

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

144 447

MASTİTİSLİ İNEK SÜTLERİNDEN İZOLE
EDİLEN STREPTOKOK VE STAFİLOKOK
ETKENLERİNDE GENETİK POLİMORFİZMİN
ARAŞTIRILMASI

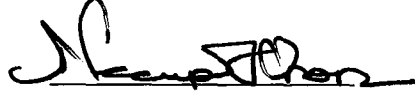
DOKTORA TEZİ

MURAT KARAHAN
ELAZIĞ - 2005

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Necip İLHAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Adile MUZ

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Burhan ÇETİNKAYA



Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

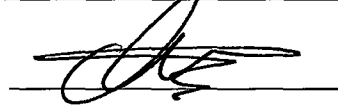
Prof. Dr. K. Serdar DİKER



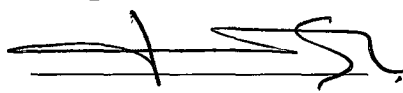
Prof. Dr. H. Basri GÜLCÜ



Prof. Dr. Adile MUZ



Prof. Dr. Yusuf BOLAT



Doç. Dr. Burhan ÇETİNKAYA



TEŞEKKÜR

Öncelikle doktora çalışmamda danışmanlığımı üstlenmesi ve hiçbir zaman desteğini üzerimden esirgememesi nedeniyle doktora hocam Doç. Dr. Burhan ÇETİNKAYA olmak üzere, Anabilim Dalımızın diğer saygıdeğer öğretim üyeleri Prof. Dr. Adile MUZ, Prof. Dr. H. Basri GÜLCÜ ve Doç. Dr. H. Basri ERTAŞ'a teşekkür etmeyi borç bilirim. Doktoram boyunca devamlı olarak bilgilerinden yararlandığım ve özellikle laboratuvar çalışmalarında deneyim kazanmamda değerli bilgilerini benden esirgemeyen Dr. Hasan ÖNGÖR ve bana sağladığı destekten dolayı çalışma arkadaşım Arş. Gör. M. Nuri AÇIK'a minnettarlığımı bildiririm. Çalışma materyallerinin toplanmasındaki katkıları nedeniyle Vet. Sağ. Tekn. Muhittin BAZNA, Vet. Hek. Fatih SAKİN, Arş. Gör. Murat YÜKSEL, Vet. Hek. Feyzullah DOĞAN, Vet. Hek. Mehmet YILDIZ ve Vet. Hek. Turan AYDINOĞLU'na çok teşekkür ederim. Ayrıca, manevi desteklerini her zaman arkamda hissettiğim anneme, babama, ağabeyim Doç. Dr. İzzet KARAHAN ve ailesine teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırmalar Kurumu (TÜBİTAK) tarafından VHAG-1895 no'lu ve Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (FÜBAP) tarafından 739 no'lu proje olarak desteklenmiştir. Çalışmaya sağlamış oldukları maddi destekten dolayı TÜBİTAK ve FÜBAP kurumlarına da teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u> <u>No</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
ONAY SAYFASI.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. GİRİŞ.....	5
3.1. MASTİTİS.....	5
3.2. <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> MASTİTİSLERİ	9
3.2.1. Etiyolojik Ajan.....	9
3.2.2. Epidemiyoloji.....	11
3.2.2.1. Bulaşma.....	11
3.2.2.2. Türkiye’de <i>S. aureus</i> Mastitislerinin Görülme Sıklığı.....	14
3.2.3. Patogenez ve Virulens.....	15
3.2.4. Klinik Belirtiler.....	21
3.2.5. Tanı.....	22
3.2.6. Sağaltım, Koruma ve Kontrol.....	25
3.3. <i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i> MASTİTİSLERİ.....	30
3.3.1. Etiyolojik Ajan.....	30

3.3.2. Epidemiyoloji.....	33
3.3.2.1. Bulaşma.....	33
3.3.2.2. Türkiye’de <i>S. agalactiae</i> Mastitislerinin Görülme Sıklığı.....	35
3.3.3. Patogenez ve Virulens.....	36
3.3.4. Klinik Belirtiler.	41
3.3.5. Tanı.....	43
3.3.6. Sağaltım, Koruma ve Kontrol.....	45
3.4. <i>S. AUREUS</i> ve <i>S. AGALACTIAE</i> ’nin GENOTİPLENDİRİLMESİ.....	48
3.5. AMAÇ.....	55
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	57
4.1. SÜT NUMUNELERİNİN TOPLANMASI.....	57
4.2. <i>S. AUREUS</i> İZOLASYONU ve İDENTİFİKASYONU	57
4.2.1. Kültür Yöntemiyle <i>Staphylococcus sp.</i> İzolasyonu ve İdentifikasyonu	57
4.2.2. PCR ile <i>S. aureus</i> İdentifikasyonu	58
4.2.2.1. DNA Ekstraksiyonu.....	58
4.2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	59
4.3. <i>S. AUREUS</i> ’UN MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ.....	60
4.3.1. Koagulaz (<i>coa</i>) Geninin PCR Amplifikasyonu (<i>coa</i> -PCR).....	60
4.3.2. Koagulaz (<i>coa</i>) Geninin RFLP Analizi (<i>coa</i> -RFLP).....	60
4.3.3. <i>S. aureus</i> RAPD Analizi.....	61
4.4. <i>S. AGALACTIAE</i> İZOLASYONU ve İDENTİFİKASYONU.....	63
4.4.1. Kültür Yöntemiyle <i>Streptococcus sp.</i> İzolasyonu ve İdentifikasyonu	63
4.4.2. PCR ile <i>S. agalactiae</i> İdentifikasyonu	63
4.4.2.1. DNA Ekstraksiyonu.....	63

4.4.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	64
4.5. <i>S. AGALACTIAE</i> 'NİN MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ.....	65
4.5.1. CAMP-Faktör (<i>cfb</i>) Geninin PCR Amplifikasyonu (<i>cfb</i> -PCR).....	65
4.5.2. CAMP-Faktör (<i>cfb</i>) Geninin RFLP Analizi (<i>cfb</i> -RFLP).....	65
4.5.3. <i>S. agalactiae</i> RAPD Analizi.....	66
4.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	68
4.7. KÜLTÜR VE PCR AŞAMALARINDA KULLANILAN AYIRAÇLAR.	69
4.7.1. Kültür ile İzolasyon ve İdentifikasyonda Kullanılan Ayıraçlar.....	69
4.7.2. PCR İşleminde Kullanılan Ayıraçlar.....	73
4.7.2.1. DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Ayıraçlar.....	73
4.7.2.2. PCR Analizinde Kullanılan Ayıraçlar.....	74
4.7.2.3. PCR-RFLP Analizinde Kullanılan Ayıraçlar.....	75
4.7.2.4. Elektroforez İşleminde Kullanılan Ayıraçlar.....	76
5. BULGULAR.....	77
5.1. <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	77
5.1.1 <i>Staphylococcus sp.</i> İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları.....	77
5.1.2. PCR ile <i>S. aureus</i> İdentifikasyon Bulguları.....	77
5.1.3. <i>S. aureus coa</i> -PCR Bulguları.....	78
5.1.4. <i>S.aureus coa</i> -RFLP Bulguları.....	79
5.1.5. <i>S. aureus</i> RAPD Bulguları.....	83
5.2. <i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i>	86
5.2.1. <i>Streptococcus sp.</i> İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları.....	86
5.2.2. PCR ile <i>S. agalactiae</i> İdentifikasyon Bulguları.....	86
5.2.3. <i>S. agalactiae cfb</i> -PCR Bulguları.....	89

5.2.4. <i>S. agalactiae</i> <i>cfb</i> -RFLP Bulguları.....	89
5.2.5. <i>S. agalactiae</i> RAPD Bulguları.....	90
6. TARTIŞMA.....	93
7. KAYNAKLAR.....	108
8. ÖZGEÇMİŞ.....	121



TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
	<u>No</u>
Tablo 1. Mastitise bağlı yıllık kaybın nedenleri ve oranları.....	7
Tablo 2. Süt ineklerinde bulunan majör mastitis patojenleri.....	9
Tablo 3. <i>S. aureus</i> 'un PCR analizlerinde ve tiplendirilmesinde kullanılan primerler.....	62
Tablo 4. <i>S. agalactiae</i> 'nın PCR analizlerinde ve tiplendirilmesinde kullanılan primerler	67
Tablo 5. Sublinik mastitis şüpheli ineklerden elde edilen <i>coa</i> pozitif <i>S. aureus</i> izolatlarında gözlenen RFLP profillerinin dağılımı.....	80
Tablo 6. Sublinik mastitis şüpheli ineklerden elde edilen <i>coa</i> pozitif <i>S. aureus</i> izolatlarında gözlenen RAPD profillerinin dağılımı.....	83
Tablo 7. CMT pozitif süt örneklerinden izole edilen Streptokokların bölgelere göre dağılımı.....	88
Tablo 8. <i>S. agalactiae</i> izolatlarındaki RAPD profillerinin dağılımı.....	92

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u> <u>No</u>
Şekil 1. <i>Staphylococcus sp.</i> olarak tanımlanan kültürlerden elde edilen DNA'ların <i>S. aureus</i> tür spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR analizi sonucu oluşan ürünlerin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü.....	77
Şekil 2. <i>S. aureus</i> izolatlarının <i>coa</i> -PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü.....	78
Şekil 3a. <i>AluI</i> ile muamele edilmiş <i>coa</i> -PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü.....	81
Şekil 3b. <i>AluI</i> ile muamele edilmiş <i>coa</i> -PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü.....	81
Şekil 4a. <i>Hin6I</i> ile muamele edilmiş <i>coa</i> -PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü.....	82
Şekil 4b. <i>Hin6I</i> ile muamele edilmiş <i>coa</i> -PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü	82
Şekil 5a. <i>coa</i> pozitif <i>S. aureus</i> 'ların RAPD analizi (Primer 786) ile tiplendirilmesi	84
Şekil 5b. <i>coa</i> pozitif <i>S. aureus</i> 'ların RAPD analizi (Primer 786) ile tiplendirilmesi.....	84
Şekil 6a. <i>coa</i> pozitif <i>S. aureus</i> 'ların RAPD analizi (OPS 11) ile tiplendirilmesi....	85
Şekil 6b. <i>coa</i> pozitif <i>S. aureus</i> 'ların RAPD analizi (OPS 11) ile tiplendirilmesi....	85
Şekil 7. <i>Streptococcus sp.</i> olarak tanımlanan kültürlerden elde edilen DNA'ların <i>S. agalactiae</i> 16S rRNA genine ve <i>cfb</i> genine spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR analizi sonucu oluşan ürünlerin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü.....	87
Şekil 8. <i>AluI</i> ve <i>Tsp 509I</i> ile muamele edilmiş <i>cfb</i> -PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü.....	89
Şekil 9a. <i>cfb</i> pozitif <i>S. agalactiae</i> 'ların RAPD analizi (OPB18) ile tiplendirilmesi	90
Şekil 9b. <i>cfb</i> pozitif <i>S. agalactiae</i> 'ların RAPD analizi (OPB18) ile tiplendirilmesi.....	91

1. ÖZET

Bu çalışmada, Türkiye'nin doğu ve güneydoğusundaki süt sığırlarından toplanan Kaliforniya Mastitis Testi (CMT) pozitif süt örneklerinden *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ve *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) izolasyon ve identifikasyonu, koagulaz (*coa*) pozitif *S. aureus* ve CAMP-faktör (*cfb*) pozitif *S. agalactiae* izolatlarının Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ve Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) yöntemleri ile tiplendirilmesi amaçlandı.

S.aureus için toplanan ve CMT pozitif olan süt örneklerinin (n = 700) bakteriyolojik kültüründe 367 örnekte üreme tespit edildi. Bunlar arasındaki 200 (% 28.6) örnek tür spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile *S. aureus* olarak identifiye edildi. *Coa* geninin PCR amplifikasyonu sonucunda 161 *S. aureus* izolatu *coa* pozitif bulundu. *Coa* PCR'da, izolatların büyük çoğunluğunda (n = 135, % 83.9) moleküler uzunlukları 500-1400 bp arasında değişen tek bir bant oluşumu gözlenirken, az sayıdaki izolatta (n = 26, % 16.1) çift amplifikasyon ürünü elde edildi. *AluI* ve *Hin6I* restriksiyon enzimleriyle gerçekleştirilen *coa*-RFLP analizinde, sırasıyla 23 ve 22 bant profili gözlemlendi. Primer 786 ve OPS 11 primerleri ile yapılan RAPD yönteminde ise sırasıyla 32 ve 30 farklı profil elde edildi.

Bu çalışmada ayrıca, beş farklı bölgedeki süt ineklerinden toplanan CMT pozitif süt numuneleri (n = 820) *S. agalactiae* yönünden incelendi. Bakteriyolojik kültürde toplam 199 örnekte üreme tespit edildi ve bunlardan 85 (%10,4) izolat hem tür spesifik PCR hem de *cfb*-PCR ile *S. agalactiae* olarak identifiye edildi.

Amplifiye edilen *cfb*-PCR ürünlerinin *AluI* ve *Tsp509I* restriksiyon enzimleriyle muamelesi sonucunda tüm izolatlarda aynı restriksiyon profilleri elde edildi. OPB 18 primeri ile yapılan RAPD yönteminde ise 18 farklı profil gözlemlendi.

Sonuç olarak, Doğu ve Güneydoğu bölgesindeki sığır popülasyonlarından izole edilen *S. aureus* ve *S. agalactiae* suşlarında yüksek oranda bir genetik heterojenite olduğu tespit edildi. *S. agalactiae* için RAPD ve *S. aureus* için *coa*-RFLP ve RAPD yöntemlerinin, sığır orijinli *S. aureus* ve *S. agalactiae* izolatlarının tiplendirilmesinde konvansiyonel yöntemlere karşı iyi bir alternatif olarak kullanılabilmesi kanısına varıldı. Ayrıca bu çalışmadan elde edilen verilerin, Stafilokokal ve Streptokokal mastitislere karşı etkili kontrol ve tedavi stratejilerinin (predominant suşlar kullanılarak yeni aşuların geliştirilmesi ve etkili antibiyotiklerin seçimi gibi) geliştirilmesine ve bunun sonucunda mastitislerin insidensinde azalmalar sağlanmasına yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Sığır, Mastitis, *S. aureus*, *S. agalactiae*, PCR, RFLP, RAPD.

2. ABSTRACT

The aims of the present study were to isolate and identify *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) from California Mastitis Test (CMT)-positive milk samples of dairy cow populations located in the east and south east of Turkey, and then to characterize the coagulase (*coa*) positive isolates for *S. aureus* and CAMP-factor (*cfb*) positive isolates for *S. agalactiae* by means of Polymerase Chain Reaction based-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) assay.

In the bacteriological culture of milk samples (n = 700) that were positive in CMT for *S.aureus*, growth was obtained from 367 samples. Among these, species-specific PCR identified 200 (28.6%) isolates as *S. aureus*. The PCR amplification of the *coa* gene showed that 161 of the *S. aureus* isolates were *coa* positive. In *coa* PCR, while most of the isolates (n = 135, 83.9%) were determined to produce a single band with the molecular sizes ranging from 500 to 1400 bp, a small number of isolates (n = 26, 16.1%) yielded two amplification products. *Coa*-RFLP analysis by restriction enzymes of *AluI* and *Hin6I* revealed 23 and 22 band patterns, respectively. RAPD assay based upon Primer 786 and OPS 11 produced 32 and 30 different profiles, respectively.

In addition, milk samples collected from 820 dairy cows at five different regions were examined for the presence of *S. agalactiae*. In the bacteriological culture of milk samples (n =820) that were positive in CMT, growth was obtained from 199 samples. Among these, both species-specific PCR and *cfb*-PCR

identified 85 (10.4%) isolates as *S. agalactiae*. After digestion of the amplified *cfb*-PCR products with the restriction enzymes *AluI* and *Tsp509I*, all isolates appeared to have identical restriction profiles. RAPD assay based upon OPB 18 produced 18 different profiles.

In conclusion, it was determined that a high degree of heterogeneity existed in the *S. aureus* and *S. agalactiae* strains isolated from dairy cow populations located in the east and south east of Turkey. RAPD assay and *coa*-RFLP analysis for *S. aureus* and RAPD assay for *S. agalactiae* can be used as good alternatives to conventional methods in typing *S. aureus* and *S. agalactiae* isolates of bovine origin. It is suggested that the findings of this study will help develop effective control and treatment strategies (e.g. development of new vaccines by using predominant strains, selection of effective antibiotics) against Staphylococcal and Streptococcal mastitis and therefore reduce the incidence of the disease.

Keywords: Dairy cattle, Mastitis, *S. aureus*, *S. agalactiae*, PCR, RFLP, RAPD.

3. GİRİŞ

3.1. MASTİTİS

Mastitis tüm dünyada özellikle süt sığırcılık işletmelerinde sıklıkla görülen ve süt endüstrisinde büyük ekonomik kayıplara sebep olan meme içi bir enfeksiyondur (70, 141). Genel anlamda mastitis, meme bezlerinin travmatik etkilere ve meme içerisine çoğunlukla ekzojen veya endojen olarak giren mikroorganizmalara karşı reaksiyon göstermesidir (20). 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 sütün başlıca kaynağı olarak ilk sırada süt ineklerinin gelmesi, sığır mastitisini diğer hayvanlarda görülen mastitislere kıyasla daha fazla önemli kılmaktadır (15). Mastitis toplam sığır hastalıklarının % 26'sını oluşturmaktadır ve bunun neticesinde ortaya çıkan kaybın diğer infertilite ve reproduktif hastalıklardan yaklaşık iki kat fazla olduğu bildirilmiştir (38, 120). Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO) 1995 yılında yaptığı istatistiklere dayanılarak verilen rakamlara göre; Türkiye'de 11,8 milyon baş sığır popülasyonu içerisinde 6,7 milyon baş süt ineği bulunmaktadır. Türkiye'de inek sütü kullanım oranı 1970 yılında % 59 iken bu oran 1996 yılında % 88'e yükselmiştir (6). Toplam inek sütü üretiminin yaklaşık olarak yılda 10 milyon ton olduğu (6) ve süt ineklerinin yaklaşık % 30'unun mastitisli olduğu (20) düşünülecek olursa mastitisten kaynaklanan kayıpların önemi daha da iyi anlaşılabilir. Birçok ülkede süt işletmelerinde yapılan gözlemler göstermiştir ki inekler arasında mastitisin prevalansı % 50, bir meme lobundaki enfeksiyon oranı ise % 25 civarındadır (20).

Genel olarak mastitis iki formda gözlenir. Bunlardan ilki klinik mastitis olarak adlandırılır. Meme bezindeki yangının şiddetine bağlı olarak klinik mastitisler; perakut, akut, subakut ve kronik mastitisler olarak sınıflandırılmıştır. Klinik mastitis formlarının hemen hepsinde yangısal cevabın karakteristik belirtileri olan memede şişme, ağrı, kızarıklık, sıcaklık artışı ve fonksiyon kaybı gibi lokal etkilerin görülmesiyle birlikte sistemik olarak hayvanda ateş, halsizlik, iştahsızlık gibi genel hastalık belirtileri de gözlenir. Bunun yanı sıra sütün kompozisyonunda da çeşitli yangısal reaksiyon ürünlerinin artması sonucu belirgin değişiklikler gözlenebilir (70).

Mastitisin ikinci ve klinik mastitislere göre daha önem arz eden formu subklinik mastitislerdir. Bu formdaki mastitisler, gizli seyretmesi, sütte ve memedeki değişikliklerin kolayca belirlenememesi, süresinin uzun olması, süt üretimini azaltması, süt bileşimini etkileyerek süt ürünlerinin kalitesinde ve randımanda düşmeye sebep olması, klinik mastitislere göre daha sık şekillenmesi ve infeksiyonun yayılmasında hastalıklı hayvanın portör olması gibi nedenlerden dolayı daha önemlidir (4, 59). Süt inekleri üzerinde yapılan bazı çalışmalarda, mastitis olgularının % 93-98'ini subklinik mastitislerin oluşturduğu tespit edilmiştir (42, 139). Reneau ve Packard (1991) ise mastitis vakalarının yaklaşık olarak % 70-80'inin subklinik vakalar olduğunu rapor etmişlerdir (135).

Ülkemizde mastitisin yaygınlığı ve neden olduğu ekonomik kayıplar konusunda kapsamlı istatistiksel veriler bulunmamakla birlikte, batı ülkelerinde yapılan araştırmalar süt sığırcılık işletmelerinde endemik olarak seyreden hayvan hastalıkları içerisinde en fazla ekonomik kaybın mastitis, özellikle subklinik mastitis nedeniyle (mastitisten kaynaklanan kayıpların % 70'i) olduğunu ortaya

koymuştur (21, 176). Mastitis, süt inekçiliğinde maliyet bakımından en pahalı olan sorunlardan birisi olup inek başına yıllık kayıp ortalama 150-300 dolar arasındadır. Süt verimindeki azalma, tedavi süresince sütün atılması, sütün kalitesinin bozulması, sürünün yenilenmesi, fazla işgücü ve tedavi giderleri bu maliyetin en önemli nedenleridir (35, 38, 113). ABD’de mastitisten kaynaklanan yıllık ekonomik kaybın 2 milyar dolar olduğu bildirilmiştir (38). Mastitis nedeniyle ortaya çıkan ekonomik kayıpların değerlendirildiği bir çalışmanın sonuçları ayrıntılı bir şekilde Tablo1’de verilmiştir (24).

Tablo 1. Mastitise bağlı yıllık kaybın nedenleri ve oranları (24).

