomik kayıp şekillenir (Tmanova, 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 (Blowey ve Edmondson, 1995b; Tmanova, 2003). 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 (Tmanova, 2003).

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 immün 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 (Sandholm, 1995; Tmanova, 2003). 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, 1995a). 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 (Taponen ve Myllys, 1995).

Mastitis infeksiyonlarının gelişebilmesi için, mikroorganizmaların meme kanalına girmesi, infeksiyonun başlaması ve yangısal reaksiyonların oluşması gerekmektedir (Vehmas ve Sandholm, 1995; Akan, 2006).

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 (Philpot ve Nickerson, 2000).

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 bildirimi yapılmıştır. Streptokokların sınıflandırılmasında en önemli değişimler 1906 yılında Andrewes-Horder, 1919 yılında Orla-Jensen, 1933 yılında Lancefield ve 1937 yılında ise Sherman tarafından ortaya konmuştur (Sherman, 1937; Khan, 2002; Facklam, 2002). Streptokoklar 1918 yılında Rebecca Lancefield tarafından hemolitik özellikleri göz önüne alınarak *Streptococcus haemolyticus* olarak isimlendirilmiştir. Araştırıcı etkenlerin karbonhidrat antijenlerini spesifik serum kullanarak tiplendirmiş ve streptokoklar gruplara ayrılmıştır (Lancefield, 1933). Streptokoklar Gram pozitif, yuvarlak, zincir şeklinde diziler yapan, hareketsiz, sporsuz, kapsüllü, insan ve hayvanlarda lokal ve genel bir çok hastalığa neden olan ve onların mukoz membranlarında da normal olarak yaşayabilen bakterilerdir. Mikroskopik bakıda sıvı besiyerlerinde uzun zincirler halinde görülürken, katı besiyerlerinde diplokok şeklinde görülebilirler. Zenginleştirilmiş besiyerlerinde iyi üreme gösterirler (Akan, 2006). Streptokoklar Bergey's Manual (Garritty, 2001) tarafından Laktobasiller sınıfı altında ayrı bir aile olarak incelenmiştir.

S. agalactiae, *S. dysgalactiae* ve *S. uberis* etkenleri süt sığırıcılığında çok yaygın olarak rastlanan ve ekonomik kayıpların  ekillendiğı mastitis infeksiyonlarında izole edilmektedir. Mastitis kontrol programları, süt sağımindaki gelişmeler, sağım sonrası hijyen uygulamaları, yaygın olarak kullanılan antibiyotik tedavileriyle *S. agalactiae* ve *S. dysgalactiae*'nin neden olduğı mastitis infeksiyonlarında azalma görülmüş ancak *S. uberis*'in neden olduğı infeksiyonlarda belirgin düzeyde bir azalmaya rastlanmamıştır (Sampimon ve ark., 2009).

Mastitise neden olan etkenlerin bulaşıcı ve çevresel olarak gruplandırılmasıyla ayırım yapılarak etkenlerin patogenezi bu gruplama ile izlenmiştir. Bulaşıcı mastitis etkenlerinin meme bezinde yaşıyarak çoğalması ve sağım esnasında hayvandan hayvana geçişi şekillenmiştir. Çevresel patojenlerin ise özellikle işletmelerin fazla ve işletme içi hayvan popülasyonunun yoğun olduğı yerlerde infeksiyon olu turduğı g r lm  tur. Mastitiste en önemli ikinci patojen olarak kabul edilen etken ise *S. agalactiae*'dir. Mastitis ile ilgili yapılan etiyolojik çalışmalarda, vakaların %13-34' nden *Streptococcus* cinsine bağı bakterilerin izole edildiğı bildirilmektedir. Bunlar arasında özellikle *S. agalactiae*'lar önemli bir yer tutmaktadır ( etinkaya 2011). İnfeksiyona neden olan streptokokkal etkenlerin durumuna bakıldığında *S. agalactiae* dışındaki streptokoklar çevresel patojenler olarak gruplandırılmış, *S. agalactiae* ise bulaşıcı bir patojen olarak nitelendirilmiştir (Oliver ve ark.,1997). Mastitisi oluşturan çevresel streptokoklar arasında *S. dysgalactiae*, *S. uberis* bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda, çevresel patojen etkenler arasında *S. uberis* ve *S. dysgalactiae* sık olarak izole edilmektedir (Oliver, 1988; Todhunter ve ark., 1995). Bu etkenlerin yaygın olmasına karşın patogenezlerinde, virulens faktörleri ile ilişkileri net olarak anlaşılamadığı ve etkenlerin heterojen özellikler göstermesi nedeniyle oluşturulmak istenen kontrol stratejileri de başarısız olmuştur (Oliver ve ark.,1997).

Mastitis infeksiyonlarına ilişkin yapılan prevalans çalışmalarında farklı izolasyon oranları elde edilmiştir. Piepers ve ark. (2007) 178.668 adet süt örneğinde yaptıkları bakteriyolojik incelemede %2,3 oranında *S. dysgalactiae*, %0,3 oranında ise *S. agalactiae* izole etmişlerdir.

Dakman (2000) yaptığı çalışmada, %12,8 oranında *Streptococcus* spp. izolasyonu gerçekleştirmiş ve %4,5 oranında *S. agalactiae* etkeni identifiye etmiştir. Karahan (2005) ise, %24,3 oranında streptokok izolasyonu gerçekleştirmiş ve bu streptokoklar içerisinde

%10,4 oranında *S. agalactiae* identifiye ederken, %13,9 oranında diğer streptokok türlerini identifiye etmiştir.

Arda ve İstanbulluoğlu, (1981) mastitis etkenlerinin izolasyon ve identifikasyonlarına yönelik bir çalışmada %8,7 oranında *S. agalactiae* izole ederken, %4,6 oranında *S. uberis* izolasyonu gerçekleştirmiştir.

Ulusoy ve ark. (1985) 63 adet süt örneğinde %28,6 oranında *S. dysgalactiae* ve %15,6 oranında *S. agalactiae* izolasyonu gerçekleştirmişler, *S. uberis* izole edememişlerdir.

Aydın ve Baysal, (1995) yaptıkları mastitis mücadele programı kapsamında 12505 adet süt örneğine yaptıkları mikrobiyolojik incelemede, 268 adet (%2) streptokok izole etmişlerdir. İzole edilen streptokokların 210 adedi *S. agalactiae*, 47 adeti *S. uberis* ve 11 adeti *S. dysgalactiae* olarak identifiye edilmiştir.

Tel ve ark. (2009) Urfa yöresinde yaptıkları mastitis taramasında %8,9 oranında streptokok izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. İahin ve ark. (1997) ise mastitisli sütlerde streptokok izolasyon oranını %29,82 olarak bulmuşlar ve bunların, %14,03'nü *S. agalactiae*, %8,77'sini *S. dysgalactiae* ve %7,02'sini *S. uberis* olarak belirlemişlerdir.

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

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

Bulaşıcı ve çevresel streptokokkal etkenlerin neden olduğu mastitis infeksiyonları için yapılan çalışmalarda yıllara ve işletme tiplerine göre de farklı sonuçlara ulaşılmıştır. Unnerstad ve ark. (2009) *S. dysgalactiae* oranını %15,6, *S. uberis* oranını %11,1 bulmuşlar, *S. agalactiae* izole edememişlerdir. Araştırmacılar *S. uberis* türlerinin kum altılık kullanan işletmelerde, talaş kullanan işletmelere göre daha sık infeksiyon oluşturduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca *S. dysgalactiae*'nin daha çok *Actinomyces pyogenes* ile birlikte yaz mastitislerine neden olduğunu bildirmişlerdir.