Kayıp nedeni	Herbir inek için yıllık kayıp (\$)	Kayıp oranı (%)
Üretimin azalması	121	66
Tedavi süresince sütün dökülmesi	10,45	5,7
Sürünün yenilenmesi	41,73	22,6
Fazladan iş gücü	1,14	0,1
Tedavi masrafı	7,36	4,1
Veteriner hekim giderleri	2,72	1,5
Toplam	184,4	100

Mastitis kompleks etiyolojiye sahip bir hastalık olup farklı türden birçok etken memede yangıya sebep olabilmektedir. Bunlar arasında, fiziksel ve kimyasal ajanlar bulunabildiği gibi genel olarak meydana gelen mastitis vakalarının büyük çoğunluğuna infeksiyöz ajanlar sebep olmaktadır. Mastitislere neden olan mikroorganizmaların çoğunluğu insanlar için de patojendir. Dolayısıyla mastitisli hayvanlardan elde edilen ve pastörize edilmeden veya kaynatılmadan tüketime sunulan süt ve süt ürünleri aracılığıyla zoonotik

infeksiyonların insanlara bulaşması özellikle gelişmekte olan ülkelerde büyük bir halk sağlığı sorunudur (68). Şimdiye kadar yapılan epidemiyolojik çalışmalarda mastitis vakalarından 100'ün üzerinde farklı mikroorganizma izole edilmiştir (131, 170). Bu infeksiyöz ajanlar genellikle bakteriler olmasına rağmen viruslar, mantarlar ve mayalar da mastitiste rol oynayabilmektedir (131) Hastalığın etiolojisini % 90-98 oranında bakteriler, % 2-9 oranında mantarlar ve diğer etkenler oluşturmaktadır (131).

Meme hastalığına sebep olan infeksiyöz ajanlar içerisinde en yaygınları Stafilokoklar, Streptokoklar ve Koliformlar'dır. *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Mycoplasma* çok daha az rastlanılan etiolojik ajanlar olarak bildirilmiştir (97, 170). Bununla birlikte, mastitislerin % 95'ini *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) gibi bulaşıcı (kontagiyöz) mastitis etkenlerinin yanı sıra *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* gibi çevresel mastitis etkenleri meydana getirmektedir (60). Farklı mevsimler ve değişik yetiştirme şartlarında yapılan çalışmalara göre Gram pozitif bakteriler mastitisin etiolojisinde ilk sırayı almakta ve özellikle mastitislerin % 60-80'ini *S. aureus* tek başına oluşturmaktadır (60).

Bulaşıcı mastitis, ineklerin meme dokusunda bulunan patojenler tarafından meydana getirilir ve sağım esnasında insanlar, sağım ekipmanları, inekler ve muhtemelen sinekler tarafından infeksiyon yayılabilir. Bulaşıcı mastitis patojenleri arasında *S. aureus* ve *S. agalactiae* majör etkenler (Tablo 2) olarak tanımlanırlar (24, 68, 70).

Tablo 2. Süt ineklerinde bulunan majör mastitis patojenleri (24).

Bakteri	Mastitis Tipi	Primer Kaynak	Yayıma Şekli
<i>S. aureus</i>	Bulaşıcı	İnfekte meme	Sağım esnasında memeden memeye ve inekten ineğe
<i>S. agalactiae</i>	Bulaşıcı	İnfekte meme	Sağım esnasında memeden memeye ve inekten ineğe
Koliformlar:			
<ul style="list-style-type: none">• <i>E. coli</i>• <i>Klebsiella spp.</i>• <i>Enterobacter spp.</i>	Çevresel	Altık, su, dışkı, toprak,	Çevreden ineğe
Çevresel Streptokoklar:			
<ul style="list-style-type: none">• <i>S. uberis</i>• <i>S. dysgalactiae</i>	Çevresel	Altık, dışkı	Çevreden ineğe

3.2. STAPHYLOCOCCUS AUREUS MASTİTİSLERİ

3.2.1. Etiyolojik Ajan

S. aureus ilk olarak, 1884'te Rosenbach tarafından irinli yaralardan izole edilerek *S. pyogenes aureus* olarak isimlendirilmiştir (143). *S. aureus*; Gram pozitif koklar grubundaki *Stomatococcus*, *Planococcus*, *Micrococcus* cinsleri ile beraber *Micrococcacea* familyasında yer alan *Staphylococcus* cinsi içerisinde bulunmaktadır (143). *S. aureus*, bu cins içerisindeki ana patojen olup bunun dışında 28 farklı tür daha bulunmaktadır. Bu türler koagulaz enzimini üretme kabiliyetlerine göre iki gruba ayrılırlar. Koagulaz pozitif stafilocoklar *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi* ve *S. delphini*'yi içine alır. *S. hyicus*'un koagulaz aktivitesi değişken olup çoğunlukla koagulaz negatif stafilocoklar grubuna dahil edilmektedir (64).

S. aureus; Gram pozitif, hareketsiz, sporsuz, katalaz pozitif, oksidaz negatif ve 1 µm çapında yuvarlak şekilde bir bakteridir. Gerek lezyonlardan ve gerekse besi yerlerinden hazırlanan boyalı preparatlarda üzüm salkımı şeklinde kümeler halinde görünürler (84). Adi besi yerlerinde kolayca ürer ve 2-4 mm çapında düzgün koloniler oluştururlar. Önceleri renksiz görünümde olan koloniler ilk günden sonra pigment yaparak altın sarısı rengine dönüşür. Laboratuvarlarda 10-42 °C'de üreyebilmelerine rağmen optimum üreme ısısı 37 °C'dir. Sıvı besi yerlerinde bulanıklık ve çöküntü yaparak çoğalmaktadırlar. Sporsuz bakteriler içerisinde dış etkenlere ve dezenfektanlara karşı en fazla dayanabilen bakterilerdir. Kültürlerde +4 °C'de 2-3 ay, -20 °C'de 3-6 ay canlı kalabilmektedir. Etken antibiyotiklere farklı derecelerde duyarlı olmasına rağmen zamanla direnç kazanabilmektedir. İnaktivasyonu 60 °C'de yarım saatte, % 2'lik fenolde 15 dakikada olabilmekte, % 9'luk sodyum klorüre ve sakkarozaya tolerans gösterebilmektedir (84).

S. aureus birçok hayvan türünde ve insanlarda çeşitli infeksiyonlara neden olabilmektedir. Bu infeksiyonlar; birçok hayvanda gözlenen apseler ve irinli olgular, ineklerde çeşitli derecelerde mastitis olguları ve meme impetigosu, koyunlarda mastitis, kuzuların enzootik kene piyemisi, periorbital ekzema ve dermatitis ve benign follikülitis olguları, keçilerde mastitis ve dermatitis, domuzlarda mastitis, meme bezlerinin botriyomikozisi, nekrotize stafilokokal endometritis ve meme impetigosu, atlarda mastitis ve botriyomikozis, tavşanlarda yeni doğanlarda eksudatif dermatitis, apseler, konjunktivitis, kanatlılarda subkutan dokuların piyogranulamatöz olgusu, stafilokokal artiritis, sepsis ve omfalitis,

kedi ve köpeklerde piyoderma, piyometra, cystitis ve otitis eksterna'ya sebep oldukları bildirilmiştir (131, 132).

İnsanlarda ise, *S. aureus* hastane kaynaklı infeksiyonları oluşturan etkenlerin başında gelmektedir. Septisemi, osteomyelitis, meningitis, invazif endokarditis, toksik şok sendrom ve gıda kaynaklı zehirlenmeler *S. aureus*'un insanlarda meydana getirdiği infeksiyonların başlıcalarındandır (102).

3.2.2. Epidemiyoloji

3.2.2.1. Bulaşma

S. aureus mastitislerinin epidemiyolojisinin (rezervuarları, bulaşma yolları ve risk faktörleri) anlaşılması ile birlikte, birçok sürüde bu etkenin sebep olduğu vakaların etkili bir şekilde kontrol altına alınabileceği kanısı birçok araştırmacı tarafından kabul edilmiştir (94, 137). *S. aureus* deride ve mukoz membranların normal florasında mevcuttur ve dolayısıyla fırsatçı patojen olarak nitelendirilmektedir. Hayvanların iç ve dış stres faktörleri ile korunma mekanizmalarının bozulması veya memelerde meydana gelen yara, bere gibi portantrelerden girerek infeksiyona sebep olur. Mastitisli hayvanlar sütleriyle çok sayıda bakteriyi dışarı çıkarırlar (84, 137).

1961 yılında Davidson tarafından yapılan bir çalışmada, ineklerden elde edilen *S. aureus* izolatlarının lokalize olduğu tüm vücut bölgeleri rapor edilmiş ve meme içi infeksiyonlar için primer kaynağın infekte meme bezleri olduğu gösterilmiştir (137). Stafilokoklar sağlıklı meme bezlerine yerleşemezler, fakat meme ucu ve yakınında lezyonlar mevcut ise kolayca meme kanallarına kolonize olabilirler. Bir sürüdeki yeni *S. aureus* infeksiyonlarının en büyük kaynağı kronik

olarak infekte inekler ve infekte şekilde sürüye sokulan düvelerdir (137). Bundan dolayı inekten ineğe patojen bulaşmasını önlemek için alınacak tedbirler, mastitis insidansının azaltılmasında en önemli faktördür. Bununla birlikte, *S. aureus* kaynaklı mastitislerin eradikasyonunu sağlamak çok zordur ve yeni infeksiyonların meydana gelmesi daima olasıdır. Meme bezlerinin haricindeki kaynaklardan orijin alan infeksiyonlar mastitisin kontrol altına alınamaması problemine katkıda bulunurlar (183).

S. aureus; hava, ahırda kullanılan malzemeler, yemler, sağım ekipmanları, sığır, diğer hayvan türleri ve insan dahil bir çok kaynakta bulunabilir (137). Sağım salonlarında veya ahırlarda bulunan meme temizleme bezleri, süt kapları, sağım yapan kişilerin elleri ve sağım ekipmanları gibi bir çok araç ve ayrıca sineklerin bulaşmada rol oynadığı rapor edilmiştir (51, 54, 138). Süt sağım işleriyle uğraşan insanların ellerinin sürekli meme ile temas halinde olmasından dolayı *S. aureus*'un bulaşma mekanizmasında önemli rol oynadıkları kabul edilmektedir. Roberson ve ark. 1994'te yedi süt sağım çalışanınin dördünde *S. aureus* kolonizasyonunun mevcudiyetini tespit etmiş, 1998 yılında ise sağım işçilerinin burun boşluklarından elde ettiği izolatların mastitisli sütlerden elde edilen izolatlarla aynı tipte olduklarını saptamışlardır (137, 138).

Bir popülasyondaki patojenin yayılma yollarını ve kaynaklarını tam olarak saptamak için izolatların alt tür düzeyinde tiplendirilmesi gerekmektedir. Faj tiplendirme ve ribotiplendirme kullanılarak yapılan çalışmalarda inek sütü veya derisinden elde edilen *S. aureus* izolatları ile insan derisinden elde edilen izolatlar arasında epidemiyolojik olarak ilişki olduğu ortaya konulmuştur (83, 156). Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada ise

insan deri izolatları ile inek meme derisi izolatları arasında ilişki saptanmış, ancak inek sütlerinden elde edilen izolatlar ile insan derisi izolatları arasında bir benzerlik bulunamamıştır. Aynı zamanda PFGE sonuçlarına dayanarak sağım makinelerinin, meme derisi ve süt ile temasından dolayı bulaşmada önemli bir rol oynadığı ortaya konulmuştur (183). Roberson ve ark. (1998) ve Fox ve ark. (1991), faj tiplendirme yöntemiyle meme ucu derisinin buzağılardaki *S. aureus* infeksiyonlarının bulaşma kaynağı olduğunu ortaya koymuşlardır (51, 138). Buna karşılık Zadoks ve ark. (2002) tarafından genotipik metotlar kullanılarak yapılan bir çalışmada ise, meme ucu derisinin sığırların meme içi infeksiyonları için bulaşma kaynağı olarak önem taşımadığı ileri sürülmüştür (183).

Mastitis vakalarından izole ve identifiye edilen *S. aureus* izolatlarının çeşitli metotlarla tiplendirilmesi sonucunda; su ve yem gibi kaynaklar, hayvanların çeşitli vücut bölgeleri ve sinekler tarafından bir hayvandan diğerine bulaşmanın kaynaklanabileceği bildirilmiştir (94, 137, 138, 183). Roberson ve ark. (1998) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, su ve yemlerin inekler tarafından paylaşılabilen öğeler olması nedeniyle bulaşmada önemli bir kaynak olabileceği bildirilmiştir (138). Ancak, sığırların meme içi infeksiyonlarından elde edilen *S. aureus* izolatlarının, ekipmanlar ve diğer hayvan türlerinden elde edilen izolatlardan farklılık göstermesi, bunların epidemiyolojideki rollerinin henüz aydınlatılmadığını göstermiştir (138). Sağım makinelerinin de yanlış kullanılması ve dezenfeksiyonlarına dikkat edilmemesinden dolayı yeni *S. aureus* infeksiyonlarının oluşumunda rol oynayabilecekleri rapor edilmiştir (106, 138). Bunlara ilave olarak mastitisli sütlerin buzağılar tarafından tüketilmesi sonucunda, etkeni alan buzağuların emme ile *S. aureus* mastitisinin bulaşmasında rol

oynayabileceği belirtilmiştir (106). Sonuç olarak; *S. aureus* izolatlarından kaynaklanan mastitis vakalarının bulaşmasında daha henüz bilinmeyen birçok mekanizmanın rolü söz konusu olabilir (110).

3.2.2.2. Türkiye’de *S. aureus* Mastitislerinin Görülme Sıklığı

Mastitis, süt üreticiliğinin yapıldığı dünyanın her yerinde görülebildiği gibi ülkemiz açısından da çok ciddi bir problem olarak karşılaşılan bir enfeksiyondur. Özellikle *S. aureus*; süt veriminde önemli ölçüde azalma, somatik hücre sayılarında artış, tedavisi sınırlı ve maliyeti yüksek mastitisler oluşturmaktadır. Mastitislerin insidensini azaltmak için geliştirilen mastitis kontrol programlarına rağmen, *S. aureus* kaynaklı mastitis vakaları daima bir problem teşkil etmektedir (13, 44).

Elazığ ve civarında gerçekleştirilen bir çalışmada, 94 adet mastitisli süt örneğinde en sık izole edilen etken olarak % 30,8 oranında *S. aureus* bildirilmiştir (103). Arda ve İstanbulluoğlu (1978), devlete ait üç işletmedeki 1277 sağmal inekten toplanan süt örneklerini incelemiş ve %17 oranında mastitis saptamışlardır. Bu mastitis vakalarının % 95’inin subklinik mastitis tarzında olduğunu tespit eden araştırmacılar, izole ettikleri etkenler arasında en yüksek olarak %31,1 ile *S. aureus*’u bildirmişlerdir (11). Marmara bölgesi ve civarında gerçekleştirilen bir çalışmada ise, 1594 mastitisli inek sütünün bakteriyolojik olarak incelenmesi neticesinde etken izolasyonu gerçekleştirilen 1126 (% 70,6) süt örneğinin 316 (% 28,1)’sından *S. aureus* ve 260 (% 23,1)’ından *S. epidermidis* identifiye edilmiştir. Bu sonuçlara göre izole edilen etkenlerin yarısından fazlasının Stafilokokal kökenli olduğu tespit edilmiştir (161). Yavuz ve Esendal

(2002) ise Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden temin ettikleri 2726 mastitis şüpheli süt örneğinin 955 (% 35)'inin fossa somatik hücre sayımı ile mastitisli olduğunu tespit etmişlerdir. Bakteriyolojik yoklamalar sonucunda incelenen süt örneklerinin % 69,5'inden Gram pozitif kok bakteri izolasyonu gerçekleştirmişler ve bu bakteriler içerisinde en fazla sıklıkla gözlenen türün 311 (% 46,8) örnekten tanımlanarak *S. aureus* olduğunu bildirmişlerdir (178). Yine ülkemizde son yıllarda gerçekleştirilen bir çalışmada, Afyon bölgesindeki klinik ve subklinik mastitisli 126 inekten toplam 164 süt örneği mikrobiyolojik olarak incelenmiştir. İneklerin 119'unun subklinik, yedi tanesinin ise klinik mastitisli olduğu bildirilen çalışmada, % 40,1 oranında *S. aureus* tanımlanmıştır (80).

3.2.3. Patogenez ve Virulens

S. aureus mastitisinin patogenezini tam olarak açıklayamamasına rağmen, etkenin immün sistemden kurtulma kabiliyetlerini arttıran ve sonuç olarak meme bezlerinde canlı kalmayı sağlayan birçok mekanizma mevcuttur (7). *S. aureus*'un sahip olduğu virulens faktörlerinin tamamı meme içi infeksiyonlarıyla ilgili değildir. Virulens faktörleri, konakçı hücrelerine etkenin adhezyonu, doku tahribatının artırılması ve konakçı immün sistemden etkenin korunması veya etkenin yayılması gibi fonksiyonlarına göre üç grup altında toplanabilirler (9). Toksinler, enzimler, yüzey proteinleri, kapsül ve slime gibi virulens faktörlerinin lenfositlerin mitogenezini baskılamak ve nötrofil aktivitesinden korunmak gibi görevleri vardır (7, 9). Bunlara ilave olarak *S. aureus*; nötrofiller, makrofajlar ve meme epitel hücrelerinde canlılığını koruyabilir (5, 33, 63). Çeşitli virulens faktörleri sayesinde *S. aureus* immün sistemden gizlenebilmesinin yanı sıra immün sistemi

inhibe etme, antibiyotiklere direnç gösterme gibi özelliklere de sahiptir (33). Bu nedenle *S. aureus* mastitislerinin tedavisinde başarı oranının oldukça düşük olduğu bildirilmiştir (128, 148).

S. aureus mastitislerinde klinik belirtilerde gözlenen varyasyonlar (perakut, akut, subakut, kronik); *S. aureus* suşları arasındaki farklılıklar ve memelerin laktasyonel durumu veya memeye giren etken miktarıyla ilişkilidir (20). Erken laktasyon esnasında infeksiyon genellikle perakut formda şekillenir ve alfa toksinin akut nekrotize edici etkisinden dolayı memelerin gangreniyle ilişkili bir durum ortaya çıkar (132). Laktasyonun sonlarında oluşan yeni infeksiyonlarda ise genellikle sistemik bir reaksiyon gözlenmez ve akut veya kronik formda mastitis şekillenir (20, 70).

İneklerde akut ve kronik mastitisin patogenezi benzerdir. Her iki formda da alveollere uzantı azdır ve kanallarda toplanan bakteri proliferasyonu ile karakterize olan yangısal odakların görülmesi söz konusudur. Akut mastitiste küçük kanalların fibrin pıhtılarıyla hızlı bir şekilde tıkanması gözlenir. Akut form sıklıkla kalın pıhtılar içeren irinli bir sekresyon ve etkilenen dokuların şiddetli bir şekilde şişmesiyle karakterizedir. Genellikle yaygın bir fibrozis gözlenir. Yangı birkaç gün içerisinde azalmaya başlar ve kanalların etrafında meydana gelen doku proliferasyonları neticesinde bölgedeki dokularda atrofi ve blokaj gözlenir (132). Kronik veya subklinik mastitiste, somatik hücre sayısının yükselmesiyle birlikte etkilenen meme loblarından bakteriyel yayılma söz konusudur. Bakteriyel çoğalma genellikle süt toplayan kanallarda ve sınırlı bir şekilde alveollerde meydana gelir. Yangısal cevap sonucunda alveollerin atrofisi ve kanalların blokajı oluşur. Fagosit hücrelerinin yangısal bölgeye akını sonucunda apse formasyonları ve fibrozis

gelişmesi antibiyotiklerin penetrasyonunu engellemekle birlikte organizmanın etkili bir şekilde ortadan kaldırılmasını sınırlar (132). *S. aureus*, ineklerin memelerinde sadece bu şekilde reaksiyonlara neden olan bir bakteri değildir. Bakteriyel toksinler ve doku yıkımlanmasının etkisiyle toksemiye sonuçlanan durumlar da ortaya çıkabilir (20).

S. aureus, özellikle diğer Stafilokok türlerinden ayırt edilmesinde kullanılan koagulaz enzimine sahiptir. Yangısal bölgedeki koagulaz reaksiyonu sonucu fibrin benzeri pıhtılar oluşur. Bu pıhtılar lökosit hareketlerini inhibe eder ve konakçının immun sistem fagositlerinin hareketlerini engeller. Keza bu pıhtılar sekretör hücrelerin tahribatına yol açarak meme bezi kanallarındaki sütün boşaltılmasını önler (24). *S. aureus*'un virulensinde koagulaz enziminin rolü farelerde yapılan birçok çalışmada incelenmiştir. Fare meme bezlerine inokule edilen pürifiye koagulaz, meme epitellerinde hiperplazi ve alveol sekretörlerinde polimorf nükleer lökosit akınına neden olur (8). Kinsman ve ark. (1981) kimyasal mutagenesis yoluyla alfa toksin üreten suşlardan koagulaz negatif mutant suşlar elde etmişlerdir. Koagulaz kaybı fare meme bezleri için virulenste azalmaya yol açmıştır. Aynı zamanda koagulaz negatif suşlar memede orta derecede değişikliğe sebep olurken ana suşlar ise generalize nekroza sebep olmuşlardır (76). Koagulaz tek başına nekroze edici etkiye sahip değildir. Bu durum alfa toksin ile sinerjistik etkileşim sonucu ortaya çıkar (8). Phonimdaeng ve ark. (1990) benzer bir çalışmada, koagulaz negatif mutant suşlar ile bu sonuçları doğrulamada başarı sağlayamamışlar ve diğer virulens faktörleri kodlayan genlerde de mutasyonunun söz konusu olabileceğini belirtmişlerdir (122).