Sicilya’da yapılan bir çalışmada ise, süttten yapılan izolasyonda %11,1 oranında streptokoklara rastlanırken, bu oranın %2,3’lik kısmını *S. agalactiae*’nın oluşturduğu gözlenmiştir (Ferguson ve ark., 2007).

Østeras ve ark. (2006) *S. dysgalactiae* etkenlerinin daha çok kış aylarında ve ahırda yapılan yetiştiricilikte, *S. uberis* etkenlerinin ise yaz mevsiminde ve daha çok hayvanların meraya çıktıkları dönemde infeksiyon oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Tenhagen ve ark. (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.

Sampimon ve ark. (2009) ise, *S. uberis* prevalansını %1,1 bulurken, *S. dysgalactiae* prevalansını %0,9 olarak bulmuş ve *S. agalactiae* etkenine rastlamamışlardır.

Yeni Zelanda’da klinik mastitislerin %15,2’sinde *S. uberis*, %0,6’sında *S. dysgalactiae*, %0,3’ünde ise *S. agalactiae* izole edilmiştir (Petrovski ve ark.,2009), 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).

S. agalactiae, sıvı kültürlerde zincir şeklinde üreme gösteren etken, Streptococcacea 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 (Tmanova, 2003). Kronikleşen ve zamanla memelerin kör olması ile sonuçlanan çok bulaşıcı mastitise neden olmaktadır (Jain, 1979; Philpot ve Nickerson, 2000; Tmanova 2003).

S. agalactiae, yalnızca ineklerin memesinde yaşayabilir ve çoğalabilir. Çevrede ideal koşullarda bile birkaç günden fazla canlılığını sürdüremez. *S. agalactiae*'nın en önemli kaynağı bu etken ile infekte meme veya memelerdir (Baştan 2010).

S. agalactiae meme kanalına kolonize olarak, meme epitel hücrelerine tutunur (Blowey ve Edmondson, 1995a; Karahan, 2005). 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, ampicilin, sefalosporin, eritromisin, trimetoprim-sülfonamid gibi antibiyotiklere karşı duyarlıdır (Pyörola, 1995).

Genel olarak subklinik seyir gösteren *S. agalactiae* mastitislerinde, etkenin daha kolay ve hızlı bir şekilde teşhis edilmesi için sütün laboratuvar ortamında incelenmesi gerekmektedir (Meiri-Bendek ve ark., 2002). PCR temelli teknikler, teşhisin hızlı ve doğru bir şekilde gerçekleşmesinde yarar sağlamaktadır. Meiri-Bendek ve ark. (2002) geliştirdikleri spesifik primerler ile PCR tekniklerinin *S. agalactiae*'nin teşhisinde daha güvenilir olduğunu bildirmişlerdir.

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

Chotar ve ark. (2006) *S. agalactiae* etkenlerini moleküler olarak teşhis etmek için yüzey immunojenik proteinini kodlayan *sip* genini kullanmışlar, farklı bölgelerden izole edilen *S. agalactiae* suşlarında bu bölgeye spesifik primerler ile yaptıkları PCR sonucunda etkenlerin tamamını identifiye ettiklerini bildirmişlerdir.

S. agalactiae etkenlerinin insan ve sığırlarda farklı yapıya sahip olduğunu, serotiplendirme ve ribotiplendirme ile sadece 2 izolatın insan izolatlarından ayıramadığını göstermiş, nadiren de olsa insan izolatlarının sığırlara geçtiğini bildirmişlerdir (Doğan ve ark. 2005).

S. agalactiae nedenli mastitislerin tedavisinde penisilin grubu antibiyotiklerin kullanımı ile infeksiyon seyri iyileştirilebilir (Baştan 2010). 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 (Pyörola, 1995; Blowey ve Edmondson, 1995a).

S. dysgalactiae'nın yol açtığı mastitislerde klinik semptomlar diğer streptokokların neden olduğu meme içi enfeksiyonlara oranla daha ciddi olabilmektedir (Baştan, 2010). 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 (Blowey ve Edmondson, 1995a). Çevresel bir etken olarak tanımlanmasına karşın yarı bulaşıcı yarı çevresel bir etken olarak bulunur (Oliver, 1997). En sık olarak meme derisinde, özellikle sağım aletlerinin hijyenik olarak kullanılmadığı durumlarda sağım aletleri yüzeylerinde, meme yaralarında, kesiklerde ve çiçek yaralarından izole edilmiştir. Meme bezleri infeksiyonun taşınmasında daha az öneme sahiptir. Etken aynı zamanda tonsillerde bulunduğu için memelerin yalanması esnasında da geçiş mümkün. Bu durum *S. dysgalactiae*'nın düve mastitislerinde ve kuru dönemdeki hayvanlarda görülme nedenini açıklamaktadır (Blowey ve Edmondson, 1995a). *S. dysgalactiae* nedenli mastitislerin patogenezi ve salgıladıkları toksinler *S. agalactiae*'nın neden olduğu mastitislerdekine benzemektedir. Fakat, bu bakterinin meme epiteline tutunması, *S. agalactiae*'dan daha zayıftır (Baştan, 2010). Meme irritasyonuna neden olan uçan haşere, soğuk hava etkisi gibi durumlarda memelerin yalanması klinik belirtiler oluşuncaya kadar etkenin özellikle meme kanalına kolonize olmasına neden olur (Blowey ve Edmondson, 1995a). Lancefield serogruplandırmasında C grubunda yer alan etken taksonomik çalışmalarda grup L içerisinde *S. equisimilis*, insan infeksiyonlarında ise G grubu içerisinde *S. dysgalactiae* olarak isimlendirilmiştir. Biyokimyasal testler ve hücre duvarı yapısının değerlendirilmesi temel alınarak, hayvan infeksiyonlarında serogrup C ve L ye ait olduğu bulunarak *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* olarak tiplendirilmiştir. İnsan infeksiyonlarında C ve G serogruplarına ait olan etken *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* olarak tanımlanmıştır. L grubu streptokokların, *S. equisimilis*'in ve G grubun da yer alan insan infeksiyonlarından sorumlu streptokok türlerinin sığır meme bezlerine yerleşerek infeksiyon yaptığına nadiren rastlanmıştır. *S. dysgalactiae*'nın sığırların tonsillerinde, ağız ve vagina mukozasında oldukça fazla

miktarda bulunduğu ve kuru dönemde herhangi bir *S. dysgalactiae* infeksiyonu bulunmadığı halde laktasyon döneminde infeksiyonun görülmesinin, etkenin çevresel bulaşma yolunu daha çok kullandığını göstermiştir (Colque ve ark., 1993; Oliver ve ark., 1997).

Hassan ve ark. (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.

S. uberis'in mastitis infeksiyonu ile ilişkisi ilk olarak 1932 yılında Diernhofer tarafından ortaya konmuştur (Oliver ve ark.,1997). Bu çalışmalara göre enterokok ailesine ait olduğu düşünülen *S. uberis*'in *Enterococcus* ailesine ait olmadığı, piyojenik streptokok ailesine benzerlikler gösterdiği görülmüştür. Roguinsky 1972 yılında *S. uberis*'in bazı fizyolojik özelliklerini aynı habitatta bulunan diğer 7 tür ile karşılaştırmış ve *S. uberis*'in iyi tanımlanmış ayrı bir tür olduğunu bulmuştur. Facklam 1977 yılında Streptokok ailesini *S. pyogenes*, *S. viridans*, *S. lactis* ve enterokoklar ailesi olarak 4 büyük gruba ayırmıştır. *S. uberis* bu çalışma da viridans grup içerisine girmiştir. Her iki çalışmada da biyokimyasal testler ve serolojik yöntemler kullanılmıştır. *S. uberis*'in oluşturduğu mastitislerde ise kronik hafif seyirli, sütte hafif değişikliklere neden olan bir infeksiyon şekli gözlenmektedir (Akan, 2006). *S. uberis* nedenli mastitislerin diğer streptokok nedenli mastitislerden farkı, etkenin meme yüzeylerinde ve ineğin diğer vücut bölgelerinde bulunabilme özelliğidir (Colque ve ark., 1993). *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. Bu yüzden *S. uberis* nedenli mastitis olgularının büyük oranda nedeni, teat dipping ve kuru dönem antibiyotik tedavisinin yetersiz ve uygun olmayışı olarak bildirilmiştir (Khan, 2002).