S. aureus alfa, beta, gama ve delta olarak isimlendirilen toksinlere de sahiptir. *S. aureus* alfa ve beta toksinleri virulenste büyük rol oynarlar. Alfa toksin sığır mastitislerinden izole edilen suşların yaklaşık % 20-50'sinde, beta toksin ise %75-100'ünde saptanmıştır (110). Tavşan ve farelerde yapılan çalışmalarda alfa ve beta toksinlerin *S. aureus* mastitislerinde önemli rol oynadığı rapor edilmiştir (25, 169). Pürifiye alfa toksinin tavşanlara injeksiyonu neticesinde doza bağımlı boyutta meme bezlerinin hemorajik nekrozu ve etken üremesinin yoğun olduğu durumlarda gangrenöz mastitisin şekillenebileceği bildirilmiştir (24). Bunlara ilave olarak, Foster ve ark.(1990) farelerde oluşturulan *in vitro* mastitis modellerinde, alfa toksin üreten *S. aureus*'un bulunduğu doku bölgelerinde makrofaj ve nötrofillerin yok olduğunu bildirmişlerdir (50). Beta toksin ise alveollerde ve meme kanallarında polimorf nükleer lökosit akını ve ödem gibi yangıyı eyleme geçiren durumlara sebep olur (169). Daha önce yapılan çalışmalarda hayvanlardan izole edilen *S. aureus*'larda en yaygın olarak bulunan toksin beta toksin olarak bildirilmiştir. Beta toksinin, deneysel *in vitro* fare mastitis modellerinde bakteriyel üremeyi arttıran bir faktör olduğu saptanmıştır (60). Bununla birlikte gama toksin ile birlikte çoğunlukla doku irritasyonuna sebep olduğuda rapor edilmiştir (50). Alfa ve beta toksinlerin meme dokularına adhezyon yeteneğini arttırmak suretiyle *S. aureus* virulensine önemli katkıda buldukları da bildirilmiştir (32).

Sığır süt örneklerinden izole edilen *S. aureus*'ların birçoğu *in vitro* şartlar altında lökositin üretirler (87). Bu toksin, hem polimorf nükleer lökositler hem de makrofajlar üzerine sitolitik etkiye sahiptir ve fagositozu engellemek suretiyle virulense katkıda bulunmaktadır (52, 57). Kronik mastitisli hayvanların süt ve

serumlarındaki antilökosidin antikorları ile infekte olmayan hayvanlarınkı kıyaslandığında aralarındaki farkın önemli olduğu saptanmıştır (88).

S. aureus'un hücre duvarı komponentleri de virulense katkıda bulunurlar. Ana komponent olan peptidoglikan, doku tahribatı sonucunda kronik-subklinik vakaların akut hale geçmesine yol açan hipersensitiviteyi geciktirmeye katkıda bulunur (57). İkinci önemli komponent olan teikoik asit, *in vivo* olarak teikuronik aside dönüşebilir. Hücresel ve humoral immun sistem bu dönüşümün ardından teikuronik asidi tanımlayamazlar (57). Bu durumun polimorfnükleer lökositlerin fagositozuna karşı direnci arttırdığı bildirilmiştir (52, 154). Protein A, IgG'nin Fc kısmını bağlayarak virulense katkıda bulunduğu düşünülen üçüncü önemli hücre duvarı komponentidir. Protein A'nın bu etkisiyle IgG tarafından *S. aureus* opsonizasyonu engellenir (52, 57). Pankey ve ark. (1985) spontone tedavi oranlarını arttıran ve somatik hücre sayısında azalmalara yol açan bir Protein A aşısı geliştirmişler ve *S. aureus* virulensinde Protein A'nın önemli bir role sahip olduğunu bildirmişlerdir (117).

S. aureus'un bazı suşları belirli koşullar altında kapsül veya pseudokapsül (Slime tabakası) formunda olabilir. Bu oluşumlar hücre duvarı komponentlerini kaplayarak, antikorlar ve komplement tarafından opsonizasyonu inhibe etmekte ve fagositozu engellemekte görev alır (107, 154). Son zamanlara kadar tüm *S. aureus* izolatlarının % 5'inden az kısmının bir kapsüle sahip olduğu düşünülmekteydi. Ancak *in vivo* üreme olduğunda bir kapsül veya pseudokapsül oluşumunun çok daha yüksek oranlarda şekillendiği bildirilmiştir (57).

S. aureus meme içi infeksiyonlarının oluşmasında etkili olduğu konusunda düşünülen virulens faktörlerin bir diğeri ise süperantijenlerdir. Araştırmalar,

süperantijenlerin hücrel immun sistem üzerine zararlı etkilere sahip olduğunu ve spesifik immunité için gerekli olan hücre popülasyonunu seyrelttiğini göstermiştir (90). En iyi bilinen süperantijen Stafilokokal enterotoksin B'dir. İneklerde meme içi infeksiyonlara neden olan *S. aureus*'lar arasında süperantijenlere sahip olan izolatların işlevlerinin anlaşılması için ilave çalışmalar yapılması gerektiği bildirilmiştir (52).

S. aureus'un sahip olduğu ve virulensle ilişkili olan diğer iki özelliği; β -laktamaz (penisilinaz) enziminin varlığı ve L-formlarına dönüşmedir (110). β -laktamaz *S. aureus*'un bazı suşlarında bulunan ve β -laktam tipi antibiyotiklere karşı β -laktam halkasının hidrolizine sebep olan bir enzimdir. β -laktamaz enzimi bir sürüden diğerine değişkenlik gösterebilir. Bu, ineğin kendisinden ve antibiyotik tedavi alışkanlıklarından kaynaklanan bir durumdur. Bir çalışmada, *S. aureus* tarafından penisiline karşı oluşturulan direncin sürüler arasında % 0 ile % 60 oranları arasında değiştiği bildirilmiştir (114). *S. aureus* L-formlarına da neden olabilir. Hücre duvarı sentezini bozan ve hücrel bütünlüğe zarar veren antibiyotikler tarafından yok edilmeyi önlemek amacıyla canlı kalma dönemine bir geçiş hareketi olarak *S. aureus*'un L-formuna dönüştüğü düşünülmektedir. L-formları uygun koşullar geliştiği durumlarda etkene, infeksiyon şiddetini artırma, meme bezlerine tutunma ve antibiyotik tedavisine karşı koyma gibi yararlar sağlayabilirler (115).

S. aureus bakterisinin sahip olduğu hyaluronidaz, fosfotaz, nükleaz, lipaz, katalaz, stafilokinaz ve proteaz gibi çok sayıda ekstrasellüler enzimin de mastitisin patogenezinde rol oynadıkları bildirilmiştir. Bu enzimlerin, etkenin

meme dokusuna penetrasyonuna ve sütte çok sayıda ve hızlı şekilde üremesine katkıda buldukları tahmin edilmektedir (7, 110, 154).

3.2.4. Klinik Belirtiler

İneklerde *S. aureus* mastitisleri genellikle perakut formdan subklinik forma kadar değişen derecelerde gözlenebilir. Perakut form çoğunlukla dramatik bir şekilde son bulmasına rağmen, en önemli ekonomik kayıplar kronik-subklinik form tarafından oluşturulur (132).

Perakut form, genellikle buzağılamayı takiben birkaç gün içerisinde ortaya çıkar ve mortalitesi yüksektir. 41-42 °C yi bulan bir ateş, hızlı kalp atışı, anoreksi, depresyon, rumen hareketlerinde azalma, kaslarda güçsüzlük ve sırt üstü yatma gibi şiddetli sistemik reaksiyonlar gözlenebilir. Sistemik ve lokal reaksiyonlar ani olarak gelişir. İlk sağımda normal gözüken inek daha sonra birden bire yatabilir ve koma halinde gözlenebilir. Etkilenen memeler aşırı şişmiş, sert, dokunulduğunda ağrılı olduğu ve bundan dolayı topallık gözleendiği bildirilmiştir. Memede morarma gelişebilir ve meme ucunda başlayan bu durum daha sonra meme loblarını da kaplayabilir. Etkilenmeyen meme lobları da genellikle şişmiştir ve meme venlerinin trombozu nedeniyle meme loblarının ön tarafında yaygın bir subkutan ödem meydana gelebilir. Toksemi şayet erken oluşursa genellikle ölümler son bulur (3, 20, 132).

Akut mastitisler, genellikle erken laktasyon dönemlerinde meydana gelir. Memelerin şiddetli şekilde şişmesi ve sütte irinlerin veya kalın pıhtıların görülmesi söz konusudur. Akut form; hayvanlarda ateş, anoreksi, depresyon, zayıflama gibi sistemik bulguların yanı sıra hastalıklı meme bölgesinin şişmesi,

ağrı, ödem ve sıcaklık artışı gibi yangı semptomlarıyla karakterizedir. Ağrıdan dolayı tek taraflı topallık görölebilir. Böyle durumlar yaygın bir fibrozis ve ağır fonksiyon kaybı ile sonuçlanır (15).

Bir sürüdeki ineklerin yaklaşık % 50'si subklinik mastitis formunda olmasına rağmen sadece birkaçı yeterli klinik belirtiler gösterdiğinden yetiştiricilerin böyle vakaları gözden kaçırma ihtimalleri oldukça fazladır. Kronik-subklinik formda başlangıçta memede ve hayvanın genel durumunda bir bozukluk fark edilmez. Fakat zamanla birçok vakada sütün yapısında değişiklikler meydana gelir. İlk sütte sulu bir görünüm veya sütte pıhtı oluşumu ile birlikte memelerde atrofi ve yavaş şekilde gelişen sertleşmeler gözlenebilir. Sütteki hücre miktarı artmıştır, ancak indirekt testler veya memelerin palpasyonu düzenli şekilde yapılmazsa memeler fonksiyonlarını kaybedinceye kadar hastalık belirlenemez. Süt salgısı gün geçtikçe azalır ve sonunda memede körelme ve sütün tamamen durması gözlenebilir (3, 20).

3.2.5. Tanı

Mastitislerin teşhisinde genellikle klinik tanı yeterli değildir. Mastitise neden olan etkenin izolasyonu ve identifikasyonu gereklidir. Mastitisin indirekt teşhisinde rutin olarak kullanılan birçok metot olmasına rağmen, en pratik uygulama Kaliforniya Mastitis Testi (CMT)'dir (141). CMT yönünden pozitif olan süt örneklerinden etken izolasyonuna gidilmesi durumunda genellikle izolasyon oranı oldukça yüksektir. Ancak bakteriyel etkenler dışındaki bazı faktörlerin de somatik hücre sayısını arttırması nedeniyle CMT pozitif süt örneklerinden etken üretilmemesi ortaya çıkabilir. Etkenin viral olması, doğuma

yakın dönemlerde epitel dokunun kendini yenilemesi, genel bir enfeksiyon nedeniyle lökositosis oluşumu ve meme derisi ve kanalının normal florasında bulunan bakteriyel etkenlerin bazı durumlarda mastitis oluşturmadan hafif irritasyonlara sebep olması gibi faktörler yanıltıcı CMT sonuçlarının ortaya çıkmasına neden olabilir (11).

CMT ile tespit edilen somatik hücre sayısı incelenen hayvanın mastitisli olması yönünde bir ön izlenim oluşturur. Böyle bir durumdan sonra mastitise neden olan etkenin identifikasyonu amacıyla laboratuvar tanısı gereklidir. Meme bezi patojenlerinin identifikasyonu amacıyla laboratuvarlarda kullanılan referans test *in vitro* kültür işlemi ve biyokimyasal testler ile identifikasyondur (136). Ancak, bu teknik ile yapılan identifikasyon zahmetli, zaman alıcı ve bazen yetersiz kalmaktadır. İzolatların üretilmesi ve identifikasyonu için en azından 2-3 güne ihtiyaç duyulması ve bazı yakın ilişkili türlerin ayrımında biyokimyasal identifikasyon testlerinin yetersiz kalması söz konusudur. Erken tanı metotlarının geliştirilmesi, daha hızlı şekilde uygulanacak doğru antimikrobiyal tedaviye bağlı olarak normal süt yapımına geri dönüş zamanında azalma ve tedavi oranlarının artmasına yardımcı olabilir. Patojen etkenin identifikasyonu, sadece antimikrobiyal tedavi amacıyla değil aynı zamanda sürü düzeyinde enfeksiyonun izlenmesi ve kontrolü amacıyla da önem arz eder (100).

S. aureus mastitislerinin kültür işlemi neticesinde identifikasyonlarının gerçekleştirilebilmesi için, öncelikle aseptik şartlar altında alınan süt örneklerinin laboratuvarında uygun besi yerlerine ekimlerinin gerçekleştirilmesi gerekir. Sütün direkt bakteriyoskopisi ile sütte Gram pozitif kok şeklindeki mikroorganizmaların görülmesi neticesinde etkenin *S. aureus* olduğunu söylemek mümkün değildir

(84). *S. aureus* mastitisinden şüphelenilen inekten alınan süt örnekleri, kanlı agar başta olmak üzere farklı besi yerlerine ekilerek aerobik şartlar altında kolay bir şekilde etken izolasyonu gerçekleştirilebilir. İzolasyon sonucunda *S. aureus* şüpheli ve mikroskop altında Gram pozitif üzüm salkımı şeklinde koklar halinde bulunan mikroorganizmaların, tür düzeyinde identifikasyonu amacıyla katalaz, oksidaz, oksidasyon-fermentasyon, mannitol fermentasyonu, DNase, protein A ve patojen *S. aureus*'ların identifikasyonunda primer test olarak kabul edilen koagulaz testinin sonucuna bağlı olarak isimlendirilmeleri mümkündür (131). Klinik ve subklinik mastitis vakalarından elde edilen *S. aureus* izolatlarının büyük bir çoğunluğu koagulaz pozitifdir. Koagulaz negatif Stafilokoklar meme dokusunda mikroskobik lezyonlar ve bazı vakalarda sütte lökosit sayısında önemli artışlara neden olmalarına rağmen *S. aureus* kadar patojenik olmayıp minör patojenler olarak isimlendirilmektedirler (126). *S. aureus* dışında koagulaz pozitif özellik gösteren Stafilokok türleri bulunmasına rağmen, mastitisli sütlerden izole edilen etkenlerde saptanan koagulaz pozitifliği, bakterinin *S. aureus* olarak isimlendirilmesi için birçok mikrobiyoloji laboratuvarı tarafından yeterli olarak kabul edilmektedir (56). Bununla birlikte bazı çalışmalarda koagulaz testinin tek başına tür identifikasyonu için yeterli olmayacağı ve *S. intermedius* ve *S. hyicus* gibi türlerin *S. aureus*'tan ayrımı için DNase ve Clumping faktör testlerinin de yapılmasının gerekliliği bildirilmiştir (178).

In vitro kültür metodunun uygulanması esnasında bazı ticari firmalar tarafından hazırlanan StaphTrac, Minitex Gram Positive Set ve API Staph gibi identifikasyon kitlerinden de faydalanmak mümkündür (131). Keza *S. aureus*'ların teşhisi amacıyla sığır mastitislerinden elde edilen sütlerdeki antikor

titreleri ELISA yöntemiyle saptanmaya çalışılmış, ancak antikor titreleriyle infekte bakteri arasında ilişki kurulmasında güçlüklerle karşılaşmıştır (23).

In vitro kültür metodunun yukarıda belirtilen dezavantajlara sahip olması, patojen etkenlerin identifikasyonunda sensitivite ve spesifitesi yüksek olan ve çok daha kısa sürede sonuç veren nükleik asit tabanlı moleküler metotların kullanılmasına yol açmıştır (136). Bu amaçla polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak özellikle etkenin 16S ve 23S rRNA bölgelerine spesifik türe özgü primerler ile *S. aureus* identifikasyonu gerçekleştirilmiştir (49, 136). PCR ile çok sayıda numunenin etkene spesifik primerler yardımıyla çok kısa süre içerisinde identifikasyonunun gerçekleştirilmesi mümkündür. Aynı zamanda PCR metodunda, kültür işlemine gerek kalmadan gerçekleştirilen, direkt numuneden DNA ekstraksiyonu ile doğru bir şekilde etken identifikasyonu yapmak mümkündür (136). Bununla birlikte, son zamanlarda multipleks PCR gibi yöntemler ile birden fazla etkenin aynı anda saptanabilmesine imkan tanıyan metotlar geliştirilmiştir. Son yıllarda geliştirilen spesifik PCR ve multipleks PCR metotlarının *S. aureus* ve diğer mastitis etkenlerinin identifikasyonu için *in vitro* kültür metoduna alternatif metotlar olarak kullanılabilceği kanısına varılmıştır (123).

3.2.6. Sağaltım, Koruma ve Kontrol

S. aureus kaynaklı mastitislerin tedavisinde infeksiyonun şiddetine göre meme içi veya parenteral yolla farklı antibiyotik uygulamaları kullanılabilir. Laktasyon döneminde ortaya çıkan akut mastitislerin hızla tedavisine başlanması gerekir. Böyle durumlarda bakteriyolojik inceleme sonuçları beklenmeden uygun

geniş spektrumlu bir antibiyotik seçilerek yüksek dozlarda tedaviye girilir. İlaç uygulamasının 24 saat aralıklar ile üç kez tekrar edilmesi sonucunda yüksek oranlarda başarı sağlanabilir. Bununla birlikte laktasyon döneminde tedavisi gerçekleştirilen mastitis olgularının tümüyle iyileşmesi çok geciktiğinden dolayı kuru döneme geçildikten sonra da sağaltıma devam edilmesinde yarar vardır (157).

Perakut mastitis olgularında ise gangrenöz bir tablonun görülmesi durumunda ilk işlem olarak memenin tamamen boşaltılması gereklidir. Ayrıca hem parenteral hem de meme içi antibiyotik uygulamaları ile infekte meme bölümü ve hayvan kurtarılabilir. Aynı zamanda toksemiye karşı antihistaminikler ve elektrolit sıvılar verilmelidir (157). Sublinik *S. aureus* mastitislerinde ise 24 saat aralıklarla üç doz halinde uygulanan meme içi antibiyotik preparatları ile % 30-60 oranında başarı sağlanabileceği bildirilmiştir (157).

Bu hastalığın antibiyotik tedavisi ile kontrol altına alınması mümkün değildir, sadece infeksiyonun süresi kısaltılabilir. Sol ve ark. (1997) 10 sürüdeki sublinik *S. aureus* mastitisli 89 ineğin tedaviye cevap verme oranını % 34 olarak tespit etmişlerdir (149). Pyörälä ve Pyörälä (1997) ise Finlandiya’da klinik mastitis vakalarının oranını % 36 olarak tespit etmişler ve bunların sadece % 39’unun tedaviye yanıt verdiklerini ortaya koymuşlardır (129). Kuru dönemin ilk iki haftası ve son 7-10 günü ineklerin infeksiyona yakalanmaları açısından en duyarlı oldukları dönemdir. İnekler kuru dönemde eğer tedavi edilmezlerse spontane iyileşme oranlarının oldukça düşük olduğu görülmüştür (77).

Genel olarak mastitise neden olan tüm etkenlerin tedavisinde uygulanacak antibiyotiklerin seçimi oldukça önem arz eder. Bakterilerin antibiyotiklere karşı

duyarlılık ve dirençlilik durumları sürüden sürüye, bölgeden bölgeye ve ülkeden ülkeye göre değişebilir. *S. aureus* mastitislerinin tedavisinde etkili antibiyotiğin seçimi için yapılacak antibiyogram testleri ile tedavide yüksek başarı elde etmek mümkündür (15). Kuyucuoğlu ve ark. (2001) yaptıkları bir çalışmada mastitisli sütlerden izole edilen etkenlerin antibiyotiklere duyarlılıklarını saptamış ve *S. aureus* izolatlarının % 82,2 oranında amoksisilin-klavulanik asite en yüksek seviyede duyarlı olduklarını belirlemişlerdir (80).

S. aureus mastitislerinin kontrolü için beş amaç gerçekleştirilmelidir. Bunlar; sağım sonrası memelerin dezenfeksiyonu ile yeni infeksiyonların önlenmesi, memelerin temizlenmesinde bireysel malzemelerin kullanımı, sağım tekniğinin tam anlamıyla usulüne uygun şekilde gerçekleştirilmesi, infekte memeye sahip hayvanların antimikrobiyal tedaviye tabi tutulması ve infekte hayvanların ayrılmasıdır (26).

S. aureus mastitislerinin kontrolü amacıyla en kolay ve çok daha ekonomik olan yol olarak uygun sağım prosedürleri ve hijyen kabul edilir (66). Sağım esnasında dikkat edilecek temizlik oldukça önemlidir. Suyun az kullanılması ve sağım öncesi meme antisepsisi yeni *S. aureus* infeksiyonlarının ortaya çıkmasını azaltır (108). Buna ilaveten, sağım sonrası meme antisepsisi de *S. aureus* gibi bulaşıcı etkenlerin azaltılmasına katkıda bulunmak bakımından önemli bir uygulamadır. Natzke ve ark. (1972) ve Oliver ve Mitchell (1984)'in bildirdiklerine göre; sağımdan sonra devamlı antisepsi uygulanan ve kuru dönemde penisilin-streptomisin tedavisi uygulanan ineklerde majör mastitis patojenlerinde sırasıyla % 75 ve % 45 oranında azalmalar gözlenmiştir (105, 112).

Sadece sağım sonrası antisepsi uygulamasının yeni mastitislerinin oluşumunu % 50 oranında azalttığı bildirilmiştir (108).

Yeni mastitislerin oluşumunu azaltmak için başvurulan bir başka durum ise infekte hayvanların izolasyonudur. Wilson ve ark. (1995) infekte hayvanların sürüden izolasyonlarının sağlanması ile *S. aureus* prevalansında % 29,5'ten % 16,3'e varan bir azalma olduğunu tespit etmişlerdir (175). Diğer bir kontrol metodu, gebe ineklerin ve kurudaki ineklerin laktasyon dönemi ve kuru dönemi içeren dönemlerde antibiyotik tedavileridir. Laktasyon dönemi tedavisi ile birlikte *S. aureus* bakterin ihtiva eden aşı uygulamaları neticesinde sütteki somatik hücre sayılarında ml.'de 492,000'den 84,000'e varan bir düşme gözlenmiştir (145). Laktasyon dönemi meme tedavisi ile birlikte parenteral antibiyotik uygulamaları sonucunda ise meme loblarında tedavide başarı oranı % 51,4, hayvan başına ise % 48 olarak tespit edilmiştir (116). Kuru dönem tedavisi yapılan yetişkin ineklerde yeni mastitislerden % 50-80 oranında korunma sağlandığı bildirilmiştir (106).