S. uberis etkenleri kronik mastitise neden olmakla birlikte bulaşıcı etkenlerle de yakın ilişkide olabileceği tahmin edilmektedir. *S. uberis* etkenleri süt işletmesi, ahır, altlık ve su yalakları, meralar ve dışkı ile kontamine olan her yerde sık olarak bulunur. Meme bezlerinin buralarla teması sonucu etken alınmış olur (Zadoks, 2004; Khan, 2002). 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). Etkenin aynı zamanda ineklerde sindirim sistemine, genital sisteme ve meme bezine kolonize olabildiği görülmektedir (Oliver ve ark., 1997; Khan ve ark., 2003).

Etkenin bu şekilde pek çok ortama adapte olması biyolojik olarak incelenmiş ve pek çok pseudogen yapısına sahip olduğu, yapısında bakteriyofaj adaları ve genomik adalar bulundurduğu görülmüştür. Bu durum da *S. uberis*'in farklı ekolojik ortamlara nasıl uyum sağladığını açıklamaktadır. Diğer streptokok türleri ile yapılan karşılaştırmalarda en fazla *S. agalactiae* ve *S. zooepidemicus* ile benzerlik gösterdiği bulunmuştur. *S. uberis* etkenlerinin bulundukları işletmelere göre farklılık gösterdiğini belirlemişler, predominant olan etkenlerin daha fazla virulens özelliğe sahip olduğunu belirtmişlerdir (Zadoks ve ark., 2003). Yapılan bir çalışmada da, *S. uberis* etkenlerinin meme bezinde duktular dokuda ve sekretorik alveolün luminal bölgesinde üreme gösterdiği gözlenmiştir. Almeida ve ark. (2007), *S. uberis* etkenlerinin uzun süre meme epitelyum hücrelerinde herhangi bir etki olmaksızın kalabildiğini ve hücre içi bu yerleşimi ile enfeksiyonun meme dokusunun derinliklerine yayılarak persiste bir enfeksiyon haline geldiğini belirtmişlerdir.

S. uberis mastitislerinde çoğunlukla enfeksiyon 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 yıkımlanma da zorlaşır. Antimikrobiyel tedavi oldukça önemlidir ve çoğu vakada seyir iyi görünürken bazı durumlarda enfeksiyon tekrarlayabilir. Kuru dönemdeki hayvanlarda yaygın olarak enfeksiyonu 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; Khan, 2002).

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

Son yapılan moleküler çalışmalarda *S. uberis*'in tek tip bir organizma olmadığı ve moleküler olarak farklılık gösterdiği görülmüştür (Jayarao ve ark., 1990; Odierno ve ark.,2006). Baseggio ve ark. (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 gözlemlemiştir.

Jayarao ve ark. (1990) 42 adet *S. uberis* etkenini önce konvansiyonel metotlar ile tiplendirmeye çalışmışlar ve 27 adet *S. uberis* etkeninin spesifik biokimyasal özellikleri gösterdiğini saptarken 15 suşun farklı biyokimyasal karakterler gösterdiğini belirlemiştir. Ancak biokimyasal testlerin yakın ilişkili *S. uberis* etkenlerinin ayırımında yetersiz kaldığı belirtilmiş ve enzim kesimlerinin ise farklılaşmayı etkili bir şekilde sağladığı görülmüştür. (Khan ve ark.,2003; Zadoks ve ark., 2003). Zadoks ve ark. (2005) farklı ortamlardan izole edilen *S. uberis* etkenlerine yapılan tiplendirme sonucunda etkenlerin aynı yapıda olduklarını görmüşlerdir. Jayarao ve ark. (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 belirlemiştir.

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 (Gilbert ve ark., 2006).

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 identifiye edilir. Tür düzeyinde ayırım yapmak için, CAMP, eskulin, sodyum-hippurat ve karbonhidrat fermentasyon testleri uygulanır (Quinn ve ark., 2004).

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 hippuratı 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 (Quinn ve ark. 2004).

Çizelge 1.1. *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* ve *S. uberis* etkenlerinin konvansiyonel ayırımı. (Quinn ve ark., 2004)

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

Streptokokların hemagglütinasyon oluşturma özellikleri birçok araştırmacı tarafından incelenmiş ve farklı sonuçlar elde edilmiştir. Araştırmacılar, hemagglütinasyon özelliğinin bakterinin mukozal yüzeylere tutunmasında etkili olduğu ancak test sonuçlarının bakterilerin in vitro ortamda üretildiği koşullar ve besiyerinden etkilendiğini saptamışlardır (Wibawan ve ark. 1993, Ekin ve Gürtürk 2006, Kurl ve ark 1989).

McDonald ve arkadaşları (2005) CAMP pozitif özelliğinin *S. uberis* etkenlerinde %9 oranında görülebileceğini belirtmişlerdir. Jiang ve ark. (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 antikorların 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 ark. (2002) CAMP özelliği negatif olan *S. agalactiae* suşlarını moleküler olarak incelemişler ve ilgili primer ile yaptıkları PCR sonucunda genotipik olarak CAMP pozitifliği saptamışlardır. Araştırmacılar bu farklılığı ekspresyon hatasına bağlamışlardır. *S. uberis*, *S. canis* ve *S. pyogenes* etkenlerinde fenotipik olarak belirlenen CAMP pozitifliği moleküler olarak da doğrulanmış ve bu gen bölgesinin *S. agalactiae* ile yakın ilişkili olduğu gösterilmiştir (Hassan ve ark., 2000).

Devriese (1991), Lancefield serogruplandırmasını genellikle beta hemolitik özellik gösteren streptokok türleri için tanımlamış, hemoliz özelliği bulunmayan ya da alfa hemoliz gösteren streptokok türlerinin serogruplandırması için kullanımda grup spesifik antijenlerin bulunmaması gibi durumlarda kullanımının hatalı sonuçlar vereceğini

belirtmiştir. Araştırmacı bu serotiplendirme yönteminde aynı grup spesifik antijenlerin farklı streptokok türleri üzerinde olabileceği gibi farklı antijenik yapılarında aynı streptokok türleri üzerinde bulunabileceğini belirtmiştir.

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

Mastitis infeksiyonlarında moleküler metotların kullanımı ile araştırmalar bir veya birkaç etken yönünde olurken bazı çalışmalarda mastitise neden olan streptokokların yanı sıra *E. coli*, *S. aureus* gibi bakterilerde teşhis edilebilmektedir. Aynı zamanda süttten yapılan ekstraksiyon 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 ark. 1997).

Cremonasi ve ark. (2006), mastitis infeksiyonlarında hızlı bir teşhis için DNA amplifikasyonunu temel alan moleküler teknikler kullanmışlar ve etkinliği arttırmak için ekstraksiyon aşamasında da inhibitörleri ortadan kaldırmanın sonuç spesifitesini arttırdığını görmüşlerdir.