Son yıllardaki biyoteknolojik gelişmeler, *S. aureus* mastitisinin kontrolünde yeni metotları ortaya koymuştur. Kerr ve ark. (2001) farelerde lysostaphin geninin ekspresyonunu gerçekleştirmişlerdir (75). Lysostaphin Stafilokokların hücre duvarını lize edebilir. Meme içi inokulasyon yolu ile herbir meme lobuna 10^4 cfu/50μl oranında *S. aureus* ile infekte edilmeye çalışılan farelerde yüksek seviyelerde salgılanan lysostaphin nedeniyle infeksiyon meydana gelmediği gözlemlenmiştir, ancak benzer çalışmalar bugün itibariyle henüz sığırlarda rapor edilmemiştir (75). Son yıllarda kullanılan moleküler biyoloji metotları da bakterilerin virulensleri ve epidemiyolojileri hakkında önemli bilgiler

ortaya koyarak sürülerde spesifik mastitis kontrol stratejilerinin geliştirilmesine yardımcı olmaktadır (130, 183).

Mastitis kontrol programları, özetle mastitislerin insidensini azaltmayı amaçlamaktadır. Bazen kullanılan metotların maliyetinin yüksek olması, süt bileşimini ve kalitesini bozması ve hatta bazı vakalarda yetersiz kalması gibi durumlar nedeniyle istenilen sonuçlar alınamamaktadır (147). Stafilokokal mastitislerin kontrolü için yapılan aşı çalışmalarında; subklinik ve klinik mastitislerden izole edilen *S. aureus* suşları kullanılmakta ve çeşitli metotlar ile inaktive edilen bakterin, zayıflatılmış canlı bakteri, hücre duvarı ekstraktı, hücre duvarı Protein A'sı, inaktif alfa ve beta toksoidleri ve kapsüler polisakkaritler kullanılmaktadır (59). Mastitislerin aşılama ile eradikasyonu ve kontrolü daima ulaşılması güç bir hedef olarak görülmektedir. Aşılama ile leptospirozis, brusellozis gibi hastalıkların eradikasyonu mümkün olabilirken, mastitiste yeni meme içi infeksiyonların oranının azaltılması, mastitis şiddetinin hafifletilmesi ve süresinin kısaltılması başarılı bir sonuç olarak kabul edilmektedir (177). *S. aureus* aşı çalışmalarında, aşılanan ve aşılanmayan hayvanlarda yeni infeksiyon oranında herhangi bir azalma olmadığı, ancak aşılananlarda uygulanan sağaltımın daha etkili olduğu ve meme sağlığı ile ilgili tüm parametreler bir araya getirildiğinde laktasyon döneminde uygulanan aşının etkin bir koruma sağlayabileceği ve problemlili sürülerde uygulamanın yararlı olabileceği bildirilmiştir (109).

Türkiye'de Stafilokokal mastitislerin kontrolü ve tedavisi için yeterli düzeyde araştırma mevcut değildir. Ülkemizde son yıllarda gerçekleştirilen Stafilokokal mastitislere yönelik aşı çalışmalarında, yeni *S. aureus* mastitis oranlarında azalma, şekillenen mastitislerin hafif şiddetli seyretmesi ve mevcut

infeksiyonların kendiliğinden iyileşme oranlarının artması ve süt ineklerinin 6 ay korunabildiği bildirilmiştir (59).

Son yıllarda özellikle *S. aureus* mastitisi başta olmak üzere bakteriyel kaynaklı mastitislerin tedavisinde karşılaşılan güçlükler, antibiyotiklere dirençli suşların ortaya çıkması, süt ve süt ürünlerinde gittikçe artan miktarlarda görülen antibiyotik kalıntıları ve bunların yarattığı halk sağlığı sorunları, mastitislerin kontrol ve tedavisinde yeni strateji ve yöntemlerin geliştirilmesini zorunlu hale getirmiştir. Bu yeni gelişmeler arasında; mastitise dirençli hayvan tiplerinin geliştirilmesi, meme dokusunun yerel savunma mekanizmalarını uyaran ve güçlendiren preparatların mastitis tedavisinde kullanılması, meme dokusu savunma sistemlerini aktive edici preparatların kullanımı, karbonhidrat polimerlerinin mastitislerin tedavisinde kullanımı ve yeni nesil antibiyotiklerin mastitislerin profilaksi ve sağaltımında kullanılması sayılabilir (59, 68).

3.3. STREPTOCOCCUS AGALACTIAE MASTİTİSLERİ

3.3.1. Etiyolojik Ajan

Streptococcus terimi cins olarak ilk defa 1884 yılında Rosenbach tarafından insanlardaki suppuratif lezyonlardan izole edilen zincir şeklindeki koklar için kullanılmıştır. Bergey's Manual'e göre *Streptococcus* cinsi, Gram pozitif koklar grubunda *Deinococcaceae* familyasına ait bir cins olarak tanımlanmıştır (143). İlk *S. agalactiae* izolasyonu ise 1887 yılında Nocard ve Mollereau tarafından sığırlarda mastitise sebep olan etkenler üzerinde yaptıkları bir çalışmada gerçekleştirilmiş ve "*Streptococcus nocardii*" olarak isimlendirilmiştir. Daha sonraları bu isimlendirme *S. agalactiae* olarak netlik

kazanmıştır (141). Streptokokların taksonomisi ile ilgili ayrıntılı çalışmalar; kültürel, biyokimyasal ve serolojik özellikler yönünden farklı sınıflandırmaların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Son yıllara kadar yaygın olarak kullanılan sınıflandırma, Lancefield tarafından 1933 yılında hücre duvarının polisakkarit yapısındaki farklılıklara dayanılarak yapılan ve A'dan V'ye kadar değişen harflerle adlandırılan serolojik gruplandırma olmuştur. *S. agalactiae* bu gruplandırma içerisinde Grup B Streptokokların (GBS) tek temsilcisi olarak yer bulmuştur (43, 143). Son yıllarda *Streptococcus* üzerine yapılan taksonomik çalışmalarda, bu cinsteki türlerin yedi ana grup (Piyojenik, Bovis, Salivarius, Mutans, Anginosus, Mitis ve Sanguinus) içerisinde sınıflandırıldığı ve 30'dan fazla *Streptococcus* türünün bu gruplar içerisinde dağılım gösterdiği bildirilmiştir (146). *S. agalactiae* Piyojenik Streptokoklar grubuna dahil edilmektedir.

Streptokoklar; Gram pozitif, genellikle yuvarlak veya oval şekilli, çapları 2 µm'den küçük, hareketsiz, sporsuz, katalaz ve oksidaz negatif ve kapsüllü bakterilerdir. Anilin boyaları ile iyi boyanırlar. Kùltürler eskidikçe Gram negatif görünüme sahip olabilirler. Yaşadıkları ortama bağlı olarak 5-6'dan 40-50'ye kadar değişebilen uzun zincir şekilleri gösterebilirler. Optimum çoğalma ısı dereceleri 37 °C'dir. Genellikle sıvı besi yerlerinde uzun zincir, katı besi yerlerinde kısa zincir veya diplokok olarak görünürler. *S. agalactiae* adi besi yerlerinde zayıf üremesine rağmen; kan, kan serumu ve glikoz ile zenginleştirilmiş besi yerlerinde 1-2 mm büyüklüğünde S tipi şeffaf ve parlak koloniler oluşturur. Bazı suşlarda sarı-turuncu-kırmızı renkte koloni oluşumu gözleendiği bildirilmiştir (143, 146). Kanlı agarda hemoliz yapar, sıvı besi yerlerinde gelişen zincirler dipte çöküntü oluşturur. Hem aerobik hem de

fakültatif anaerobik koşullarda üreyebilen Streptokoklar çeşitli şekerleri (glukoz, galaktoz, laktoz, sakkaroz ve maltoz) fermente etme özelliğine sahiptirler.

S. agalactiae dış etkenlere karşı fazla dayanıklı değildir. Pastörizasyon ile aktivitesini kaybeder (84). *S. agalactiae* biyokimyasal özellikleri yönünden CAMP (Christie Atkins-Munch Petersen) pozitif, eskülin negatif ve Na-hippurat pozitif olması ile diğer Streptokok türlerinden ayırt edilmektedir (70). İnsan ve hayvanlardan izole edilen *S. agalactiae* suşları antijenik ve biyokimyasal özellikleriyle birbirinden ayırt edilemezler. Ancak sığır suşları laktozu genelde fermente ederken salisini nadiren fermente etmektedir. İnsan suşları ise tam aksine salisini genelde fermente ederken laktozu nadiren fermente etmektedirler (46).

S. agalactiae hayvanlarda özellikle sığır, koyun ve keçilerde zorunlu meme içi bir bakteri olduğundan dolayı kronik kataral mastitis'ten sorumludur. Ayrıca, köpeklerde solunum sistemi infeksiyonlarından, kedilerde üriner sistem infeksiyonlarından *S. agalactiae* izolasyonu yapıldığını bildiren araştırmaların mevcudiyetinin yanı sıra domuz, at, tavşan gibi evcil hayvanların oral infeksiyonlarından ve kertenkele, kumru, balık, kurbağa, fare, deve ve fil gibi diğer egzotik hayvanlardan da izolasyonlarının gerçeleştirildiğini bildiren çalışmalarda mevcuttur (43).

İnsanlardaki *S. agalactiae* infeksiyonları GBS infeksiyonları olarak tanımlanmaktadır. İnsanlarda GBS'lerin neden olduğu infeksiyonlar yeni doğanlarda ve erişkinlerde gözlenen infeksiyonlar olmak üzere iki kısımda incelenir. Neonatal erken dönem infeksiyonları genellikle pnömoni, sepsis ve meningitis ile karakterizedir. Neonatal geç dönem infeksiyonları ise pyojenik meningitis ile karakterize ve genellikle ölümlü son bulan infeksiyonlara sebep

olur. Erişkinlerdeki GBS infeksiyonları ise daha çok gebe ve doğum yapmış kadınlarda gözlenmektedir ve endometritis, üriner sistem infeksiyonları ve sezeryan operasyonu esnasında ortaya çıkan yara infeksiyonları ve bunlara bağlı bakteriyemi ve septisemi ile karakterize infeksiyonlar görülmektedir (46, 179). İnsan ve hayvanlar arasında görülen *S. agalactiae*'lara bağlı kros infeksiyonların epidemiyolojik yönden değerlendirildiği Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün 1981 yılındaki bildirgesinde, bu etkenin neden olduğu infeksiyonlar zoonoz olarak bildirilmiştir (179).

3.3.2. Epidemiyoloji

3.3.2.1. Bulaşma

S. agalactiae zorunlu meme içi bir bakteri olup sadece meme loblarında üreyebilir ve yaşayabilir. İdeal şartlar altında bu etken çevrede birkaç günden fazla canlı kalmaz. Bu nedenle infekte meme lobları *S. agalactiae*'nın tek kaynağı olarak tanımlanmıştır. Dolayısıyla sürüye yeni dahil edilen inekler ve ilk buzağlarını veren düveler *S. agalactiae* ile oluşacak yeni infeksiyonların primer kaynaklarıdır. Bununla birlikte bu bakteri ile temas eden materyallerde etkenin 1-20 gün arasında değişen periyotlarda canlı kalabildiği ve bu şekildeki bulaşık materyalin de ineklerde infeksiyon için önemli bir bulaşma kaynağı olabileceği ileri sürülmüştür (20, 141).

S. agalactiae mastitislerinin eradikasyonu için genel dezenfeksiyon tekniklerinin uygulanmasının gerekliliği anlaşıldıktan sonra, çevresel kontaminasyonun infeksiyondaki rolü daha net bir şekilde açıklanmıştır (20). İnfeksiyon genellikle sağıım esnasında meydana gelir ve hayvandan hayvana

infeksiyonun bulaşması en yaygın olarak sağım makinaları, sağım yapan kişilerin elleri, meme kurulama bezleri ve muhtemelen altlık tarafından oluşan kontaminasyon sonucunda meydana gelir. İnfekte meme lobuna sahip bir ineğin buzağısı tarafından emilmesinden sonra başka bir ineği emmesi sonucu oluşan bulaşmalara oldukça sık bir şekilde rastlanılmaktadır. Hiç sağılmayan düvelerin infeksiyona nasıl yakalandığını açıklamak zor olsa da, bu durumun muhtemel infeksiyon kaynağı olan cansız materyaller ile temas veya infekte sütlerin emme ile buzağılar tarafından alınmasıyla oluşabileceği ileri sürülmüştür (20).

Onüç çiftlikte yapılan geniş bir çalışmada; *S. agalactiae*'nin canlı olarak kalabilecekleri materyaller incelenmiş ve % 38 oranında meme bezlerinde, % 38 süt sağım işçilerinin ellerinde, % 20 sağım esnasında kullanılan bezlerde ve % 22 oranında hava, kaplar, zemin, dışkı ve çeşitli ekipmanlarda bulunduğu rapor edilmiştir (141). Memelerdeki yaraların da *S. agalactiae*'nin bulaşmasında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. İki farklı çiftlikte yapılan bir araştırmada; meme yaraları bulunan ineklerden % 61 ve % 81 oranında *S. agalactiae* izolasyonu gerçekleştirilirken, memede yara bulunmayan ineklerden ise % 15 ve % 17 oranlarında izolasyon bildirilmiştir (141).

Van den Heever ve Erasmus (1980) insanlardan ve sığırlardan elde ettikleri *S. agalactiae* izolatlarını serolojik ve biyokimyasal özellikler yönünden karşılaştırdıklarında, insanlardaki bazı infeksiyonların sığır sütlerinden kaynaklanabilme ihtimalinin söz konusu olduğunu ileri sürmüşlerdir (166). Brglez (1981) ise süt sığırcılığı yapılan 21 çiftlikte yaptığı bir araştırmada, sığırların % 22'sinin *S. agalactiae* ile infekte olduklarını ve bu çiftliklerde çalışan 17 işçide de sığırlardan elde edilen izolatlarla benzer serotiplere sahip *S. agalactiae* izole

ettiğini bildirmiştir (27). *S. agalactiae* mastitislerinin insidensi infekte bir sürüde ineğin laktasyon yaşı ile birlikte artar. Dördüncü ve daha yüksek laktasyon dönemlerinde yaklaşık olarak % 75 oranında infeksiyon görülme riski vardır (18).

3.3.2.2. Türkiye’de *S. agalactiae* Mastitislerinin Görülme Sıklığı

Antibiyotik ile tedavi öncesi *S. agalactiae*, tüm dünyada kronik mastitislerin en yaygın rastlanılan etkeni olarak kabul edilmekteydi. Son zamanlarda ise uygun antibiyotik tedavisinin yaygın şekilde kullanılması ve bakım ve barınak koşullarının düzeltilmesiyle etkenin eradike edilebilmesi mümkün olmakla birlikte, bu uygulamaların gerçekleştirilmediği bazı sürülerde halen *S. agalactiae*’nın neden olduğu ciddi kronik mastitis vakalarıyla karşılaşılmaktadır (70).

Elazığ ve civarında gerçekleştirilen bir çalışmada, 94 adet mastitisli süt örneğinde % 10,6 oranında *S. agalactiae* izole ve tanımlanmıştır (103). Arda ve İstanbulluoğlu (1978), devlete ait üç işletmede 1277 sağmal inekten toplanan süt örneklerini incelemiş ve mastitisli olduğu tespit edilen 217 ineğin 192’sinden etken izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Etken izole edilen süt örneklerinden ise % 15,6 oranında *S. agalactiae* tanımlayan araştırmacılar, bu etkenin *S. aureus*’tan sonra en fazla rastlanılan patojen olduğunu bildirmişlerdir (11). Türütoğlu ve ark. (1995) Marmara bölgesi ve civarında gerçekleştirdikleri bir çalışmada, 1594 mastitisli inek sütünün bakteriyolojik olarak incelenmesi neticesinde etken izole ettikleri 1126 süt örneğinden % 18,9 oranında *S. agalactiae* tanımlanmıştır. Bu sonuçlara göre izole edilen etkenlerin yaklaşık olarak % 70’inin *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *S. agalactiae* olduğu

belirtilirken, diğler etkenlerin izolasyon oranlarının % 10'un altında kaldığı rapor edilmiştir (161). Van ve çevresinde 1998 yılında yapılan bir çalışmada ise, CMT pozitif 200 süt örneğinden 162'sinde mikroorganizma izolasyonu gerçekleştirilmiş ve izole edilen 256 mikroorganizmadan 92 (% 35,9)'si *Streptococcus sp.* olarak tanımlanmıştır. Streptokok cinsine ait mikroorganizmaların lateks aglutinasyon testi ile serotiplendirilmesinde, 92 izolatın 15 (%16,3)'i GBS (*S. agalactiae*) olarak tanımlanmıştır (58). Yine ülkemizde son yıllarda gerçekleştirilen bir çalışmada, Afyon bölgesindeki klinik ve subklinik mastitisli ineklerden toplanan süt örneklerinden 152'sinde etken izolasyonu gerçekleştirilmiş ve izolatların 14 (% 9,2)'ünün *S. agalactiae* olduğu bildirilmiştir (80).

3.3.3. Patogenez ve Virulens

S. agalactiae zorunlu meme içi bir etken olup dokulara yayılma eğiliminde değildir. Süt içerisinde, süt kanal ve sinuslarında üreme yeteneğine sahip olan *S. agalactiae*, yaptığı iritasyonla subklinik mastitis oluşturur (70). *S. agalactiae* mastitislerinde infeksiyon, genellikle kronik *S. aureus* kaynaklı infeksiyonlarda olduğu gibidir ve sütte yüksek oranda somatik hücre artışı şeklinde seyreden bir tablo gösterir. Etkenin meme içerisine girişini takiben çoğalma başlar ve laktiferus kanallarına invazyon gerçekleşir. Meme bezi içine nötrofillerin akınını takiben sekretör dokuların atrofisi ve meme ucu kanallarının tıkanmasıyla sonuçlanan yangısal bir reaksiyon oluşur. Yangı ve buna bağlı oluşan cevabın ilk fazıyla birlikte orta derecede sistemik bir reaksiyon da meydana gelir. Kanal ve boşlukların yangısının çözülmeye başlamasıyla epitelyal dokuların dökülmeleri

sonucunda sütte pıhtı oluşumu gözlenir. Meme bezindeki tahribat, çoğu zaman sütte gerçekleşen değişiklikler saptanmadan önce meydana gelir (132). İrritasyonun artmasıyla yangı şiddetlenir bunun sonucunda da salgı yapan dokunun yerinde yara dokusu meydana gelir. Bu suretle de memede atrofi ve sütte azalma gözlenir. Bu lezyonlardan dolayı süütün indirilmesinin ve memenin sağımla tam boşaltılmasının engellenmesiyle mastitisin süreklilik arz eden bir durum göstermesi kaçınılmaz olur (15).

S. agalactiae mastitisleri başlangıçta yavaş ve gizli seyreder. Klinik olarak saptanabilecek bozukluklara sebep olmazlar. Ancak memede süütün toplanması yangının şiddetlenmesine yol açar. Kuru dönem *S. agalactiae* mastitislerinin oluşması için genellikle uygun değildir. Bu etkenden kaynaklanan mastitisler sıklıkla laktasyon döneminde ve özellikle yeni sağılan ineklerde gözlenir. Streptokoklar bazen memenin tüm loblarına birden yerleşebilir. Meme dokusunda oluşan patolojik değişimlerle sütteki bakteri sayısı arasında bir bağlantı vardır. Besi yerlerinde üreyen kolonilerin az olması, infeksiyonun henüz yerleşmediğini veya süütün meme derisindeki etkenlerle kontamine olduğunu gösterir (69).

S. agalactiae tarafından oluşturulan mastitislerde meme dokusuna invazyonunun ardından öncelikle etken laktiferus kanallarında hızla çoğalır ve kanal duvarları içinden geçerek lenfatik damarlar ve üst meme lenf nodüllerine ulaşır. Bunun sonucunda süt kanalları içerisine nötrofil akını gerçekleşir. Duktal ve asiner epitelyum hücrelerinin yıkımlanması ve bağ dokusu artışı sonucu oluşan fibrosis buna eşlik eder. Bu durum etkilenen meme lobundaki kanalların lökositler ve yıkımlanma ürünleri ile tıkanmasına ve asinilerde involusyona neden olur. İnteralveolar dokuda fibrosis şekillenmesi süt salgınının azalmasıyla sonuçlanır.

Yangısal reaksiyonlar genellikle etkilenen meme loblarının meme ucu duvarlarında gözlenir. İneklerin sadece küçük bir oranında infeksiyon hızla ortadan kaybolmasına karşın bazı hayvanlarda immunité gelişir (20, 37, 131).

S. agalactiae kapsüleri polisakkaritleri (CPS) de içeren birçok potansiyel virulens faktöre sahiptir. Bunlar; C proteinleri, hemolizin, hyaluronidaz enzimi, C5a peptidaz, fibronektin ve laminin bağlayıcı proteinler, CAMP faktör B olarak tanımlanmıştır (61, 179). Epidemiyolojik ve deneysel verilere dayanıldığında kapsül *S. agalactiae*'ların en önemli virulens faktörü olarak kabul edilmektedir. Diğer potansiyel virulens faktörleri hakkında çok daha az bilgi mevcuttur. *S. agalactiae*'ların kapsülü; glikoz, galaktoz, N-asetilglikozamin, hyaluronik asit ve sialik asit (N-asetilnöraminik asit) gibi yüksek molekül ağırlıklı polimerlerden oluşmaktadır. CPS, yapısındaki N-asetil nöraminik asit sayesinde bakteriyi fagositozdan korumakta ve komplementin C3b faktörünün hücre yüzeyine bağlanmasını inhibe ederek alternatif yoldan aktivasyonunu engellemektedir (79, 91). Bu kısım sialidaz enzimi ile muamele edilerek kopartıldığında etkenin *in vivo* ortamlarda virulensini önemli derecede yitirdiği ve opsonizasyon ve fagositozdan etkilendiği bildirilmiştir (172).

Mastitisli sığır izolatlarında hücre duvarı yapısında bulunan lipoteikoik asitin meme epitelyumuna adhezyon kabiliyetini arttırdığı bilinmektedir (96, 151). Lipoteikoik asit, bakterinin ökaryotik hücrelere tutunmasına aracılık ederek ve monositlerden yangısal sitokinlerin salgılanmasını sağlayarak bakterinin patogeneğinde önemli bir rol oynar (96).