Mastitiste koruma programları uygulamak tedaviden daha ekonomiktir. Bu nedenle işletmelerdeki inekleri koruma altına alan bir program uygulanmalıdır. Bu programlar ile daha az mastitis olgusu, daha az süt kaybı, daha az iş gücü olmakta ve tedavi masrafları

asgariye inmektedir (Baştan, 2009). Streptokok infeksiyonlarının kontrol edilmesi içinde belirli kritik kontrol noktaları oluşturulmuştur. Sağım sırasındaki hijyen kuralları, kuru 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 kontagiyöz yapısına bağlı olarak seçilir. Çevresel streptokok infeksiyonlarında çevresel şartlar iyileştirilmelidir (Pyörola, 1995).

Bu araştırma ile Aydın ve İzmir bölgesinde görülen sığır mastitislerinden *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* ve *Streptococcus uberis* etkenlerinin hem kültür hem de moleküler yöntemlerle hızlı, duyarlı ve spesifik olarak tanısının yapılması amaçlanmaktadır.

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, uygun örnekleme ile alınan, toplam 100 adet süt örneği konvansiyonel metotlarla streptokoklar yönünden incelendi.

2.1.1. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar

Süt örneklerinden streptokokların izolasyon ve identifikasyonunda kanlı agar (Oxoid), Brain-Hearth Broth, Hippurat solüsyonu (Merck 820648), Ninhidrin ayracı (Merck 7484659662) kullanıldı.

2.1.2. İzolasyon ve İdentifikasyon

Laboratuara getirilen süt örneklerinden kanlı agarlara ekimler yapılarak 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon 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). Tür düzeyinde identifikasyon amacıyla CAMP, eskulin testleri kullanıldı (Quinn ve ark. 2004). İzole edilen streptokokların saklanması amacıyla gliserinli Todd-Hewitt Broth kültürleri -20 oC' ye kaldırıldı (Fortin ve ark. 2003; McDonald ve ark. 2005).

2.1.2.1. Eskulin Testi

Bu testte içerisinde eskulin bulunan Edward's medium kullanıldı. İzole edilen streptokok kolonilerinden Edward's mediauma ekimler yapılarak 37oC'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda koyu kahve-siyah renkli koloniler *S. uberis* için pozitif, açık kahve renkli ya da renksiz koloniler negatif olarak kabul edildi ve diğer streptokok türleri bakımından değerlendirildi. (Quinn ve ark., 2004).

2.1.2.2. CAMP Testi

S. agalactiae etkenlerini belirlemek için CAMP testi yapıldı. Kanlı agarın ortasına *S. aureus* Cowan 1 suşu ekildi. Bu ekim hattına dik ve temas etmeyecek şekilde izole edilen streptokok kolonilerinin ekimleri yapıldı. 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılan kanlı agarlar da iki bakterinin kesiştiği noktada şemsiye tarzında görülen hemoliz CAMP pozitif olarak değerlendirilirken bu suşlar *S. agalactiae* olarak ayrıldı (Quinn ve ark., 2004).

2.1.3. PCR'da Kullanılan Buffer, Solüsyon, Primer ve Enzimler

İzole edilen streptokokların 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.

2.1.4. 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.

2.2. Yöntem

2.2.1. İzolasyon ve İdentifikasyon

Laboratuvara getirilen süt örneklerinden kanlı agarlara ekimler yapılarak 37°C'de 24-48 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). İzole edilen streptokokların saklanması amacıyla gliserinli Brain-Hearth Broth kültürleri -20 °C' ye kaldırıldı

2.2.2. DNA Eldesi (Ekstraksiyon)

PCR'da kullanılmak üzere örneklerle ait DNA'ların ekstraksiyonu yapıldı. Bu amaçla şüpheli koloniler % 5 koyun kanlı agarda 37° C'de 24-48 saat inkübe edildi. Koloniler öze yardımı ile toplanarak 400 µl FTS içinde süspansiyonunun ardından 100 °C'de 10 dk kaynatılarak bakteri DNA'sı ekstrakte edildi. Daha sonra 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek üstteki sıvı PCR'da hedef DNA olarak kullanılmak üzere saklandı.

2.2.3. PCR

PCR'da kullanılmak üzere örneklerle ait DNA'ların ekstraksiyonu yapıldı. Bu amaçla şüpheli koloniler % 5 koyun kanlı Brucella agarda 37° C'de 24-48 saat inkübe edildi. Koloniler öze yardımı ile toplanarak 400 µl FTS içinde süspansiyonunun ardından 100 °C'de 10 dk kaynatılarak bakteri DNA'sı ekstrakte edildi. Daha sonra 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek üstteki sıvı PCR'da hedef DNA olarak kullanıldı.

İzolatlarımızın moleküler identifikasyonu için dupleks ve monopleks PCR yapıldı. Dupleks PCR için oluşturulan 50 mikrolitrelik reaksiyon karışımı 1X PCR solusyonu, 2.5mM MgCl₂, 0.2 mM her bir dNTP, 2 IU Taq polimeraz, 80 pmol her bir *S.agalactia* primerinden, 20 pmol her bir *S.uberis* primerinden oluşturuldu. *S.dysgalactiae* için oluşturulan 25 mikrolitrelik PCR karışımı da 1X PCR solusyonu, 1. 25mM MgCl₂, 0.1 mM her bir dNTP, 2 IU Taq polimeraz, 40 pmol primer çifti ile hazırlandı. Her iki reaksiyon için de amplifikasyon koşulları olarak 95 derecede 5 dk ön denaturasyonu takiben; 95 derecede 1 dk, 59 derecede 30 sn, 72 derecede 30 sn olmak üzere 35 siklus ve 72 derecede 10 dk son uzama aşaması uygulandı. PCR ürünleri %2 agaroz içeren agaroz jel elektroforez ile görüntülendi.

Çizelge 2.1. Dupleks ve monopleks PCR'da kullanılacak oligonükleotid dizileri

Primer	Oligonükleotid dizisi (5'-3')	Büyüklik (bp)
<i>S. agalactiae</i>	AAGGAAACCTGCCATTTG	270
	TTAACCTAGTTTCTTTAAACTAGAA	
<i>S. dysgalactiae</i>	GAACACGTTAGGGTCGTC	264
	AGTATATCTTAAGTAGAAAACTATTG	
<i>S. uberis</i>	TAAGGAACACGTTGGTTAAG	330
	TTCCAGTCCTTAGACCTTCT	

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 100 adet süt örneği streptokoklar yönünden incelendi. İzole edilen etkenlerin tür düzeyinde identifikasyonları fenotipik ve moleküler özellikleri incelenerek gerçekleştirildi. Ayrıca izole edilen Streptokokların moleküler benzerlikleri de değerlendirildi.

3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

İncelenen 100 süt örneğinin 23 (%23)'ünden *Streptococcus* spp. izolasyonu gerçekleştirildi. Konvansiyonel metodlarla izole edilen suşların 13 (%57)'ü *S. dysgalactiae*, 10 (% 43)'u *S. uberis* olarak identifiye edildi. Örneklerde *S. agalactiae* suşu bulunamadı.

Çizelge 3.1. Elde edilen Streptokok suşlarının biyokimyasal aktiviteleri

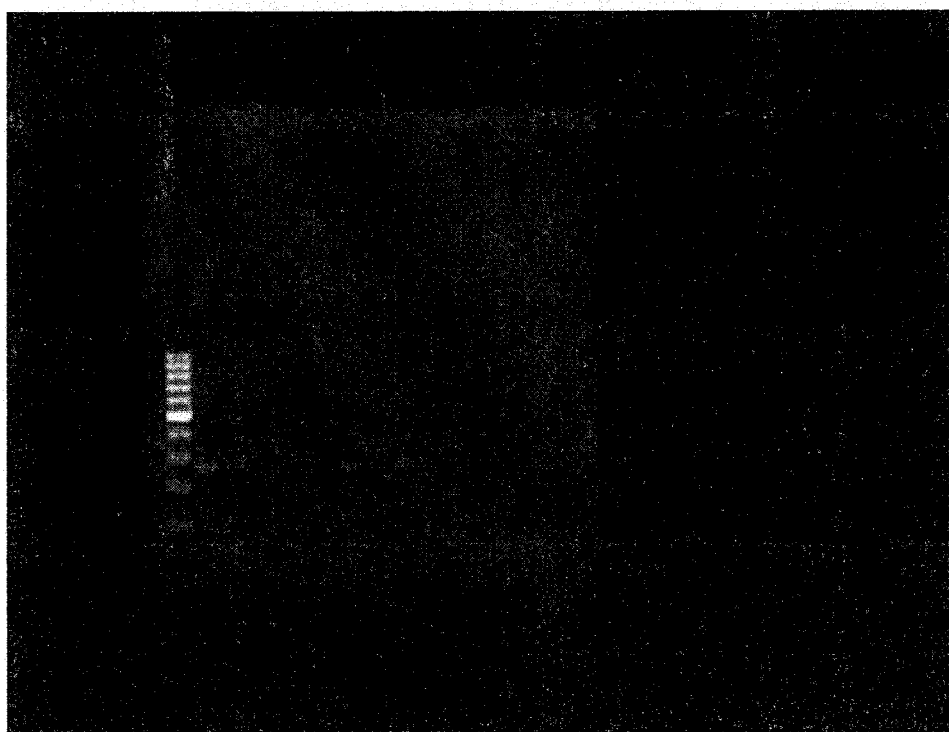
Türler	CAMP	Eskulin
<i>S. agalactiae</i> (n:0)	-	-
<i>S. dysgalactiae</i> (n:13)	-	-
<i>S. uberis</i> (n:10)	-	+

3.2. PCR Bulguları

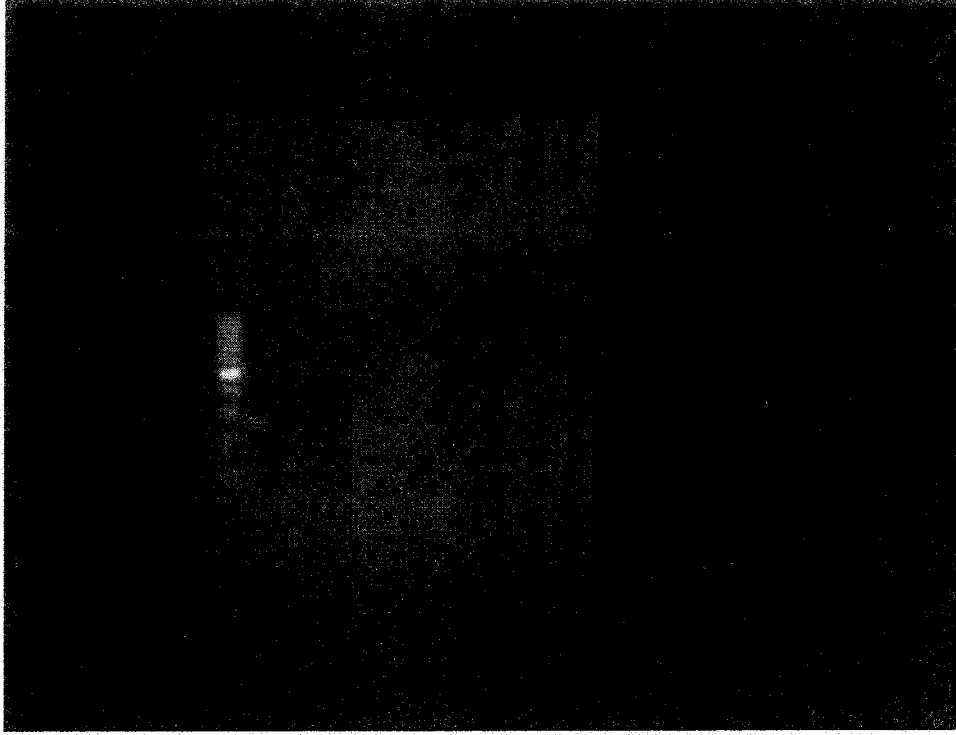
Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile aynı örnekleri incelendiğinde izolatlardan 3 (% 13)'ü *S. dysgalactiae*, 9 (% 39)'u *S. uberis* olarak belirlenirken hiç *S. agalactiae* suşu görülmedi. Fenotipik özelliklerine göre, en yüksek düzeyde *S. dysgalactiae* ve *S. uberis* izole edilirken, moleküler olarak incelendiğinde *S. agalactiae* ve *S. dysgalactiae* izolasyon oranlarının birbirine yakın olduğu belirlendi.



Resim 3.1. *S. uberis* jel elektroforezi



Resim 3.2. *S. dysgalactiae* jel elektroforezi



Resim 3.2. *S. agalactiae* jel elektroforezi

Elde edilen sonuçlar ise, moleküler yöntemlerin Streptokokların tür düzeyinde identifikasyonu için oldukça yararlı olduğunu ortaya koymuştur.

4.TARTIŞMA

Mastitis; genellikle bakteriyel veya mikotik patojen etkenlere bağı olarak şekillenen meme dokusu yangısıdır. Süt inekçiliğinin yapıldığı işletmelerde en sık rastlanılan problem MASTİTİS'tir. Ortalama her 100 inekten 17'sinde bulunmuştur. Yörelere göre değişmekle birlikte yurt çapında %5-53 arasında olup, mastitisin yurdumuz inekçiliğinde ne kadar önemli bir sorun olduğu görülmektedir (Aydın 1989).

Mastitis, sütçülük işletmelerinde giderleri arttırarak ve süt veriminde belirgin bir azalmaya sebep olarak önemli ekonomik kayıplara neden olan önemli bir problemdir. Sık sağılan ineklerin sütlerindeki lizozim(inhibin) ve laktoferrin gibi koruyucu enzim aktivitelerinin %18 daha fazla olduğu ve bu uzun süreli enzim aktivitelerinden dolayı sık aralıklarla sağılan ineklerde mastitis görülme insidensinin daha az olduğu bildirilmektedir. Çalışmalar daha az sıklıkla sağılan işletmelerde mastitislerin daha çok şekillendiğini bildirmektedir (Bademkiran ve ark 2005).

Mastitisin klinik formları, Klinik mastitis, subklinik mastitis ve kronik mastitistir. Klinik mastitis sütte fark edilebilir değişikliğin olduğu meme yangısıdır ve perakut, akut ve subakut olarak dört formu vardır. Subklinik mastitis, dış bakıda herhangi bir değişikliğin görülmediği meme yangısıdır. Kronik mastitis uzun süre seyreden mastitislerin sonucunda meme dokusunda fibröz dokuların gelişmesi ile karakterizedir. Subklinik mastitisler diğer mastitislere oranla 40 - 50 defa daha fazla şekillenmesi ve %3-26 oranında süt kaybına neden olmasından dolayı önemlidir(Aydın 1989).

Mastitis hastalığında mikrobiyel faktörler büyük rol oynamaktadır. Mastitis etkenlerinin başında *Staphylococcus aureus*, *S.epidermis*, *E.coli* ve *Streptococcus* türleri gelmektedir ve normal koşullarda süt inekçiliği işletmelerinde yılda ortalama %30-35 oranında mastitis olgusu görülmektedir(Bademkiran ve ark 2005). Çalışmamızda araştırdığımız *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* ve *Streptococcus uberis* etkenleri de Streptokokal mastitislerin oluşmasında yaygın olarak görülürler .

Streptokok mastitisleri ilk defa 1884 yılında Nocard ve Mollerau tarafından bildirilmiştir. Önceden streptococcus mastitis contagiosa sonradan S.mastitis veya S.agalactiae olarak isimlendirilmiştir(Anonim).