İnsanlardan elde edilen *S. agalactiae* izolatlarında hemolizinlerin rolü erken dönemde invazyon ile ilişkilendirilmesine rağmen, sığır izolatları tarafından

salgılanan hemolizinlerin rolü şimdiye kadar anlaşılamamıştır (151). *S. agalactiae*'ların identifikasyonunda yaygın olarak kullanılan CAMP fenomeni ilk olarak 1944 yılında Christie ve ark. tarafından tanımlanmış, daha sonra bu fenomene neden olan faktörün 25 kDa'luk *cfb* geni tarafından kodlanan ekstraselüler bir protein olduğu ortaya konulmuştur (72, 158). CAMP faktörün hemolitik aktiviteyi inhibe etmek gibi yardımcı hemolizis görevi vardır (146). CAMP faktör *S. aureus*'un oluşturduğu bir beta hemolizin olan sfingomyelinaz ile muamele edilen eritrositlerin membranını eritme yeteneğine sahiptir (28). Bernheimer ve ark. (1979) CAMP faktör üzerine yaptıkları bir çalışmada, bu faktörün membranları parçalamaya neden olduğunu ortaya koyan ilk araştırmacıdır (19). Bu çalışmanın sonuçları ile CAMP faktörün Streptokokal mastitisin patogenezinde önemli rol oynadığı ortaya konulmuş ve bu faktörün moleküler yapısının daha net bir şekilde açıklanmasına önemli derecelerde katkı sağlanmıştır (125). İnsan ve hayvan orjinli *S. agalactiae*'lar CAMP pozitif olarak kabul edilir ve bu test *S. agalactiae*'nın identifikasyonunda belirleyici olarak kullanılır (125). Hemolizis etkisine yardımcı olma rolünün yanında CAMP faktörü, IgG ve IgM'nin Fc kısımlarını nonspesifik bir reaksiyon ile bağlama kapasitesine sahiptir (73).

S. agalactiae tarafından oluşturulan infeksiyonların patogenezinde hyaluronidazın rolü hakkında çok az bilgi mevcuttur. Hyaluronidaz enzimi *hylB* geni tarafından kodlanmaktadır. Bu enzim, dokularda N-asetil- β -D-glikozamin ve D-glukoronik asit arasındaki glikozid bağlarını eriterek ortamın geçirgenliğini ve viskozitesini arttırmakta, böylece bakterinin doku içinde kolayca yayılmasını sağlamaktadır (67, 85). Hyaluronidaz enziminin sığır ve koyunlarda meme

epitelyumunun bütünlüğünü bozarak bakterinin meme dokusunda yayılmasına ve toksik etkilerini gösterebilmesine olanak sağlamak suretiyle etkenin virulensine katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir (67, 146). Sığır izolatlarında diğer türlerdeki izolatlara oranla hyaluronidaz üretimi oldukça yüksektir. Yüksek miktarda hyaluronidaz üreten suşların daha fazla virulent oldukları bildirilmiştir (180).

Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi, *S. agalactiae* için oksidatif stres aleyhine önemli bir rol oynamasından dolayı etkenin sonuçta hem canlı kalması hem de virulensinde etkin bir rol oynayan faktör olarak belirlenmiştir (146). Farelerde oluşturulan deneysel infeksiyonlarda SOD negatif mutant suşlarda makrofajlar tarafından gerçekleştirilen bakteriyel ölüme karşı duyarlılığın arttığı saptanmıştır (127).

S. agalactiae, infeksiyon sürecinde konakçının birbirinden farklı savunma mekanizmaları ile karşılaşır. Ancak etken bu bariyerleri salgıladığı bazı enzim ve toksinler ile aşabilme yeteneğine sahiptir. DNase enzimi, yangısal irinin viskozitesini oluşturan deoksiribonükleoproteinleri depolimerize ederek ortamı akıcı hale getirmek suretiyle virulense katkıda bulunan bir enzim olarak tanımlanmıştır (43). Streptokinaz veya fibrinolizin ise plazminojenin plazmine dönüşümünü katalize eden proteolitik bir enzimdir. Lezyonların periferinde fibrin bariyerinin oluşumunu da inhibe etmektedir. Oluşan plazmin kazeinolitik bir enzim olmasından dolayı sütte bakterinin üreyebilme yeteneğine katkıda bulunur (43).

Son yıllarda *S. agalactiae* virulensiyle ilişkili olduğu düşünülen ve çeşitli hücresel yüzey protein antijenlerini (C protein, Rib protein, R protein, X protein),

birçok bağlayıcı proteinleri (IgA, IgG, Fibrinojen, Fibronektin, Laktoferrin, β 2-Mikroglobulin, Laminin ve Cytokeratin 8), komplement faktörünü inaktive eden C5a peptidaz ve pyrojenik toksinlerini içeren birçok faktörün varlığı ortaya konulmuştur. Bunların virulensteki önemleri ile ilgili moleküler ve fonksiyonel düzeyde aydınlatıcı bilgi veren çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir (125, 179).

3.3.4. Klinik Belirtiler

S. agalactiae, süt ineklerinde belirsiz olarak başlayan ve zamanla kronik hale geçen, memelerin kör olmasına sebep olabilen çok bulaşıcı meme infeksiyonlarına neden olur. Etkenin meme dokusuna yerleşmesi ile yangı yavaş yavaş başlar. Özellikle reinfeksiyonlar oldukça hafif seyreder. Klinik belirtilerin seyrine göre hastalık perakut, akut ve kronik olarak sınıflandırılır (69). Perakut seyirde; beden sıcaklığı yükselir, iştahsızlık, durgunluk gibi genel semptomlar gözlenir. Meme dokusundaki yangı pek dikkati çekmez. Akut formda ise genel durum fazla değişiklik göstermez, ancak meme bezlerindeki yangı oldukça şiddetlidir. Kızarıklık, şişkinlik ve duyarlılık görülür. Kronikleşen olaylarda ise meme dokusundaki yangı daha hafif olmakla birlikte zamanla fibröz sertlikler oluşabilir ve bunlar palpasyonla hissedilebilir. Memelerde kısmi atrofilere de rastlanılabilir. Akut ve kronik mastitislerde sütün fiziksel ve kimyasal yapısında değişiklikler gözlenebilir. Sütün sulanması, renginin değişmesi, içerisinde fibrinlerin bulunması bu değişikliklerin başlıcalarıdır. Bunların yanı sıra süt miktarının önemli ölçüde azalması da gözlenebilir. *S. agalactiae* mastitisleri klinik olarak çoğunlukla bir veya iki meme lobunda gözlense de üç veya dört lobu

kapsayan olaylar da az değildir. Zamanında tedavi görmeyen hayvanlarda sıklıkla *E. coli* ve *S. aureus* gibi bakteriler sekonder infeksiyon olarak hastalığa iştirak ederler. Bu durumda infeksiyon daha da şiddetlenir ve sağaltımı zorlaşır (69, 84).

Deneyssel olarak meydana getirilen infeksiyonlarda öncelikle ani bir akut mastitis atağı gözlenir. Genellikle düşük şiddetli bir infeksiyon tarzında şekillenen bu durum sürekli olmayan bir ateş ile beraber gözlenir. Doğal vakalarda ise ateş bir veya iki gün boyunca süreklilik gösterir ve genellikle ilk infeksiyon başlamasıyla şekillenir. Ancak memelerin yangısı süreklilik gösterir ve sonradan meydana gelen ataklarda orta derecede akut bir infeksiyon gözlenir. İnfeksiyonun şiddetine göre sınıflandırması yapılacak olursa, hayvanda yüksek ateş ve yemden kesilme gibi sistemik durumların ortaya çıkmasında infeksiyon perakut olarak, memelerde şiddetli bir yangı gözlenmesi fakat herhangi bir sistemik reaksiyona rastlanılmaması durumunda akut ve orta dereceli bir yangı durumunda ise infeksiyon kronik olarak isimlendirilir. En son verilen örnekte, memede şişme azdır, ancak ağrı ve sıcaklık artışı gözlenir. Bazı durumlarda sadece sütte pıhtı görünümünü gözlenebilir. Memenin alt kısımlarında ve sistemlerdeki sertleşme çok kolay şekilde hissedilebilir ve hastalığın gelişme aşamasına göre değişik derecelerde meydana gelir. Etkilenen memelerin süt verimi belirgin derecede azalmıştır, ancak erken müdahale edilen ve tam olarak sağaltılan durumlarda süt verimi normale döndürülebilir (20). Tedavi gerçekleştirilmeyen durumlarda dahi süütün görünümünde anormallik saptanmaması ile karşılaşılabilir. Ancak süt verimi belirgin derecelerde azalmaya devam eder ve reinfeksiyon durumlarında sütteki azalma artabilir (20).

3.3.5. Tanı

S. agalactiae kaynaklı mastitislerin klinik tanısı *S. aureus* mastitislerinde olduğu gibi genellikle yeterli değildir. Klinik olarak infeksiyonun saptanması için periyodik olarak uygulanması gereken indirekt testlerden faydalanılmaktadır. Saha şartlarında bu testlerden pratikte en fazla kullanılanı CMT'dir. Özellikle subklinik olarak seyreden infeksiyonları saptamak amacıyla, memenin klinik olarak incelenmesinin ardından alınan süt numunelerinin CMT ile muamele edilmesi neticesinde pozitif sonuçlar veren örneklerden laboratuvar koşullarında etken izolasyonu ve identifikasyonu gerçekleştirmek gereklidir. Laboratuvara getirilen sütlerde bakteriyoskopi sonucunda tipik uzun zincirler halinde gözlemlenen bakteriler Streptokok şüpheli olarak değerlendirilir (69). Ancak etiyolojik etkenin net olarak saptanması için *in vitro* kültür işleminin gerçekleştirilmesi zorunludur. *S. agalactiae* kanlı agar gibi adi besi yerlerinde zayıf üreme gösteren bir bakteridir. Kan, kan serumu, glikoz ilave edilmiş besi yerlerinde daha iyi bir üreme gösterebilen Streptokoklar için Edwards Medium, Todd Hewitt Broth, Islam Agar gibi birçok spesifik besi yeri ticari olarak elde edilebilir. Aynı zamanda saf kültürler elde etmek için besi yerlerine belirli oranlarda kristal viyole, sodyum azid ve kanamisin gibi bazı selektif maddeler eklenerek izolasyon şansının artırılacağı bildirilmiştir (37).

Süt örneklerinin laboratuvarında uygun besi yerlerine ekilerek 37 °C'de inkubasyona bırakılmalarını müteakip 24-48 saat içerisinde küçük, S tipli şeffaf ve hemoliz yapan koloniler Streptokok şüpheli olarak ayrılmalıdırlar. Ancak, *S. agalactiae* morfolojik yapısı ve kültürel özellikleri ile diğer Streptokok

türlerinden ayırt edilemez. Kesin ayırım için CAMP testi başta olmak üzere eskulin, sodyum hippurat, basitrasin duyarlılık, % 6,5 Sodyum klorürlü ortamda üreme gibi testlerin gerçekleştirilmesi gerekir (131).

Streptokokların identifikasyonunu kolaylaştırmak amacıyla, uygulanan biyokimyasal identifikasyon testlerinin hepsini bir defada gerçekleştirmeyi sağlayacak API 20 Strep ve Rapid Strep adı verilen ticari identifikasyon kitleri de mevcuttur. Fakat bu kitlerin kullanımı ile laboratuvar identifikasyonunun gerçekleştirilmesi ciddi bir maliyet gerektirmektedir (131). Bununla birlikte, kültür işleminin ardından izolatların *S. agalactiae* olarak identifikasyonu için gerçekleştirilecek testlerin zahmetli ve uzun zaman alıcı olması nedeniyle alternatif teşhis metotlarının kullanılması gerekliliği ortaya konulmuştur (2, 98). Keza, *S. agalactiae*'nin diğer Streptokoklardan ayırımı için kullanılan biyokimyasal identifikasyon testlerinin tüm "*agalactiae*" olan türler açısından sabit reaksiyonlar vermemesi nedeniyle etkenin izolasyonu ve biyokimyasal identifikasyonuna alternatif metotlar kullanılmasının gerekliliği ön plana çıkmıştır (42). Bazı araştırmacılar tarafından *in vitro* kültür metoduna alternatif olarak lateks aglutinasyon testi kullanılmıştır (37, 43). Ancak kros reaksiyonların ortaya çıkması veya tiplendirilemeyen suşların bulunması serotiplendirmede sıklıkla karşılaşılan bir dezavantajdır (42).

S. agalactiae'nin tanısında kullanılan konvansiyonel metotların yetersizliği, hızlı ve güvenilir identifikasyon amacıyla moleküler metotların kullanılmaya başlanmasından sonra bir sorun olmaktan çıkmıştır. PCR ve buna bağımlı moleküler analizlerin çok daha stabil karakter taşıyan gen bölgelerinin tespit edilmesine olanak sağlaması ile etkenin kesin bir şekilde identifikasyonu

gerçekleştirilebilmektedir (136). Özellikle *S. agalactiae*'nın identifikasyonunda belirleyici biyokimyasal test olarak kabul edilen CAMP testi bile tüm *S. agalactiae*'larda fenotipik olarak pozitif bulunmayabilmektedir. Ancak bu faktörü kodlayan gene (*cfb*) spesifik olarak yapılan PCR işlemi neticesinde fenotipik olarak CAMP negatif bulunan *S. agalactiae* izolatlarının *cfb* genine sahip oldukları ortaya konmuştur (61, 62). Bunun yanı sıra *S. agalactiae* için, etkenin izole edilmesine gerek kalmadan direkt süttten identifikasyonunun yapılmasına olanak sağlayan DNA ekstraksiyon metotlarının geliştirilmesiyle çok sayıda numunenin kısa sürede identifikasyonuna imkan sağlayacak hızlı, duyarlı ve güvenilir PCR uygulamalarının kullanımı son yıllarda giderek artmaktadır (92, 98).

3.3.6. Sağaltım, Koruma ve Kontrol

Sığır mastitisi için antimikrobiyal ilaçların koruyucu ve tedavi edici etkinliği; etiyolojik ajan, ilaçların tam ve uygun kullanımı, sürüdeki bakımın uygunluğu, hijyenik tedbirler ve hastalığın safhası ile ilişkili birçok faktöre bağımlıdır. Subklinik mastislerin tedavisine başlanması için ilaç seçiminde ilacın güvenilirliği, maliyeti, kalıntı bırakma potansiyeli, dağılım özellikleri ve sensitivite verileri göz önünde bulundurulmalıdır (74, 162). *S. agalactiae* genellikle ticari olarak elde edilebilen preparatların kullanılması ile meme içi tedaviye karşı duyarlılık gösterir (162). *S. agalactiae* mastitislerinin meme içi infuzyon ürünleri ile tedavisinin; infeksiyonların yüksek oranda eliminasyonu ile sonuçlandığı, az miktarda kalıntı oluşturduğu ve maliyet bakımından düşük olduğu tespit edilmiştir. *S. agalactiae* prevalansı yüksek olan sürülerde bu tip ürünlerin

kullanımı sonucunda hem klinik hem de subklinik vakalarda süt vasıtasıyla bakteriyel yayılmanın durduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, klinik vakaların tedavisi esnasında tam bir kontrol programı uygulanmazsa sürü prevalansında etkili şekilde azalmaların saptanamayacağı rapor edilmiştir (121).

Birçok çalışmada *S. agalactiae*'ya karşı çeşitli antimikrobiyal ajanların *in vitro* aktiviteleri izlenmiştir. Yapılan bir araştırmada, altı farklı bölgeden elde edilen 39 *S. agalactiae* suşunun tamamı penisilinlere karşı duyarlı bulunurken, linkomisin ve eritromisine karşı % 95, tetrasiklinlere karşı % 75 oranında duyarlılık tespit edilmiştir. Streptomisin ve spektinomisine karşı ise duyarlılıklarının çok daha az olduğu bildirilmiştir (29). Türkiye'de subklinik mastitis vakalarından izole edilen etkenlerin duyarlı olduğu antibiyotiklerin tespit edilmesine yönelik olarak yapılan bir çalışmada ise; *S. agalactiae* izolatlarının % 85 oranında amoksisilin-klavulanik asit ve ampisilin-sulbaktam kombinasyonlarına karşı duyarlı olduğu, danofloksasin ve enrofloksasine karşı duyarlılıklarının yaklaşık olarak % 70-80 arasında bulunduğu ve penisiline karşı ise etkenin % 57,1 oranında duyarlı olduğu tespit edilmiştir (80). *In vitro* olarak gerçekleştiren duyarlılık testleri *in vivo* ortam hakkında tahmin edici denemeler olarak gözlenseler de etkenlerin *in vivo* olarak gerçekleştirecekleri davranışlar farklılık gösterebilir. Bu yüzden antibiyotiklerin meme içerisinde kullanımı ile elde edilecek bilgilerin değerlendirilmesi daha çok önem taşır (74). Craven (1987), *S. agalactiae* mastitislerinde penisilin tedavisini takiben bakteriyolojik sağaltım oranlarındaki başarıyı % 84 olarak tespit etmiştir (34). Tyler (1992) ise hem laktasyon tedavisi hem de kuru dönem tedavisi sonucunda % 90'ın üzerinde başarılı sonuç elde edildiğini bildirmiştir (162).

Keefe (1997)'ye göre, 1970-80'lerde *S. agalactiae* mastitisleri için gözlemlenen sürü içi prevalanstaki yükseklik günümüzde daha düşük seviyelerde saptanmaktadır (74). Almanya'nın bir bölgesinde *S. agalactiae*'nin tamamıyla eradikasyonunu gerçekleştiren çalışmalar bildirilmiştir (78). Böyle bir durum İsviçre'deki sütçülük işletmelerinde de başarılmıştır (30). Son yıllarda *S. agalactiae* infeksiyonlarında azalma gözlenmesine rağmen etken iyi bakım şartları uygulanmayan sürülerde halen önemini korumaktadır. Bu duruma etkenin epidemiyolojik ilişkileri ile ilgili yeterli araştırma yapılmamış ülkelerde daha fazla rastlanılmaktadır.

Bir sürüdeki *S. agalactiae* prevalansı ile ilişkili pek çok faktör mevcuttur. Bunlardan en önemlileri, sağım sonrası memelere dezenfeksiyon işleminin uygulanmaması, kuru dönem tedavisinin gerçekleştirilmemesi veya ilaç seçimindeki başarısızlık sayılabilir. Sürü büyüklüğü, hayvanların temizliği ve ahırların hijyeni de bu faktörler arasında sayılabilir. *S. agalactiae* infeksiyonları antibiyotiklerle tedaviyi takiben uygulanan iyi hijyenik prosedürler ile daha hızlı şekilde elimine edilebilir. Ancak infekte sığırlar arasında tedaviye cevap vermeyenlerin belirlenememesi ve sürüden izole edilmemeleri infeksiyon için bulaşma kaynağı olarak bulunmalarına neden olur. Sürülerde meme dezenfeksiyonu ve diğer hijyenik prosedürlerin uygulanmaması sonucunda etken infekte olmayan ineklere kolaylıkla bulaşabilir (53). Genelde subklinik mastitis özelde ise *S. agalactiae* için uygulanacak iyi bir sürü bakım ve hijyen programı, sürülerde infeksiyonun kontrolü açısından etkilidir. Böyle programlar ekonomik açıdan değerlendirilecek olduğunda; somatik hücre sayısı, klinik hastalıkların

insidensi ve sürü içerisindeki infeksiyon prevalansındaki değişiklikler hesaplandığında çok uygun ve etkili programlar olarak saptanmışlardır (74).

Bugüne kadar Streptokokal mastitislere yönelik yapılan aşı çalışmalarında Stafilokokal ve Koliform mastitislere yönelik yapılan aşı çalışmalarına göre daha başarısız sonuçlar alındığı bildirilmiştir (134). Ancak, *S. agalactiae* X proteini ile yapılan aşı geliştirme çalışmasında, bu proteinin opsonik karakterdeki antikor sentezini uyarması sonucunda ümit verici sonuçlar elde edilmiştir (177).

3.4. *S. AUREUS* ve *S. AGALACTIAE*'nin GENOTİPLENDİRİLMESİ

Epidemiyolojik araştırmaların temel amacı mikroorganizmaların kaynak, rezervuar ve yayılma yollarını belirleyerek kontrol önlemleri geliştirmektir. Bu nedenle infeksiyon olgularından izole edilen aynı cins veya türden olan etkenlerin birbirinin aynı olup olmadıklarının belirlenmesi yani alt tiplendirmenin yapılması gereklidir. Eğer infeksiyonun tek bir suşun yayılımı sonucunda gerçekleştiği gösterilebilirse, bu suşun belirli bir kaynağı olduğu veya infekte canlılar arasında çapraz olarak bulaştığı düşünülmelidir (111). Genel anlamda ele alınacak olursa alt tiplendirme, infeksiyon epidemilerinin, çapraz yayılımın bulunup bulunmadığının, infeksiyon kaynaklarının, özellikle virulent suşların tanımlanmasında ve aşılama programlarının izlenmesinde büyük önem taşımaktadır (111, 124). İnfeksiyon olgularından izole edilen etkenlerin tiplendirilmesi, sadece etkin sağaltıma yönelik ve koruyucu önlemlerin alınmasında değil, aynı zamanda bunlara yönelik eradikasyon planlarının kısa sürede hazırlanması bakımından da oldukça önemlidir (12).