Streptococcus dysgalactiae, Memede, rumen, dışkı ve ahırlarda her yerde yaşar. Uygun sağlık koşullarının geliştirilmesiyle kontrol edilebilir ve orta derecede antibiyotiklere hassastır (Bray ve ark 1996).

Streptococcus uberis, yaygın bir çevre patojeni olarak bilinmektedir. Ayrıca klinik mastitis vakalarında yüksek oranda, laktasyondaki ineklerde de çoğunlukla subklinik vakalarda görülmektedir (Khan ve ark 2003).

Streptococcus agalactia, Memede yaşar, uzun periyotlar için meme bezi dışında var olabilir. Penicilinlere duyarlıdır,elimine edilebilir, genelde infekte inekler satın alınmadıkça hayvan sürülerine dönüşü yoktur (Bray ve ark 1996).Tek sürülerde pratikte eradike edilebilen S..agalactiae, mastitis ajanı olarak yaygındır. Birçok infekte inek birkaç klinik semptom ve anormal süt göstermiştir, fakat genellikle yüksek somatik hücre sayısına sahiptir(SHC). Dökme sütte SCC 1,000,000 hücre/ml yada daha fazla olduğunda inek sütünde yada dökme sütte SCC oranında artış meydana gelir ve yükselme durursa S. agalactiae'dan kuşkulandır. S. agalactiae aslında meme bezinin sisternasını ve damar sistemini infekte eder. Bezin yangısını oluşturan iritanlar üretilir ve ara sıra klinik semptom gösteren subklinik mastitis oluşturur. Çoğunlukla S. agalactiae nadiren şiddetli hastalığa neden olur fakat sonraki laktasyonda süt verimini düşürür (Anonim).

Süt ineklerinde streptococcus agalactiae'nin neden olduğu belirsiz olarak başlayan zamanla kronik hale geçen, memelerin körelmesine sebep olan çok bulaşıcı bir meme enfeksiyonudur(Bray ve ark 1996). Başlangıçta gizli ve hafif seyreder, gittikçe şiddetlenir. Çoğunlukla bir ya da iki meme lobunda olursa da; üç veya dört lobu kapsayan olaylarda az değildir. Zamanında sağaltım olmasa S.pyogenes, E.coli ve Staphylococcus gibi bakteriler sekonder enfeksiyon olarak hastalığa katılırlar (Leloğlu 1997). İneklerde kronik mastitise neden olan S.agalactiae, streptokokların genel özelliklerini taşır. Sporsuz, hareketsiz, gram pozitif koklardır. İnfekte ineklerin sütlerinden yapılan preparatlarda çok sayıda ve uzun zincirler halinde görülür. Kanlı agarda koloniler etrafında ancak 1 mm kadar hemoliz görülür (Leloğlu 1997).

Bakteriyel nedenler başta olmak üzere çeşitli nedenlere bağlı olarak şekillenen meme dokusu yangısı mastitis olarak tanımlanır. Mastitis infeksiyonuna bağlı olarak süt veriminde azalma ve buna bağlı oluşan çeşitli sonuçlara bağlı olarak bu infeksiyon süt yönlü yetiştiricilik yapan bir işletme için oldukça önemli ekonomik kayıplar şekillendirir. Streptokoklar mastitise neden olan önemli bakteriyel patojenlerdir. Bu patojen etkenlerin kendi aralarında çevresel ve bulaşıcı olarak sınıflandırılmaları, mastitis probleminin çözümünde etkene spesifik yönetim prosedürü ve tedavi uygulamalarının başarısını artırır. Bu nedenle streptokokkal mastitislerin identifikasyon prosedüründe izlenecek işlemler oldukça önemlidir. Bu çalışmada, mastitisli sütlerden etken izolasyonu ve Streptokokların mastitis etiolojisindeki rolleri klasik kültür yöntemi ile belirlenerek, izole edilen Streptokok suşlarının moleküler tekniklerle (polimeraz zincir reaksiyonu; PCR) tiplendirilmesi ve moleküler epidemiyolojileri ile ilgili temel bilgilerin sağlanması amaçlanmıştır.

Süt örneklerinden streptokokların izolasyon oranları farklılık göstermektedir. Piepers ve ark. (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 bağlamışlardır.

Phuektes ve ark. (2001) 117 süt örneğinde Streptococcus türlerini kültür ve PCR ile izolasyonları karşılaştırmalı olarak yapmış. PCR ile yapılan çalışmada % 17,1 *S. agalactia*, % 3,4 *S. dysgalactia*, % 7,3 *S. uberis* izole edilirken, kültür yöntemiyle % 14,5 *S. agalactia*, % 1,7 *S. dysgalactia*, % 0,9 *S. uberis* izole edilmiştir.

Dakman (2000) inek mastitis olgularından %12,8 oranında *Streptococcus* spp. izolasyonu gerçekleştirmiş ve bu streptokokların %4,5'inin *S. agalactiae* olduğunu bildirmiştir.

Bradley ve ark.,2007 sütlerdeki bakteriyolojik örnekleme sonucunda %23,5 oranında *S. uberis* etkeni izole edilirken *S. agalactiae* ve *S. dysgalactiae* etkenlerine rastlanılmamıştır.

Karahan (2005) incelediği mastitisli süt örneklerinden % 24,3 oranında *Streptococcus* spp. izole etmiş ve izole edilen etkenlerin %10,4'ü *S. agalactiae* ve

%13,9'unu diğer streptokoklar olarak tanımlamıştır. Arda ve İstanbulluoğlu, (1981) ise mastitisli sütlerde %8,7 *S. agalactiae* ve % 4,6 *S. uberis* izolasyonu gerçekleştirmiştir.

Unnerstad ve ark. (2009) inek sütlerinde *S. dysgalactiae* oranını %15,6, *S. uberis* oranını % 11,1 bulmuşlar ancak *S. agalactiae* izole edememişlerdir.

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

Unnerstad ve ark. (2009) inek sütlerinde *S. dysgalactiae* oranını %15,6, *S. uberis* oranını % 11,1 bulmuşlar ancak *S. agalactiae* izole edememişlerdir.

Sampimon ve ark. (2009) *S. uberis* prevalansını %1,1 bulurken, *S. dysgalactiae* prevalansını % 0,9 olarak bulmuş ve *S. agalactiae* etkenine rastlamamışlardır.

Dakman (2000) inek mastitis olgularından %12,8 oranında *Streptococcus* spp. izolasyonu gerçekleştirmiş ve bu streptokokların %4,5'inin *S. agalactiae* olduğunu bildirmiştir.

Tenhagen ve ark. (2009) inek sütlerinden izole ettikleri streptokokların %0,1'ni *S. agalactiae*, %3,4'nü *S. dysgalactiae*, %2,3'nü *S. uberis* olarak tanımlamışlardır.

Ergün ve ark. (2004) Hatay ilindeki aile tipi süt sığırcılığı yapan işletmelerdeki subklinik mastitisli inelerde %11,2 *S. uberis*, %6,5 *S. agalactiae*, %3,5 *S. dysgalactiae* oranında tanımlamışlardır.

Bradley ve ark.,2007 sütlerdeki bakteriyolojik örnekleme sonucunda %23,5 oranında *S. uberis* etkeni izole edilirken *S. agalactiae* ve *S. dysgalactiae* etkenlerine rastlanılmamıştır.

Devriese ve ark. (1999) klinik ve subklinik mastitislerden izole edilen katalaz negatif ve eskulin pozitif Gram pozitif kokların, çoğunlukla *S. uberis* olarak tanımlanmış olduğunu ve yeterince doğru tanımlamaya gidilmediğini bildirmişlerdir.