Tiplendirme yöntemleri, fenotiplendirme ve genotiplendirme olmak üzere iki ana başlık altında toplanabilir. 19. yüzyılın başlarından 20. yüzyılın ortalarına kadar, bugün bilinen patojen bakterilerin çoğu tanımlanmış ve bunların identifikasyonunda belirleyici olacak fenotipik özellikler ortaya konmuştur. 1980'li yıllara kadar infeksiyon oluşturan bakterilerin cins, tür, biyotip, serotip, faj tipi yada bakteriyosin tipi düzeyinde tanı sağlayan ve antimikrobiyal maddelere duyarlılıklarını belirlemeye dayanan özellikleri fenotipik yöntemlerle incelenmiştir. Fenotipik yöntemler genetik özellikleri yansıtır ve genellikle spesifiktir. Belirli bir fenotipik özellik patojen bir etkende ender olarak bulunuyorsa tek başına bu etkenin yayılma yolu hakkında fikir verebilir. Ancak her zaman görülebilen fenotipik özelliklere sahip olan etkenler söz konusu ise alt tiplendirme yapılmalıdır. Alt tiplendirme için sıklıkla kullanılan fenotipik yöntemler arasında; antimikrobiyal maddelere duyarlılık (antibiyogram), biyotiplendirme, bakteriyosin ve faj tiplendirmesi, serotiplendirme, etkenlerin çeşitli özelliklerinin (morfolojik, toksin, flagella, kapsül vs.) tespiti, immunoblotting ve multilokus enzim elektroforezi (MLEE) gibi protein elektroforezleri sayılabilir (12, 111, 155).

Özellikle son yıllarda gittikçe önem kazanan genetik karakterlerin belirlenmesine yönelik (genotipik) metotların geliştirilmesiyle eş zamanlı olarak, fenotipik özelliklere dayalı tiplendirme metotlarının duyarlılığının az olduğu ve birçok dezavantajlarının bulunduğu belirlenmiştir. Bunlar; etkenlerin antijenik yapısının değişken olması nedeniyle sonuçlarda karşılaşılan tutarsızlıklar, antibiyotiklere direnç mekanizmalarının tedavide kullanılan antibiyotikler nedeniyle değişkenlik göstermesi, fenotipik özelliklerin her zaman eksprese

olmayan genlerde kodlanabilmesi, ticari olarak bulunmayan bazı ayraçlara gereksinim duyulması ve bir tür içindeki her bir suşu ayırt etmeye yeterli farklılıkların bulunmayışı olarak ifade edilebilir. Örneğin suşların antibiyotik tedavisi esnasında direnç plazmidini kazanmaları veya kaybetmeleri antimikrobiyal maddelere duyarlılıklarına bakılarak tiplendirmeye bir engel teşkil edebilir. Keza etkenin henüz bakteriyofaj reseptörünü sentezlememiş olması faj tiplendirme ile tiplendirilmesini engelleyici bir faktördür (39, 124). Ayrıca fenotipik metotlar iş gücü fazlalığı bakımından zahmetli, zaman alıcı, hatalı gruplama yapma ihtimali yüksek, çoğunlukla üreme koşulları, üreme fazı ve mutasyona bağlı olarak değişken sonuçların alınması muhtemel yöntemlerdir (41).

Genotiplendirme yöntemleri fenotiplendirmeye göre; tekrarlanabilirlik, tiplendirilebilirlik ve ayırıcı güç yönünden daha üstündür. Tekrarlanabilirlik belirli bir suşla yinelenen yöntemin, aynı sonucu verebilme yeteneği olarak tanımlanır (160). Genotiplendirme yöntemlerinin geliştirilmesiyle infeksiyonların epidemiyolojisinin açıklanmasında büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu metotlar ile, tür içinde değişken ancak suşlarda stabil olan belirli genetik göstergeler kullanılarak, epidemiyolojik olarak ilişkili aynı tür içindeki izolatların genetik olarak da ilişkili olup olmadıkları araştırılmaktadır. Moleküler tiplendirme yöntemleri; infeksiyonların kaynağı ve yayılma yolları hakkında hipotezlerin test edilmesi, infekte hayvanların epidemiyolojik olarak birbiri ile olan ilişkilerinin belirlenmesi, antibiyotik tedavisinin etkinliğinin belirlenmesi, antibiyotik direncinden sorumlu genler hedef alınarak yapılan tiplendirme ile dirençli suşların tanımı veya yaygınlıklarının belirlenmesi, popülasyondaki epidemik suşların zaman içindeki prevalansını izleyerek epidemiyolojik olarak koruma ve kontrol

yöntemlerinin değerlendirilmesi, virulensten sorumlu genlerin belirlenmesi ve bunları taşıyan suşların populasyon içindeki yaygınlıklarının ortaya konulması gibi amaçlara ulaşmada yardımcı olur (12, 41, 163).

Genotipik metotlar; plazmid tiplendirilmesi, tek bir gen bölgesinin tiplendirilmesi, tüm genomun tiplendirilmesi ve DNA sekans analizi ana başlıkları altında toplanabilir (160). Moleküler epidemiyolojik yaklaşımların tümünde “altın standart” olarak kabul edilen optimal tiplendirilebilirlik, yüksek tekrarlanabilirlik, yeterli stabilite ve yüksek ayrıştırma gücü gibi özellikler bakterilere yönelik çalışmalarda mutlaka dikkate alınmalıdır. Bunların yanı sıra yöntemin çok pahalı ve komplike olmaması, sonuçların kolay yorumlanabilmesi ve hatta laboratuvarlar arası karşılaştırılabilir olması tercih sebepleri arasındadır (12, 164). Çalışılacak populasyonun lokalizasyonu, büyüklüğü, şehir, ülke veya dünya çapında bir değerlendirme yapılıyor olması, seçilecek moleküler tiplendirme yöntemlerini doğrudan etkilemektedir. Örneğin, belirli bir bölgedeki *S. aureus*'a neden olan kaynağı ortaya çıkarmak için RAPD gibi basit bir metot kullanılabilirken, bir ülke çapında uygulama esnasında, epidemiyolojik ilişkileri ortaya koymak açısından PFGE veya multilokus sekans tiplendirmesi (MLST) gibi yüksek tekrarlanabilirlik kapasitesine sahip ve ortak sonuç yorumuna olanak sağlayan veri tabanları oluşturulmuş sistemlerin kullanılması gerekmektedir (160).

Son zamanlarda, *S. aureus* ve *S. agalactiae*'nın epidemiyolojik tiplerinin ortaya konmasında bir takım moleküler tekniklere başvurulmuştur. Bunda daha önceleri sıklıkla başvuru yapılan konvansiyonel metotların, genellikle Stafilokoklar ve Streptokoklar için düşük bir tiplendirme ve ayırım kapasitesine sahip olmaları ve atipik biyokimyasal reaksiyonlar göstermeleri önemli rol oynamıştır (42, 93, 95,

160). Bu nedenle çeşitli ülkelerde, daha etkili mastitis kontrol programları geliştirmek amacıyla, sığır mastitis vakalarından izole edilen *S. aureus* ve *S. agalactiae* suşları arasındaki epidemiyolojik ilişkilerin ortaya konmasına yönelik çalışmalar yapılmış ve umut verici sonuçlar elde edilmiştir (14, 45, 82, 93, 99, 119, 152). *S. aureus* ve *S. agalactiae* izolatlarının tiplendirilmesinde kullanılmış olan bu metotlar; tiplendirme kabiliyeti, üretkenlik, ayırım gücü, yorumlama kolaylığı ve kullanım kolaylığı bakımından farklılık gösterirler (160). *S. aureus* ve *S. agalactiae* izolatlarının tiplendirilmesinde; PFGE, ribotiplendirme, MLST, amplified fragment length polymorphism, (AFLP), plazmid profil analizi, kromozomal DNA'nın restriksiyon enzim analizi (REA), farklı virulens gen bölgelerinin RFLP analizi ve RAPD gibi moleküler tiplendirme teknikleri etkili bir şekilde kullanılmaktadır (10, 16, 36, 47, 71, 93, 160, 165).

PCR tabanlı tiplendirme metotlarından RFLP ve RAPD analizleri hem *S. aureus* hem de *S. agalactiae*'nin alt tiplerinin ortaya konulmasında en sık kullanılan metotlardır. Çünkü bu metotlar diğer moleküler tiplendirme metotlarına göre daha kısa zamanda sonuç verir ve uygulama kolaylığı bakımından daha basittir (160).

RFLP metodu, farklı suşların DNA'larının PCR ile amplifikasyonunu müteakip restriksiyon enzimleriyle muamele edilmesi ve agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak bant görünümündeki farklılıkların ortaya konulmasını amaçlayan bir metot olarak karşımıza çıkar (12). Yani bilinen bir gen dizisinin amplifiye edilmesi ve restriksiyon endonükleazlarla kesilmesini içerir. RFLP metodu, uygulanması ve yorumlanması kolay olan, yaklaşık bir gün gibi bir

sürede sonuç veren bir metot olarak birçok mikroorganizmanın ayırımına imkan vermiştir (111, 164).

S. aureus için 16S-23S rRNA, protein A (*spa*), koagulaz (*coa*) gibi birçok farklı gen bölgesi amplifiye edilerek RFLP analizine tabi tutulmuşlardır. Ancak bunlar arasında en sık olarak RFLP analizine tabi tutulan gen bölgesi *coa* genini kodlayan bölge olmuştur (1, 56, 65, 82). Çünkü *coa* gen bölgesinin RFLP analizi ile, patojenik *S. aureus* izolatlarının identifikasyonu için klinik mikrobiyoloji laboratuvarları tarafından virulens ile ilişkili en önemli fenotipik marker olarak kullanılan koagulaz üretimi varlığının bu gene spesifik PCR ile ortaya konulması ve gendeki polimorfizmlerin tespiti gerçekleştirilir (1, 56, 65). *S. agalactiae* için ise RFLP analizinin kullanımı daha az olmasına rağmen 16S rRNA'yı ve Insertion Sekans (IS) 1381'i kodlayan gen bölgeleri için bu analiz gerçekleştirilmiştir (2, 81, 159). *S. agalactiae* için virulensle ilişkili olduğu düşünülen CAMP-faktör (*cfb*) geni, Hyaluronidase (*hylB*) geni, Laminin binding protein (*lmb*) ve C5a peptidase (*scpB*) genini kodlayan bölgelerin sadece PCR amplifikasyonları gerçekleştirilmiştir (181). Bu gen bölgelerinden Bernheimer ve ark. (1979) tarafından purifiye edilerek tanımlanan CAMP proteinini kodlayan *cfb* geni, Podbielski ve ark. (1994) tarafından sekanslanmıştır (19, 125). *S. agalactiae*'nın virülensle ilişkili önemli bir gen bölgesi olarak tanımlanan *cfb* genini hedef alan birçok araştırma gerçekleştirilmiştir (45, 61, 62, 99).

PCR tabanlı tiplendirme metotlarından bir diğeri olan RAPD tekniği, bir suşun veya türün moleküler analizinin gerçekleştirilmesinde çok genel bir metot olarak ifade edilebilir. Epidemiyoloji, moleküler genetik, mikrobiyal ekoloji, moleküler evolusyon, taksonomi gibi alanlarda giderek artan bir uygulama alanı

bulan kullanışlı ve duyarlı bir metottur (168, 171, 174). RAPD yöntemi ilk kez Williams ve ark. (174) ve Welsh-McClelland (171) ikilisinin yaptığı çalışmalarda kullanılmış ve arbitrary primed-PCR (AP-PCR) olarak adlandırılmıştır. Metodun temeli, bakteriyel genom bölgelerinin amplifikasyonunu başlatmak için kromozomal DNA dizilerine düşük hibridizasyon ısılarında etkin bir affinite ile bağlanan 9-10 baz uzunluğunda kısa ve rasgele seçilmiş primer dizilerinin kullanılmasına dayanır. Daha açık bir ifade ile tanımlanacak olursa, sadece bir tek seçilmiş primer kullanarak (hedef DNA dizisine herhangi bir homologluğu bilinmeyen primerler) hedef DNA'nın rasgele amplifiye edilen dizilerini göstermeyi amaçlayan bir yöntemdir (171, 174). Bakteriyel türlerin farklı suşları için, rasgele çoğaltılan primer bölgelerinin çeşitliliği; lokalizasyon ve sayıları bakımından agaroz jel elektroforezde yürütüldükten sonra yorumlanır. Bant görünümündeki farklılıkları en iyi şekilde ortaya koyan RAPD primer dizilerinin seçilmesine dikkat edilmelidir. Amplifikasyonun düşük primer hibridizasyon ısısında (ortalama 36-45°C'de ve ≥ 2 mM MgCl₂) gerçekleştirilmesi ve primerlerin en azından % 40 G+C oranına sahip olması RAPD alt tiplendirmesi için gerekli olan koşullardır (174).

RAPD yöntemiyle yapılan birçok çalışmada bakteriyel suş ve tür çeşitliliğinin ortaya konulduğu tespit edilmiştir. Bu metodun avantajları hedef dizi hakkında önceden herhangi bir bilgiye gereksinim duyulmaması, ortalama 10 bazlık kısa ve tek bir primerin kullanılması ve oluşan amplikonların restriksiyonuna gerek duyulmaması olarak sıralanabilir. Böyle özellikler RAPD yönteminin, DNA'ya dayalı alt tiplendirme metodlarının muhtemelen en basiti olarak kabul edilmesine yol açmıştır (111). Buna rağmen yine de standardize

edilmesi ile ilgili küçük dezavantajları vardır. Ayrıca bu metodun üretkenlik kapasitesi de düşüktür. Çünkü primerler herhangi spesifik bir bölgeye karşı direkt özgü değillerdir. Bu üretkenlik kapasitesinin düşüklüğünün başlıca nedeni primer ve hedef bölge arasındaki hibridizasyon eksikliğinden kaynaklanır. Sonuç olarak RAPD amplifikasyon yöntemi bant görünümünde çeşitliliğe yol açan bağlanma ıısındaki değişikliklere aşırı şekilde duyarlıdır ve rasgele seçilen primerlerin kullanımı, optimal reaksiyon şartlarının herbiri ve ayraçlar (MgCl₂ gibi) tekniğin standardizasyonunun zorlaşmasına yol açar ve laboratuvarlar arası ve içinde tekrarlanabilirlik kapasitesinin düşüklüğü gibi dezavantajları mevcuttur (111, 118).

3.5. AMAÇ

Bu çalışmada;

- a) Elazığ ili ve civarındaki sığır populasyonlarında yapılan mastitis taramaları neticesinde CMT ile pozitif sonuç veren süt örneklerinden *Staphylococcus sp.* izolasyonu ve *S. aureus*'un 23S rRNA genine spesifik PCR ile identifikasyonu,
- b) *S. aureus* olarak identifiye edilen izolatlarda koagulaz (*coa*) geninin varlığının PCR ile araştırılması,
- c) *Coa* geni yönünden pozitif *S. aureus* izolatlarının PCR-RFLP ve RAPD yöntemleri ile tiplendirilmesi,
- d) Türkiye'nin doğu ve güneydoğusunu kapsayan geniş bir coğrafik alandaki süt ineklerinden toplanan ve CMT neticesinde pozitif sonuç veren süt numunelerinden *Streptococcus sp.* izolasyonu ve *S. agalactiae*'nın 16S rRNA genine spesifik PCR ile identifikasyonu,

e) *S. agalactiae* olarak identifiye edilen izolatlarda CAMP (*cfb*) geninin varlığının PCR ile araştırılması,

f) *Cfb* geni yönünden pozitif *S. agalactiae* izolatlarının PCR-RFLP ve RAPD yöntemleri ile tiplendirilmesi amaçlandı.



4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. SÜT NUMUNELERİNİN TOPLANMASI

S. aureus taraması için Mart 2002 ve Nisan 2003 tarihleri arasında Elazığ ili ve civarını kapsayan bir coğrafik bölgedeki süt inekleri CMT ile incelendi. Süt örnekleri, 100 farklı küçük aile işletmesindeki (kapasiteleri 5–10 inek arasında değişen) subklinik mastitis şüpheli (CMT ile +, ++, +++ reaksiyon veren) rasgele seçilen toplam 700 inekten temin edildi.

S. agalactiae taraması için ise, Mart 2002 ve Eylül 2003 tarihleri arasında Türkiye'nin doğu ve güneydoğusundaki illeri kapsayan 5 farklı yerleşim birimindeki (A:Elazığ-Merkez, B: Sivas-Çetinkaya, C: Malatya-Dilek, D: İskenderun-Arsuz, E: Şanlıurfa-Ceylanpınar) süt ineklerinin CMT ile incelenmesi sonucunda rasgele seçilmiş toplam 820 ineğe ait subklinik mastitis şüpheli (CMT ile +, ++, +++ reaksiyon veren) süt numuneleri kullanıldı.

Süt örnekleri meme loblarından aseptik koşullar altında steril tüpler içerisine yaklaşık 10 ml kadar alındı. Örnekler toplanırken tüm hijyenik tedbirlere uyuldu ve rutin bakteriyolojik incelemeler için uygun şartlar altında (+4 °C'de) kısa süre içerisinde laboratuvara ulaştırıldı.

4.2. *S. AUREUS* İZOLASYONU ve İDENTİFİKASYONU

4.2.1. Kültür Yöntemiyle *Staphylococcus sp.* İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Toplanan 700 adet süt numunesi % 7 defibrine koyun kanı ilave edilmiş kanlı agara (Merck) inokule edilerek aerobik koşullarda 37 °C'de 24–48 saat inkubasyona tabi tutuldu. Üreme meydana gelen besi yerlerindeki kolonilere

primer identifikasyon testleri (Gram boyama, katalaz, oksidaz, oksidasyon - fermentasyon testi) uygulandı. Bu testlere göre katalaz pozitif, oksidaz negatif ve oksidasyon-fermentasyon testinde fermentatif reaksiyon gösteren ve Gram boyama sonucunda mikroskopta Gram pozitif üzüm salkımı görünümündeki koklar *Staphylococcus sp.* olarak identifiye edildi. Bu izolatların tümü Tryptic Soy Agar (TSA, Difco) besi yerine geçilerek saflaştırıldı ve moleküler aşamalarda kullanılmak üzere % 15 gliserol içeren Tryptone Soya Broth (TSB, Oxoid) besi yerine aktarılarak -20 °C'de muhafaza edildi.

4.2.2. PCR ile *S. aureus* İdentifikasyonu

4.2.2.1. DNA Ekstraksiyonu

Staphylococcus sp. izolatlarının PCR ile tür bazında identifikasyonu amacıyla öncelikle şüpheli izolatlardan DNA ekstraksiyonu işlemi gerçekleştirildi. Uygun bir DNA ekstraksiyon metodunun tespiti amacıyla iki farklı yöntem test edildi. İlk metotta şüpheli izolatların TSB'de hazırlanan kültürlerinin herbirinden Eppendorf tüpler içerisine 300 µl alındı. Eşit miktarda zirconium boncukları (0,1 mm zirconia/silica beads; Biospect Products, Bartlesville, OK, US) ilave edildikten sonra Mini Bead Beater (Biospect Products, Bartlesville, OK, US) cihazında 5000 rpm'de 3 kez üst üste 45 sn vortekslendi. Kısa bir santrifüj işlemi takiben klasik fenol-kloroform ekstraksiyonu ile şüpheli izolatlardan DNA elde edildi.

Diğer metotta ise, DNA ekstraksiyonundan önce her bir izolatın TSA besi yerinde pasaj işlemi gerçekleştirildi. DNA ekstraksiyonu amacıyla, Montanaro ve ark. (1999) kullandığı metot modifiye edilerek uygulandı (101). Taze katı

kültürden alınan birkaç koloni steril bir Eppendorf tüpünün içerisinde 45 µl steril distile su ile süspanse edildi. Bu süspanسیونun üzerine 5 µl Lysostaphin solüsyonu (Sigma, 100 µg / ml) eklendi ve karışım 37 °C'de 20 dk inkube edildi. Daha sonra karışıma 5 µl Proteinase K (Sigma, 100 µg / ml) ve 150 µl 0,1 M Tris/HCl, pH 7,5 (Sigma) ilave edildi. Süspanسیون, vortekslendikten sonra 20 dk daha inkubasyona tabi tutuldu. Son olarak örnekler Proteinase K'nın inaktivasyonu için 100 °C'de 10 dk kaynatmayı takiben soğutulduktan sonra PCR'de hedef DNA olarak kullanıldı.

Bu iki metottan çok daha kısa zamanda sonuç veren ve uygulanması daha kolay olan ikinci metot tüm izolatların DNA ekstraksiyonunda tercih edildi.

4.2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Toplam 50 µl 'lik hacimde hazırlanan PCR karışımına 5 µl 10x PCR buffer, 5 µl 25 mM MgCl₂, deoksinükleotitlerin her birinden 250 µM, 1.25 U Taq DNA Polymerase enzimi (MBI, Fermentas), Riffon ve ark. (2001) tarafından bildirilen ve etkenin 23S rRNA geninden türetilen primer çiftinin (Tablo 3) her birinden 50 pmol ve 25 ng template DNA ilave edildi (136). PCR reaksiyonları PCR-Sprint thermalcycler (Thermo Hybaid, İngiltere) cihazında gerçekleştirildi. PCR amplifikasyonunda 94 °C'de 2 dk ön denaturasyon aşamasını takiben, toplam 35 PCR siklusu 94 °C'de 45 sn denaturasyon, 64 °C'de 1 dk hibridizasyon ve 72 °C'de 2 dk sentez olarak gerçekleştirildi. Son siklusu müteakip 72 °C'de 10 dk ekstra sentez işlemi yapıldı. Amplifiye edilen PCR ürünleri % 1,5'luk agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra ethidium bromide (10 mg/ml) ile 30 dk süreyle boyandı ve Ultra Viole (UV) transilluminatörde incelenerek sonuçlar

gözlemlendi. Oluşan bantların moleküler ağırlığını saptamak amacıyla 100 bp 'lik DNA ladder (MBI, Fermentas SM 0321) kullanıldı. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi neticesinde oluşan 1318 bp moleküler uzunluğundaki bantlar *S. aureus* göstergesi olarak kabul edildi. Tüm PCR uygulamalarında pozitif kontrol olarak Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan temin edilen referans *S. aureus* suşu ve negatif kontrol olarak distile su kullanıldı.

4.3. S. AUREUS'UN MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ

4.3.1. Koagulaz (*coa*) Geninin PCR Amplifikasyonu (*coa*-PCR)

Tür spesifik PCR ile *S. aureus* 'a ait olduğu belirlenen DNA örneklerinde koagulaz geninin varlığını araştırmak amacıyla Goh ve ark.(1992) tarafından bildirilen bir çift spesifik primer (Tablo 3) kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirildi (56). PCR karışımı 4.2.2.2'de bildirilen yoğunluklarda hazırlandıktan sonra amplifikasyon işlemi; 95 °C'de 2 dk ön denaturasyon aşamasını takiben, toplam 30 siklus 95 °C'de 30 sn denaturasyon, 58 °C'de 2 dk hibridizasyon ve 72 °C'de 2 dk sentez olarak gerçekleştirildi. Son siklustan sonra 72 °C'de 10 dk ekstra sentez işlemi uygulandı.

4.3.2. Koagulaz (*coa*) Geninin RFLP Analizi (*coa*-RFLP)

Elektroforez işlemi müteakip *coa* geni yönünden pozitif olduğu belirlenen PCR ürünleri restriksiyon işlemine tabi tutuldu. *AluI* (MBI, Fermentas, 10U/μl) ve *Hin6I* (MBI, Fermentas, 10U/μl) restriksiyon enzimleriyle ayrı ayrı kesimleri gerçekleştirilmek amacıyla 12,5 μl PCR ürünü için, 0.2 μl restriksiyon

enzimi ve 1,5 µl 10x restriksiyon buffer katılarak hacim steril distile su ile 20 µl'ye tamamlandıktan sonra 37 °C'de 2 saatlik inkubasyon işlemi uygulandı. Restriksiyona maruz bırakılan ürünler % 2'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu. Ethidium bromide ile boyamayı takiben oluşan profiller UV transilluminatörde analiz edildi ve Polaroid GelCam ile fotoğraflandı.

4.3.3. *S. aureus* RAPD Analizi

S. aureus izolatlarının RAPD analizinde öncelikli olarak primer seçimi için rasgele seçilen beş izolatın DNA'sı kullanılarak altı farklı primer (Primer 786, 797, 798, OPS 11, OPB 17 ve OPB 18) ile deneme gerçekleştirildi. Bu primerler arasından en iyi sonuç veren iki primer, *coa*-PCR'da pozitif sonuç veren izolatların RAPD analizinde kullanıldı.

Primer 786 (119) ve OPS 11 (93) primerleri (Tablo 3) kullanılarak sırasıyla her bir primerden 25 pmol ve 50 pmol olmak üzere 7 µl 10x PCR buffer, 8 µl 25 mM MgCl₂, deoksिनुकлеотитlerin her birinden 250 µM, 1.25 U Taq DNA Polymerase enzimi (MBI, Fermentas) ve 25 ng template DNA ilave edilerek hazırlanan PCR karışımı, 94 °C'de 3 dk ön denaturasyon aşamasını takiben, 94 °C'de 1 dk denaturasyon, 37 °C'de 1 dk hibridizasyon ve 72 °C'de 2 dk sentez olmak üzere toplam 45 siklüs amplifikasyona tabi tutuldu. Son olarak 72 °C'de 5 dk ekstra sentez işlemi uygulandı. Elektroforez işleminden sonra ethidium bromide ile boyamayı müteakip sonuçlar UV transilluminatör altında fotoğraflanarak analiz edildi.

S. aureus için uygulanan RFLP ve RAPD reaksiyonları farklı zamanlarda iki kez tekrar edildi ve sonuçlar iki bağımsız araştırmacı tarafından yorumlandı.

Tablo 3. *S. aureus*' un PCR analizlerinde ve tiplendirilmesinde kullanılan primerler.

Primer	Spesifiklik	Gen Bölgesi	Sekans (5'-3')	Literatür
Sau327	<i>S. aureus</i> (f)	23S rRNA	GGA CGA CAT TAG ACG AAT CA	(136)
Sau1645	<i>S. aureus</i> (r)	23S rRNA	CGG GCA CCT ATT TTC TAT CT	(136)
COAG2	Coagulase (f)	<i>coa</i>	CGAGACCAAGATTCAACAAG	(56)
COAG3	Coagulase (r)	<i>coa</i>	AAAGAAAACCACTCACATCA	(56)
786	RAPD	Random	GCG ATC CCC A	(119)
OPS11	RAPD	Random	AGT CGG GTG G	(93)

f: Forward primer; *r*: Reverse primer.

4.4. S. AGALACTIAE İZOLASYONU ve İDENTİFİKASYONU

4.4.1. Kültür Yöntemiyle *Streptococcus sp.* İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Toplanan süt numuneleri % 7 defibrine koyun kanı ilave edilmiş kanlı agara (Merck) ve streptokoklar için selektif bir ortam olan % 7 defibrine koyun kanı ilave edilmiş Edwards Medium Modified besi yerine (Oxoid) inokule edilerek aerobik şartlarda 37 °C'de 48-72 saat inkubasyona tabi tutuldu. Üreme meydana gelen besi yerlerindeki kolonilere primer identifikasyon testleri (Gram boyama, katalaz, oksidaz, oksidasyon - fermentasyon testi) uygulandı. Bu testlere göre katalaz negatif, oksidaz negatif ve oksidasyon-fermentasyon testinde fermentatif reaksiyon gösteren ve Gram boyama sonucunda mikroskopta Gram pozitif zincir görünümündeki koklar *Streptococcus sp.* olarak identifiye edildi. Bu izolatların tümü TSA (Difco) besi yerine geçilerek saflaştırıldı ve moleküler aşamalarda kullanılmak üzere % 15 gliserol içeren TSB (Oxoid) besi yerine aktarılarak -20 °C'de muhafaza edildi.

4.4.2. PCR ile *S. agalactiae* İdentifikasyonu

4.4.2.1. DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için, Abdulmawjood ve Lammler (1999)'in kullandığı metot modifiye edilerek uygulandı (2). Katı kültürden bir kaç koloni alınarak 100 µl Tris-EDTA buffer (TE 1x Buffer, Promega) içerisinde süspansiyon edildikten sonra 10 µl Mutanolysin solüsyonu (Sigma, 5U/ µl) ile muamele edildi ve süspansiyon 37 °C'de 60 dk inkube edildi. Daha sonra süspansiyona 5 µl proteinase K (Sigma, 25mg/ml) ilave edildi. Süspansiyon, vortekslendikten sonra 120 dk daha inkubasyona tabi tutuldu ve son olarak örnekler proteinase K'nın

inaktivasyonu için 100 °C'de 10 dk kaynatmayı takiben kısa bir santrifüj işleminden sonra soğutulup PCR 'de hedef DNA olarak kullanıldı.

4.4.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Toplam 50 µl'lik hacimde hazırlanan PCR karışımına 5 µl 10x PCR buffer, 5 µl 25 mM MgCl₂, deoksitükleotitlerin her birinden 250 µM, 1.25 U Taq DNA Polymerase enzimi (MBI, Fermentas), Riffon ve ark. (2001) tarafından bildirilen ve etkenin 16S rRNA geninden türetilen Sag 432 ve Sag 1018 primer çiftinin (Tablo 4) her birinden 50 pmol ve 25 ng template DNA ilave edildi (136). PCR reaksiyonları PCR-Sprint thermalcycler (Thermo Hybaid, İngiltere) cihazında gerçekleştirildi. PCR amplifikasyonunda 94 °C'de 2 dk ön denaturasyon aşamasını takiben, toplam 35 PCR siklüsü 94 °C'de 45 sn denaturasyon, 65 °C'de 1 dk hibridizasyon ve 72 °C'de 2 dk sentez olarak gerçekleştirildi. Son siklüsü müteakip 72 °C'de 10 dk ekstra sentez işlemi yapıldı. Amplifiye edilen PCR ürünleri % 1,5'lük agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra ethidium bromide (10 mg/ml) ile 30 dk süreyle boyandı ve UV transilluminatörde incelenerek sonuçlar gözlemlendi. Oluşan bantların moleküler ağırlığını saptamak amacıyla 100 bp 'lik DNA ladder (MBI, Fermentas SM 0321) kullanıldı. PCR ürünlerinin jel elektroforezi neticesinde oluşan 586 bp moleküler uzunluğundaki bantlar *S. agalactiae* göstergesi olarak kabul edildi.

4.5. S. AGALACTIAE’NİN MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ

4.5.1. CAMP-Faktör (*cfb*) Geninin PCR Amplifikasyonu (*cfb*-PCR)

Tür spesifik PCR ile *S. agalactiae* 'ya ait olduğu belirlenen DNA örneklerinde *cfb* geninin varlığını araştırmak amacıyla Podbielski ve ark. (1994) tarafından bildirilen bir çift spesifik primer (Tablo 4) kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirildi (125). PCR karışımı 4.4.2.2’de bildirilen yoğunluklarda hazırlandıktan sonra amplifikasyon işlemi; 93 °C’de 1,5 dk denaturasyon, 58 °C’de 1,5 dk hibridizasyon ve 72 °C’de 1,5 dk sentez olmak üzere toplam 30 siklus halinde gerçekleştirildi. Amplifiye edilen PCR ürünleri % 1,5’luk agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra ethidium bromide (10 mg/ml) ile 30 dk süreyle boyandı ve UV transilluminatörde incelenerek sonuçlar gözlemlendi. Oluşan bantların moleküler ağırlığını saptamak amacıyla 100 bp’lik DNA ladder (MBI, Fermentas SM 0321) kullanıldı. PCR ürünlerinin jel elektroforezi neticesinde 1026 bp moleküler uzunluğundaki bantlar *cfb* geninin göstergesi olarak kabul edildi. Tüm PCR uygulamalarında pozitif kontrol olarak referans *S. agalactiae* suşu (American Type Culture Collection, ATCC 13813) ve negatif kontrol olarak distile su kullanıldı.

4.5.2. CAMP-Faktör (*cfb*) Geninin RFLP Analizi (*cfb*-RFLP)

Elektroforez işlemi müteakip *cfb* geni yönünden, 1026 bp moleküler uzunluğundaki bantların görülmesiyle, pozitif olduğu belirlenen PCR ürünleri restriksiyon işlemine tabi tutuldu. *AhaI* (MBI, Fermentas, 10U/μl) ve *Tsp509I* (Biolabs, 10U/μl) restriksiyon enzimleriyle ayrı ayrı kesimleri gerçekleştirilmek amacıyla 12,5 μl PCR ürünü için, 0.2 μl restriksiyon enzimi ve 1,5 μl 10X

restriksiyon buffer katılarak hacim steril distile su ile 20 µl'ye tamamlandıktan sonra *AluI* için 37 °C'de 2 saatlik ve *Tsp509I* için 65 °C'de 1 saatlik inkubasyon işlemi uygulandı. Restriksiyona maruz bırakılan türünler % 2'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu. Ethidium bromide ile boyamayı takiben oluşan profiller UV transilluminatörde analiz edildi ve Polaroid GelCam ile fotoğraflandı.

4.5.3. *S. agalactiae* RAPD Analizi

cfb-PCR ile pozitif sonuç veren DNA örnekleri 10 bazlık OPB 18 (93) primeri (Tablo 4) ile RAPD analizine tabi tutuldu. *S. agalactiae* izolatlarının RAPD analizinde öncelikli olarak primer seçimi için rasgele seçilen beş izolatın DNA'sı kullanılarak altı farklı primer (Primer 786, 797, 798, OPS 11, OPB 17 ve OPB 18) ile deneme gerçekleştirildi. Bu primerler arasından en iyi sonuç veren OPB 18 primeri tüm izolatların RAPD analizinde kullanıldı.

Toplam 50 µl'lik hacimde hazırlanan PCR karışımına 7 µl 10x PCR buffer, 8 µl 25 mM MgCl₂, deoksिनükleotitlerin her birinden 250 µM, 1.25 U Taq DNA Polymerase enzimi (MBI, Fermentas), 50 pmol primer ve 25 ng template DNA ilave edildi. PCR amplifikasyonu; 94 °C'de 30 sn denaturasyon, 35 °C'de 30 sn hibridizasyon ve 72 °C'de 1 dk sentez olmak üzere toplam 45 siklus gerçekleştirildi. Son olarak 72 °C'de 5 dk bir ekstra sentez işlemi uygulandı. Elektroforez işleminden sonra ethidium bromide ile boyamayı müteakip sonuçlar UV transilluminatör altında fotoğraflanarak analiz edildi.

S. agalactiae için uygulanan RFLP ve RAPD reaksiyonları farklı zamanlarda iki kez tekrar edildi ve sonuçlar iki bağımsız araştırmacı tarafından yorumlandı.

Tablo 4. *S. agalactiae*'nin PCR analizlerinde ve tiplendirilmesinde kullanılan primerler.

Primer	Spesifiklik	Gen Bölgesi	Sekans (5'-3')	Literatür
Sag432	<i>S. agalactiae</i> (f)	16S rRNA	CGT TGG TAG GAG TGG AAA AT	(136)
Sag1018	<i>S. agalactiae</i> (r)	16S rRNA	CTG CTC CGA AGA GAA AGC CT	(136)
camp13	CAMP-Factor (f)	<i>cfb</i>	ATC GTT ATG GTT TTT ACA TGA	(125)
clon 2	CAMP-Factor (r)	<i>cfb</i>	TTA TTT TAA TGC TGT TTG AAG TG	(125)
OPB 18	RAPD	Random	CCA CAG CAG T	(93)

f: Forward primer; *r*: Reverse primer.

4.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Farklı yerleşim yerlerinden elde edilen *Streptococcus sp.* ve *S. agalactiae* izolasyon ve identifikasyon oranları arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemliliğini ortaya koymak amacıyla χ^2 testi kullanıldı. $P < 0,05$ bulunan olasılık değerleri istatistiksel olarak önemli kabul edildi.



4.7. KÜLTÜR VE PCR AŞAMALARINDA KULLANILAN AYIRAÇLAR

4.7.1. Kültür ile İzolasyon ve İdentifikasyonda Kullanılan Ayıraçlar

Kaliforniya Mastitis Test (CMT) Ayıracı

Anyonik deterjan (By-prox)	100 ml
Bromocreasol purple (1/300)	50 ml
Distile Su	900 ml

0,17 g Bromocreasol purple tartıldıktan sonra 50 ml distile su içerisinde eritildi. Üzerine 100 ml anyonik deterjan ve 900 ml distile su ilave edilip iyice karıştırıldıktan sonra pH 6,8'e ayarlanarak kullanıldı.

Kanlı Agar (Blood Agar Base), (Merck, Darmstadt, Germany)

Nutrient Substrate	20 g
Sodium Chloride	5 g
Agar	15 g

40 g kanlı agar 1 L distile su içerisinde eritilip, 121 °C'de 15-20 dk otoklavlandı. Besi yeri 45-50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine % 7 steril koyun kanı ilave edildi. Dikkatli bir şekilde karıştırılıp steril petri kutularına 15-20 ml taksim edildi.

Tryptic Soy Agar (TSA), (Difco, Detroit Michigan, US)

Bacto-Tryptone (Pancreatic Digest of Casein)	15 g
Bacto-Soytone (Papaic Digest of Soybean Meal)	5 g
Sodium Chloride	5 g
Bacto-Agar	15 g

40 g TSA besi yeri 1 L distile su içerisinde eritilip, 121 °C'de 15-20 dk otoklavlandı. Besi yeri 45-50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra dikkatli bir şekilde karıştırılıp steril petri kutularına 15-20 ml taksim edildi.

Tryptone Soya Broth (TSB), (Oxoid, London, England)

Pancreatic digest of casein	17 g
Papaic digest of soybean meal	3 g
Sodium chloride	5 g
Dibasic potassium phosphate	2,5 g
Glucose	2,5 g

30 g TSB besi yeri 1 L distile su içerisinde eritildikten sonra bakterilerin daha uzun süre canlı kalabilmeleri için % 15 oranında gliserol ilave edildi ve 121 °C'de 15-20 dk otoklavlandı. Steril tüpler içerisine 10'ar ml dağıtıldı.

Edwards Medium (Modified)-(Oxoid, London, England)

Lab-Lemco Powder (Oxoid L-29)	10 g
Peptone	10 g
Aesculin	1 g
Sodium Chloride	5 g
Crystal Violet	0,0013 g
Thallos sulphate	0,33 g
Agar	15 g

41 g Edwards besi yeri 1 L distile su içerisinde eritilip, 121 °C’de 15-20 dk otoklavlandı. Besi yeri 45-50 °C’ye kadar soğutulduktan sonra içerisinde % 7 steril koyun kanı ilave edildi. Dikkatli bir şekilde karıştırılıp steril petri kutularına 15-20 ml taksim edildi.

Katalaz Test Ayıracı

% 3’lük Hidrojen peroksit (H₂O₂) kullanıldı. Gram boyama sonucunda Gram pozitif kok görünümündeki izolatların TSA’da üretilen saf ve taze kültürlerinden bir koloni alınarak temiz bir lam üzerinde ezildi. % 3’lük H₂O₂ solüsyonundan bir damla lam üzerindeki koloniye damlatıldı. Reaksiyon sonucunda gaz kabarcıklarının görülmesi katalaz pozitif, kabarcık görülmemesi ise katalaz negatif olarak değerlendirildi.

Oksidaz Test Ayıracı

% 0,5'lik N,N,N',N'-tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride kullanıldı. *Staphylococcus sp.* ve *Streptococcus sp.* olarak şüphelenilen izolatları *Micrococcus sp.*'lerden ayırmak için oksidaz testi uygulandı. Oksidaz test ayıracından bir öze dolusu alınıp şüpheli izolatların kolonilerine damlatıldı. Reaksiyon sonucunda ayıracın mor rengini almayan koloniler oksidaz negatif olarak değerlendirildi ve *Staphylococcus sp.* ve *Streptococcus sp.* şüpheli olarak ayrıldı.

Oksidasyon-Fermentasyon (O/F) Testi Besi Yeri (Hugh and Leifson's Medium)

Peptone	2 g
Sodium Chloride	5 g
Dibasic Potassium Phosphate	1,5 g
Agar	3 g
Distile Su	1000 ml
% 0,2 Bromthymol blue	15 ml

Besi yeri bromthymol blue katılmadan önce distile su içerisinde eritildi. pH 7,1'e ayarlanıp bromthymol blue eklendikten sonra 121 °C'de 15 dk otoklavlandı. Son konsantrasyon % 1 olacak şekilde steril glikoz eklendi ve iyice karıştırıldıktan sonra steril tüpler içerisine 10'ar ml dağıtıldı.

Gram boyama sonucunda şüpheli izolatların herbirinin O/F besi yeri bulunan iki tüp içerisine ekimleri gerçekleştirildi. Tüplerden birinin üzerine sıvı parafin damlatıldıktan sonra 24 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonucunda

her iki tüpteki besi yerinin renginin mavi-yeşilden sarıya dönüşmesi fermentatif mikroorganizma olarak değerlendirildi. Bu şekilde reaksiyon veren izolatlar *Staphylococcus sp.* ve *Streptococcus sp.* şüpheli olarak ayrıldı.

4.7.2. PCR İşleminde Kullanılan Ayıraçlar

4.7.2.1. DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Ayıraçlar

Lysostaphin Solüsyonu (5 mg, Sigma, St. Louis, MO, US)

1 ml'sinde 100 µg olacak şekilde hazırlandı. *S. aureus* izolatlarının DNA ekstraksiyonunda kullanıldı.

Proteinase K Solüsyonu (100 mg, Sigma, St. Louis, MO, US)

1 ml'sinde 100 µg olacak şekilde hazırlandı.

Tris-HCl Solüsyonu (1 M, Sigma, St. Louis, MO, US)

1/10 oranında sulandırıldı ve 0,1 M olarak hazırlandı.

1x Tris-EDTA (TE) Buffer (Promega, Madison, US)

Ticari olarak temin edilen 1x Tris-EDTA tableti 100 ml steril distile su içerisinde eritildikten sonra kullanıldı.

Mutanolysin (10000 U; Sigma, St. Louis, MO, US)

2 ml steril distile su içerisinde sulandırıldı. *S. agalactiae* izolatlarının DNA ekstraksiyonunda kullanıldı.

4.7.2.2. PCR Analizinde Kullanılan Ayıraçlar

10x PCR Buffer (MBI Fermentas, Lithuania)

750 mM Tris-HCl (pH 8,8; 25 °C)

200 mM (NH₄)₂SO₄

% 0,1 Tween 20

Her PCR numunesi için 5 µl kullanıldı.

MgCl₂ (MBI Fermentas, Lithuania)

25 mM MgCl₂ her PCR numunesi için 5 µl kullanıldı.

dNTP Set (100mM; dATP,dCTP,dGTP,dTTP; MBI Fermentas, Lithuania)

Her deoksiniükleotitten eşit oranda alındı ve steril distile su ile 1/20 oranında sulandırıldı. Her PCR numunesi için 4 µl kullanıldı.

Taq DNA Polymerase Enzimi (500 U; MBI Fermentas, Lithuania)

Her PCR numunesi için 1,25 U (0,25 µl) kullanıldı.

Primerler (IDT, Coralville, US)

Çalışmada kullanılan tüm primerler Integrated DNA Technologies (IDT) firmasından temin edildi. Primerler PCR işleminin optimizasyonu esnasında her PCR numunesi için ortalama 25–50 pmol olacak şekilde sulandırıldı.

4.7.2.3. PCR-RFLP Analizinde Kullanılan Ayıraçlar

***AluI* Restriksiyon Enzimi (10U/µl; MBI Fermentas, Lithuania)**

Her PCR ürünü için 0,2 µl enzim kullanıldı.

***Hin6I* Restriksiyon Enzimi (10U/µl; MBI Fermentas, Lithuania)**

Her PCR ürünü için 0,2 µl enzim kullanıldı.

10x Restriksiyon Buffer (*AluI* ve *Hin6I*; MBI Fermentas, Lithuania)

33 mM Tris acetate (pH 7,9)

10 mM Magnesium acetate

66 mM Potassium acetate

0,1 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA)

Her PCR ürünü için 1,5 µl 10x Restriksiyon buffer'ı kullanıldı.

***Tsp509I* Restriksiyon Enzimi (10U/ µl; New England BioLabs, US)**

Her PCR ürünü için 0,2 µl enzim kullanıldı.