Bu tez çalışmasında incelenen 100 süt örneğinin 23 (%23)'nden *Streptococcus spp.* izolasyonu gerçekleştirildi. Konvansiyonel metodlarla izole edilen suşların 13 (%57)' *S. dysgalactiae*, 10 (% 43)'u *S. uberis* olarak identifiye edildi. Örneklerde *S. agalactiae* suşu bulunamadı. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile aynı örnekleri incelendiğinde izolatlardan 3 (% 13)' *S. dysgalactiae*, 9 (% 39)'u *S. uberis* olarak belirlenirken hiç *S. agalactiae* suşu görülmedi. Fenotipik zelliklerine göre, en yüksek düzeyde *S. dysgalactiae* ve *S. uberis* izole edilirken, moleküler olarak incelendiğinde *S. agalactiae* ve *S. dysgalactiae* izolasyon oranlarının birbirine yakın olduğu belirlendi. Elde edilen sonuçlar ise, moleküler yöntemlerin Streptokokların tür düzeyinde identifikasyonu için oldukça yararlı olduğunu ortaya koymuştur.

5. SONUÇ

Mastitis şüpheli sütlerden streptokokların izolasyonu, identifikasyonu ve moleküler tiplendirilmesi amacıyla yapılan bu tez çalışmasında aşağıdaki sonuçlara varılmıştır. İncelenen sütlerin %6'sından *Streptococcus* spp. izole edildi. Bu sonuç, genel olarak streptokokların mastitis etiyojisinde düşük düzeyde rol oynadığını gösterdi.

Bu tez çalışmasında incelenen 100 süt örneğinin 23 (%23)'ünden *Streptococcus* spp. izolasyonu gerçekleştirildi. Konvansiyonel metodlarla izole edilen suşların 13 (%57)'ü *S. dysgalactiae*, 10 (% 43)'ü *S. uberis* olarak identifiye edildi. Örneklerde *S. agalactiae* suşu bulunamadı. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile aynı örnekleri incelendiğinde izolatlardan 3 (% 13)'ü *S. dysgalactiae*, 9 (% 39)'u *S. uberis* olarak belirlenirken hiç *S. agalactiae* suşu görülmedi. Fenotipik özelliklerine göre, en yüksek düzeyde *S. dysgalactiae* ve *S. uberis* izole edilirken, moleküler olarak incelendiğinde *S. agalactiae* ve *S. dysgalactiae* izolasyon oranlarının birbirine yakın olduğu belirlendi. Elde edilen sonuçlar ise, moleküler yöntemlerin Streptokokların tür düzeyinde identifikasyonu için oldukça yararlı olduğunu ortaya koymuştur.

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, mastitisli sütlerden etken izolasyonu ve Streptokokların mastitis etiyolojisindeki rollerini klasik kültür yöntemi ile belirlemek, ayrıca izole edilen Streptokok suşlarının moleküler tekniklerle (polimeraz zincir reaksiyonu; PCR) tiplendirilmesi ve moleküler epidemiyolojilerinin belirlenmesini sağlamaktır.

Bu tez çalışmasında incelenen 100 süt örneğinin 23 (%23)'ünden *Streptococcus spp.* izolasyonu gerçekleştirildi. Konvansiyonel metodlarla izole edilen suşların 13 (%57)'ü *S. dysgalactiae*, 10 (% 43)'u *S. uberis* olarak identifiye edildi. Örneklerde *S. agalactiae* suşu bulunamadı. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile aynı örnekleri incelendiğinde izolatlardan 3 (% 13)'ü *S. dysgalactiae*, 9 (% 39)'u *S. uberis* olarak belirlenirken hiç *S. agalactiae* suşu görülmedi.

Anahtar sözcükler: Mastitis, PCR, Sığır, Streptokok

SUMMARY

The isolation of *Streptococcus* spp. from milk samples, species identification of the isolates with conventional and molecular methods and determination of molecular epidemiology of the isolates were aimed in the study.

For these aims, 100 milk samples were investigated. *Streptococcus* spp. were isolated from 23 of 100 (26%) milk samples, and from these *Streptococci*, 13 (57%) and 10 (43%) strains were identified as *S. Dysgalactiae* and *S. uberis* by conventional methods, respectively. The same strains were investigated by molecular methods, 3 (13%) and 9 (39%) of strains were identified as *S. Dysgalactiae* and *S. uberis*, respectively.

Key Words: Cow, Mastitis, PCR, Streptococcus

KAYNAKLAR

Akay Ö, İzgür, M, Esendal Ö, Çetin C. *İnek sütlerinden izole edilen streptokok suşlarının sero-gruplandırılması.* Doğa-Tr. J.Vet.Anim.Sci. 1993 17: 89-95

Arda M, İstanbulluoğlu E. *Mastitislere Sebep Olan Anaerob, Mycoplasma ve Mantarların İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Bunlara Karşı Etkili Antibiyotik ve Fungusitlerin Saptanması.* TÜBİTAK Veteriner ve Hayvancılık Grubu, 1978 Proje No:254.

Bağtan A. Mastitisten Korunmada Temel İlkeler. In: *İneklerde Meme Hastalıkları.* Hatipoğlu Basım ve Yayım Tic.Ltd.şti. 2009 s.:84-105

Beare PA, Unsworth N, Andoh M, Voth DE, Omsland A, Gilk SD, Williams KP, Sobral BW, Kupko JJ, Porcella SF, Samuel JE, Heinzen RA. Comparative genomics reveal extensive transposon-mediated genomic plasticity and diversity among potential effector proteins within the genus *Coxiella*. *Infect. Immun.* 2009 77: 642–656

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

Bert F, Picard B, Branger C, Lambert-Zechovsky N. *Analysis of genetic relationships among strains of groups A, C and G streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis.* J. Med. Microbiol. 1996 45: 278-284

Blood DC, Henderson JA, Radostits OM. *Veterinary Medicine: A Textbook of The Diseases of Cattle, Sheep, Pigs and Horses.* Bailliere Tindall, London 1979.

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

Blowey R, Edmondson P. *Diseases of the Udder and Teat.* In: *Mastitis Control in Dairy Herds.* Publish.Farming Press. Books. NY. USA. 1995b p:176-181

Bohnsack JF, Whiting AA, Martinez G, Jones N, Adderson EE, Detrick S, Bonkowsky AN, Bisharat N, Gottschalk M. *Sero-type III Streptococcus agalactiae from bovine milk and human neonatal infections.* Emer.Infect.Dis. 2004 10:1412-1418

Bray DR, Shearer JK. *Mastitis control.* The Institute of Food and Agricultural Sciences (IFAS) University of Florida, Gainesville FL 32611. 2008 Erişim: [http://edis.ifas.ufl.edu/ds128] Erişim tarihi: 01.12.09

Bramley AJ, Cullor JS, Erskine RJ, Fox LK, Harmon RJ, Hogan JS, Nickerson SC, Oliver SP, Smith KL, Sordillo LM. *Current Concepts of Bovine Mastitis, 4th ed.* National Mastitis Council, Inc, Madison, WI. 1996

Buddle BM, Tagg JR, Ralston MJ. *Use of an inhibitor typing scheme*

to study the epidemiology of *Streptococcus uberis* mastitis. N.Z. Vet. J. 1988 36: 115-119

Colque JJ, Devriese LA, Haesebrouck F. *Streptococci and enterococci associated with tonsils of cattle*. Lett.Appl.Microbiol. 1993 16: 72-74

Cudi C.A., Bray M.P., Niba A.T., Mastitis Causing Pathogens within the Dairy Cattle Environment. International Journal of Biology vol 1 no 1 (2009)

Çetinkaya B., Açık N., Karahan M., Taşdemir M., Kalın R., Koç O., *Mastitisli İnek Sütlerinde Önemli Patojenlerin Direkt Tespiti İçin Bir Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemini Geliştirilmesi*, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Hayvan sağlığı Araştırmaları Program Değerlendirme Toplantısı, sonuçlanmış projeler (2011) :132-147

Devriese LA, Hommez J, Laevens H Pot B, Vandamme P, Haesebrouck F. *Identification of aesculin-hydrolyzing streptococci, lactococci, aerococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows*. Vet. Microbiol. 1999 70: 87-94

Dmitriev A, Suvorov A, Shen AD. *Clinical diagnosis of group B streptococci by scpB gene based PCR*. Indian J. Med. Res. 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*. Vet.Microbiol. 2000 75: 27-41

Duarte RS, Bellei, BC, Miranda, OP, Brito, MAVP, Teixeira, LM. *Distribution of antimicrobial resistance and virulence-related genes among brazilian group B streptococci recovered from bovine and human sources*. Antimicrob Agents Chemother. 2005 49: 97-103

Ekin İH, Gürtürk K. *Characterization of bovine and human group B streptococci Isolated in Turkey*. J. Medical Microbiol. 2006 55: 517-521

Ekin İH. *İneklerde Subklinik Mastitis Olgularından İzole Edilen Sreptokokların Serogruplandırılması ve Çeşitli Biyokimyasal Özellikleri Üzerine Araştırmalar*. YYÜ Sağ. Bil. Ens., Van, Yüksek Lisans Tezi 1998.

Ergün Y, Doğruer G, Aslantaş Ö, Cantekin Z. *Hatay ilindeke aile tipi süt sığırcılığı işletmelerindeki subklinik mastitislerin epidemiyolojisi*. Vet. Bil. Derg.(2004),20,4:25-28

Hadimli HH, Erganiş O. *Mastitis ve Bağışıklık*. Veterinarium, 2001 13 (1):37-42.

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

Garvie EI, Farrow JAE, Bramley AJ. *Streptococcus dysgalactiae (Diernhofer) norn. rev. Int. J. System. Bacterial*. 1983 33: 404-405

Garvie EI, Bramley AJ. *Streptococcus uberis: an approach to its classification.* J. Appl. Bacteriol. 1979 46: 295-304

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

Harrold E., *merck veterinary manual*, 9. Edition ,1010

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

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

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

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

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

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

Jain NC. Common mammary pathogens and factors in infection and mastitis. *J. Dairy Sci.* 1979 62: 128-134

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

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

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

Jayarao BM, Oliver SP. Polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting for identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* Species isolated from bovine milk. *J. Food Protect.* 57: 1994 240-245

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

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

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

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

Keefe, G.P., *Streptococcus agalactiae* Mastitis: A review, *Can. Vet. J.*,2002, 38, 429-437.

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. *J.Vet. Sci.* 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*. *Infect. Immun.* 1989 57: 384-389

Lancefield RC. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* 1938 38: 473-478.

Martinez G, Harel J, Higgins R, Lacouture S, Daignault D, Gottschalk N. Characterization of *S. agalactiae* isolates of bovine and human origin by random amplified polymorphic dna analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2000 38: 71-78

Meiri-Bendek, I., Lipkin, E., Friedman, A., Leitner, G., Saran, A., Friedman, S., Kashi, Y., A PCR-Based Method for the Detection of *Streptococcus agalactiae* in Milk, *J. Dairy Sci.*, 2002, 85, 1717-1723.

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

NMC. *Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection.* National Mastitis Council. 1990 p.: 7-10 Arlington, VA

Østeras, O., Solverod, L., Reksen, O. Milk culture results in a large norwegian survey-effects of season, parity, days in milk, resistance, and clustering milk culture results in a large Norwegian. *J. Dairy Sci.* 2006. 89: 1010-1023

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

Person Y, Nyman KK, Andersob U. *Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden.* Acta Veterinaria Scandinavica 2011, 53:36

Phuektes P, Browning GF, Anderson G, Mansell PD. *Multiplex PCR as a mastitis screening test for *S.aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* and *S. uberis* in bulk milk samples.* J.Dairy Res. 2003 70: 149-155

Phuektes P, Mansell PD, Browning GF. *Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis.* J. Dairy Sci. 2001a 84: 1140-1148

Phuektes P, Mansell PD, Dyson RS, Hooper ND, Dick JS, Browning GF. *Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* isolates from dairy cows with mastitis.* J. Clin. Microbiol. 2001b 39: 1460-1466

Pitkala A, Koort J, Björkroth J. *Identification and antimicrobial resistance of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* isolated from bovine milk samples.* J.Dairy Sci. 2008 91: 4075-4081

Reksen O, Sølvørød L, Østerås O. *Relationships between milk culture results and milk yield in Norwegian dairy cattle.* J. Dairy Sci. 2007 90: 4670-4678

Riekerink RGM, Barkema OHW, Kelton DF, Scholl D. *Incidence rate of clinical mastitis on dairy farms.* J.Dairy Sci. 2008 91: 1366-1377

Riekerink RGM, Barkema OHW, Veenstra S, Poole DE, Dingwell RT, Keefe GP. *Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island.* Can. Vet.J. 2006 47: 567-572

Roguinsky M. *Comparison of *Streptococcus uberis* and *S.infrequens* pathogenicity for cow udder.* Ann. Rech.Vet. 1977 8: 153-157

Ruoff KL. *Streptococcus.* In: *Manual of clinical microbiology.* Ed: Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C. and Tenover, R.H. 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. p.: 1995 299-307

Schukken YH, Wilson D, Welcome F, Tikofsky LG, Gonzalez RN. *Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts.* Vet. Res. 2003 34: 579-596

Şahin M, Çolak A, 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 Üniv.Vet.Fak.Derg. 1995 3: 49-55

Taylor DL, Ward PN, Rapier CD, Leigh JA, Bowler LD. *Identification of a differentially expressed oligopeptide binding protein (OppA2) in *Streptococcus uberis* by representational difference analysis of cDNA.* J. Bacteriol. 2003 185: 5210-5219

Tomita T, Meehan B, Wongkattiya N, Malmo J, Pullinger G, Leigh J, Deighton M. Identification of *Streptococcus uberis* multilocus sequence types highly associated with mastitis. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008 74: 114-124

Wanger AR, Dunne GM. Development of a system for genetic and molecular analysis of *Streptococcus agalactiae*. *Res. Vet. Sci.* 1985 38: 202-208

Ward PN, Holden MT, Leigh JA. Evidence for niche adaptation in the genome of the bovine pathogen *Streptococcus uberis*. *BMC Genomics.* 2009 28: 10:54

Watts J () Characterization and identification of *Streptococci* isolated from bovine mammary glands. *J. Dairy Sci.* 1988 71: 1616-1624

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

Wieliczko RJ, Williamson JH, Cursons RT, Lacy-Hulbert SJ, Woolford MW. Molecular typing of *S. uberis* strains isolated from cases of bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 2002m85: 2149-2154

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

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. *Environmental Mastitis.* Part 1. *Nodpa News.* 2004 4: 13-14

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

ÖZGEÇMİŞ

Barış ÖZPULAT, 1977 yılında İzmir’de doğdu. 1996 yılında girdiği Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nden 2003 yılında mezun oldu. Ekim 2008’den bu yana, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitimini sürdürmektedir. 2003 yılında askerlik hizmetini tamamladıktan sonra 2004 yılından itibaren Bayındır ilçesinde büyükbaş klinik hekimlik mesleğini sürdürmektedir. Evli ve 2 çocuk babası olup, yabancı dil olarak “İngilizce” bilmektedir.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü eksik etmeyen ADÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Osman KAYA'ya ve araştırmanın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen danışmanım Yrd. Doç. Dr. Serap SAVAŞAN'a ve Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ile Araştırma Görevlilerine destek ve anlayışlarından dolayı sonsuz teşekkür ederim.