10x Restriksiyon Buffer (*Tsp509I*; 10x NE Buffer 1, New England BioLabs, US)

100 mM Bis Tris Propane-HCl

100 mM MgCl₂

10 mM Dithiothreitol

pH 7,0; 25°C

Her PCR ürünü için 1,5 µl 10x Restriksiyon buffer'ı kullanıldı.

4.7.2.4. Elektroforez İşleminde Kullanılan Ayıraçlar

5x Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) Elektroforez Tampon Solüsyonu

Tris	54,4 g
Borik Asit	27,2 g
EDTA	4,6 g

Yukarıdaki maddeler tartılıp distile su ile 1 L'ye tamamlandı ve pH 8,3'e ayarlandı. Elektroforez solüsyonu olarak 1/5 oranında sulandırılarak kullanıldı.

Agarose LE, (Promega, Madison, US)

PCR ürünlerinin gözlenmesi için hazırlanan agaroz jeli 1x TBE ile % 1,5 oranında hazırlandı.

100 bp DNA Ladder (50µg/100µl; MBI Fermentas, Lithuania)

1/6 oranında sulandırıldı ve agaroz jel kuyucuğuna 5 µl yüklendi.

6x Loading Dye (Yükleme Boyası) Solüsyonu (MBI Fermentas, Lithuania)

1/5 oranında sulandırıldı ve her 20 µl PCR ürünü için 5 µl kullanıldı.

Ethidium Bromide (10 mg/ml; AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany)

Ethidium bromide solüsyonundan 0,5 ml alınarak distile su ile 15 ml'ye tamamlandı. Agaroz jelin boyanması için 300 ml distile suya 600 µl ethidium bromide katılarak kullanıldı.

5. BULGULAR

5.1. STAPHYLOCOCCUS AUREUS

5.1.1 *Staphylococcus sp.* İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Subklinik mastitisten şüpheli süt ineklerinden toplanan süt örneklerinin % 52,4'ü (367/700) uygulanan kültür ve biyokimyasal işlemler neticesinde *Staphylococcus sp.* olarak izole ve identifiye edildi.

5.1.2. PCR ile *S. aureus* İdentifikasyon Bulguları

Staphylococcus sp. olarak identifiye edilen izolatların DNA'larının *S. aureus* tür spesifik primerler ile PCR amplifikasyonuna tabi tutulmaları neticesinde % 54,5'inde (200/367) *S. aureus* 'a spesifik 1318 bp uzunluğunda bantlar elde edildi (Şekil 1). Böylece süt numunelerinin tamamı dikkate alındığında *S. aureus*'un izolasyon ve identifikasyon oranı % 28,6 (200/700) olarak hesaplandı.

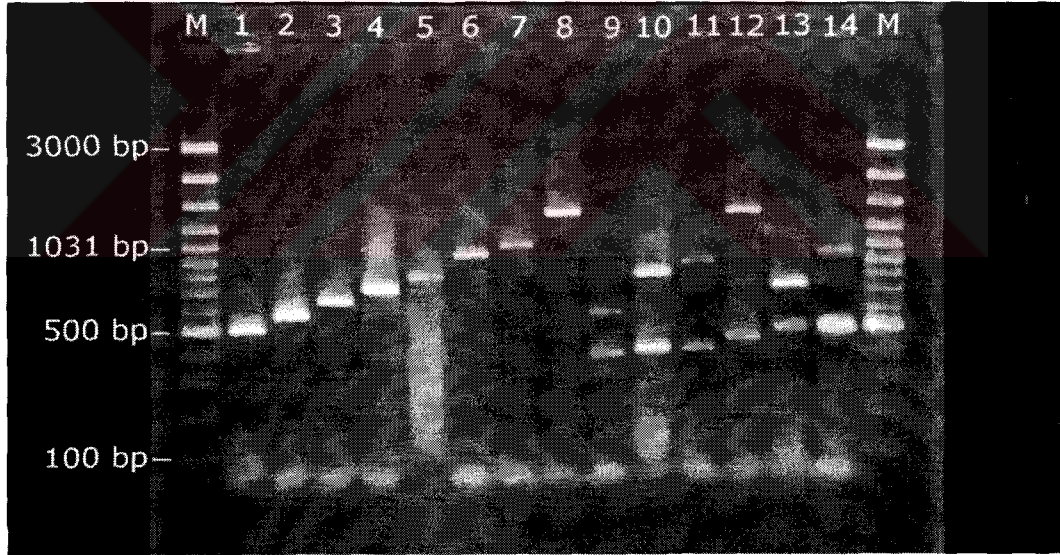


Şekil 1. *Staphylococcus sp.* olarak identifiye edilen kültürlerden elde edilen DNA'ların *S. aureus* tür spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR analizi sonucu oluşan ürünlerin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü.

M: DNA Ladder (100 bp), 1-12: *S. aureus* pozitif süt örnekleri, N: Negatif Kontrol, P: Pozitif Kontrol.

5.1.3. *S. aureus* *coa*-PCR Bulguları

Tür spesifik PCR ile *S. aureus* olarak identifiye edilen 200 izolatın *coa* genine spesifik primerler ile PCR amplifikasyonu sonucunda, toplam 161 (% 80,5) izolat koagülaz pozitif olarak identifiye edildi. *coa*-PCR'da izolatların çoğunda (n = 135, % 83,9) moleküler uzunlukları 500-1400 bp arasında değişen ve tek bir banttandır oluşan amplifikasyon ürünleri tespit edilirken, az sayıdaki izolatta (n = 26, % 16,1) çift amplifikasyon ürünleri tespit edildi. Yaklaşık olarak 950 bp moleküler uzunlukta tek bant oluşturan PCR ürünü toplam 55 izolatta saptandı ve en yaygın profil olduğu gözlemlendi. Tek bant oluşturan *coa* pozitif izolatlarda sekiz, çift bant oluşturan izolatlarda ise altı farklı moleküler uzunluklarda amplifikasyon ürünleri tespit edildi (Şekil 2).



Şekil 2. *S. aureus* izolatlarının *coa*-PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü.

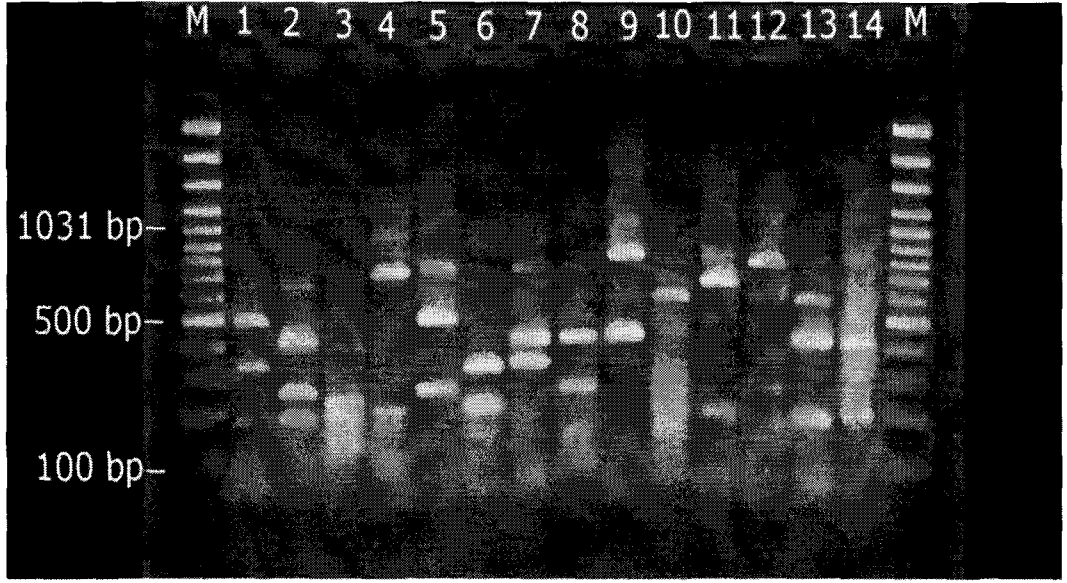
M: DNA Ladder (100 bp), 1-8: Tek bant amplifikasyon ürünleri, 9-14: Çift bant amplifikasyon ürünleri

5.1.4. *S.aureus coa*-RFLP Bulguları

Tablo 5’de özetlendiği gibi, *coa* pozitif PCR ürünlerinin *AluI* ve *Hin6I* restriksiyon enzimleri ile yapılan RFLP analizi neticesinde *AluI* ile toplam 23 (Şekil 3a, Şekil 3b), *Hin6I* ile 22 (Şekil 4a, Şekil 4b) farklı restriksiyon profili elde edildi. Bu sonuçlara göre, 161 izolattan hem *AluI* hem de *Hin6I* ile predominant olarak rastlanan profillerin, *coa*-PCR neticesinde 950 bp uzunluğunda tek bant oluşturan 55 izolattan elde edilen profiller olduğu gözlemlendi. *AluI* enzimi ile en yaygın olarak saptanan dört profil % 68,9 oranında, *Hin6I* ile ise % 65,2 oranında elde edildi. *AluI* ile elde edilen 23 profilin 16’sı beşten az sayıdaki izolatta gözlenirken, *Hin6I* ile elde edilen 22 profilin 12’si beş’ten az sayıdaki izolatta gözlemlendi.

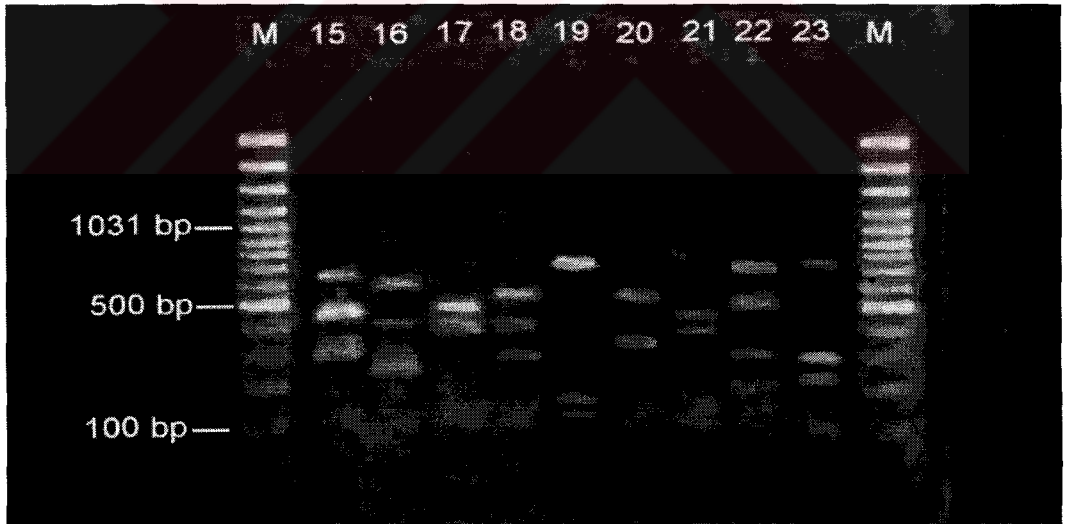
Tablo 5. Sublinik mastitis şüpheli ineklerden elde edilen *coa* pozitif *S. aureus* izolatlarında gözlenen RFLP profillerinin dağılımı

PCR ürünü (bp)	İzolat Sayısı	<i>AluI</i> Profili	<i>Hin6I</i> Profili
500	7	I	I
580	2	II	II
700	20	III	III
700	3	IV	IV
700	1	V	II
750	9	VI	V
750	5	VII	VI
750	4	VIII	VII
750	2	IX	VIII
800	5	X	IX
800	3	XI	X
800	1	XII	XI
800	1	XIII	XII
950	55	XIV	XIII
1050	1	XV	XIV
1400	15	XVI	XV
1400	1	XVII	XVI
380-580	1	XVIII	XVII
400-800	6	X	XVIII
400-800	4	XIX	X
400-850	1	XX	X
400-850	1	XXI	XIX
480-1400	1	XXII	XX
500-750	2	XXIII	XXI
500-950	10	X	XXII



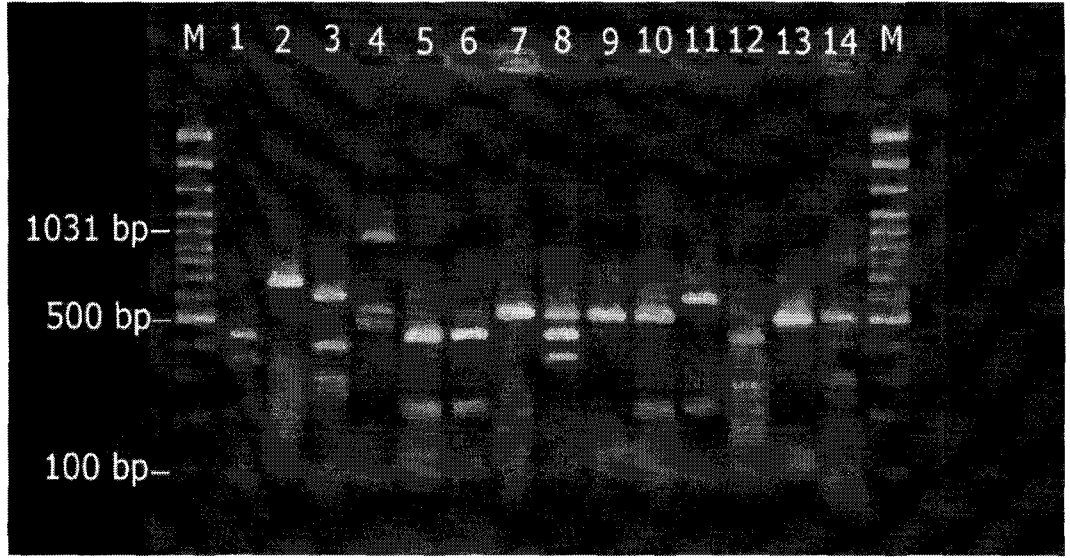
Şekil 3a. *AluI* ile muamele edilmiş *coa*-PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü.

M: DNA Ladder (100 bp), 1-14: Birden fazla izolatta oluşan farklı *AluI* restriksiyon profilleri (1 no'lu kuyucuk: en yaygın profil).



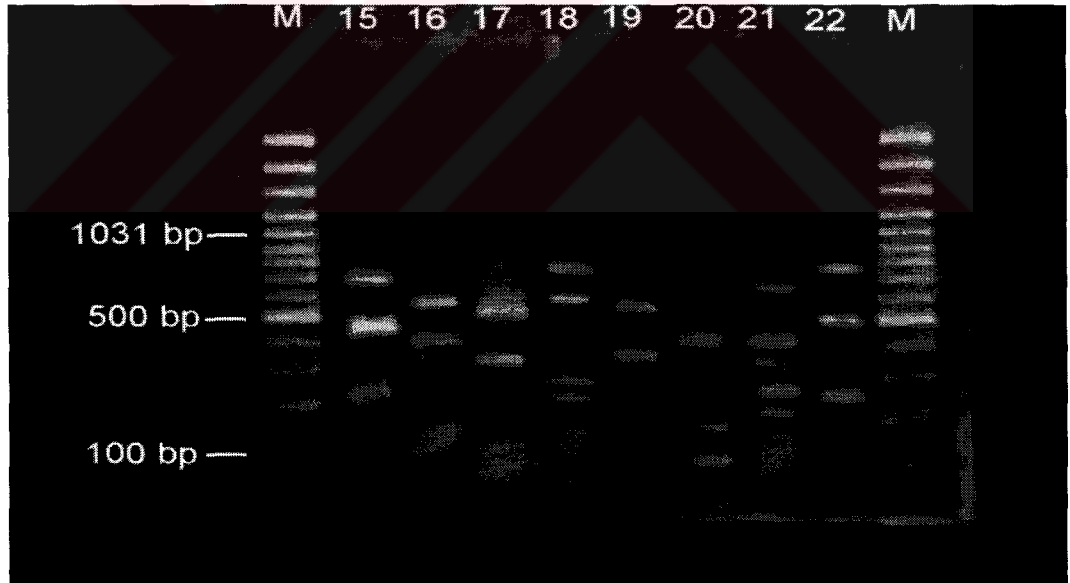
Şekil 3b. *AluI* ile muamele edilmiş *coa*-PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü.

M: DNA Ladder (100 bp), 15-23: Sadece birer izolatta oluşan farklı *AluI* restriksiyon profilleri.



Şekil 4a. *Hin6I* ile muamele edilmiş *coa*-PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü.

M: DNA Ladder (100 bp), 1-14: Birden fazla izolatta oluşan farklı *Hin6I* restriksiyon profilleri (1 no'lu kuyucuk: en yaygın profil).



Şekil 4b. *Hin6I* ile muamele edilmiş *coa*-PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü.

M: DNA Ladder (100 bp), 15-21: Sadece birer izolatta oluşan farklı *Hin6I* restriksiyon profilleri, 22: Birden fazla izolatta oluşan farklı *Hin6I* restriksiyon profili.

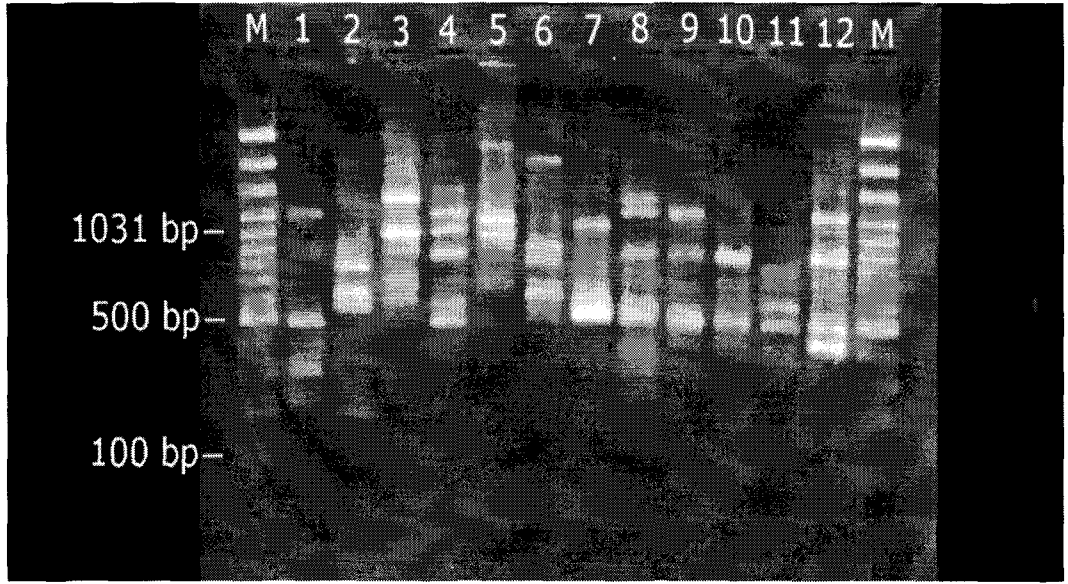
5.1.5. *S. aureus* RAPD Bulguları

Primer 786 ve OPS 11 primerleri ile yapılan RAPD analizinde *coa* pozitif *S. aureus* izolatları arasında sırasıyla 32 ve 30 farklı RAPD profilleri elde edildi (Tablo 6). Primer 786 ile elde edilen en yaygın profil, izolatların yaklaşık olarak yarısında (% 49,7) saptandı. Bununla birlikte, OPS 11 primeriyle en yaygın olarak saptanan RAPD profili, *coa* pozitif izolatların yarıdan fazlasında (% 57,1) gözlemlendi. Her iki primer ile elde edilen diğer profiller çok az sayıdaki izolatta tespit edildi (Şekil 5a, 5b, 6a, 6b).

Tablo 6. Subklinik mastitis şüpheli ineklerden elde edilen *coa* pozitif *S. aureus* izolatlarında gözlenen RAPD profillerinin dağılımı.

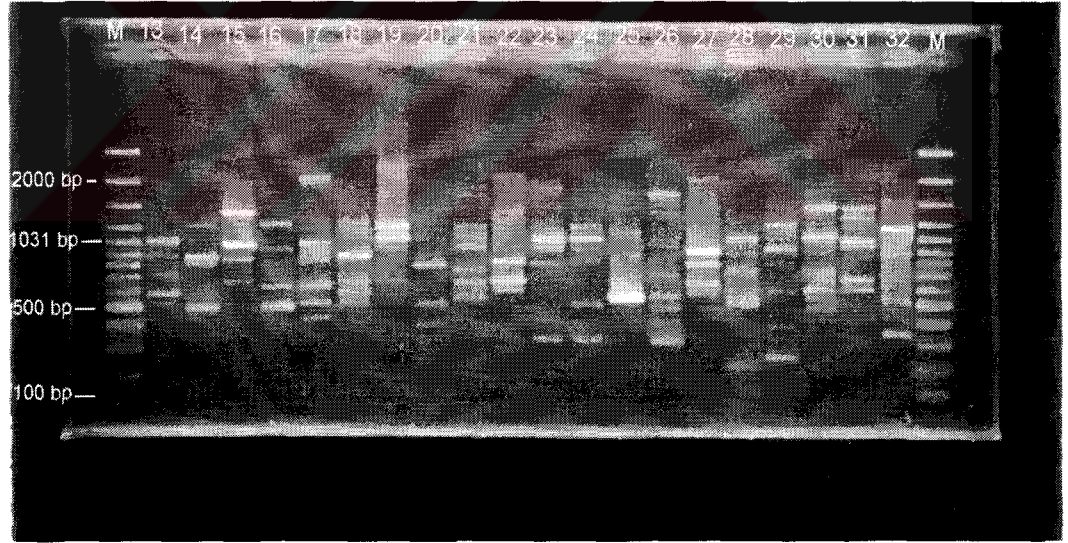
Profil Tipi (Primer 786)	İzolat Sayısı	Profil Tipi (OPS 11)	İzolat Sayısı
1	80	1	92
2	12	2	14
3	10	3	10
4	8	4	5
5	7	5	5
6	6	6	4
7	5	7	4
8	3	8	2
9	3	9	2
10	3	10	2
11	2	11	2
12	2	12-30*	19
13-32*	20		
Toplam	161	Toplam	161

* Bu profillerin herbiri sadece bir izolatta gözlemlendi.



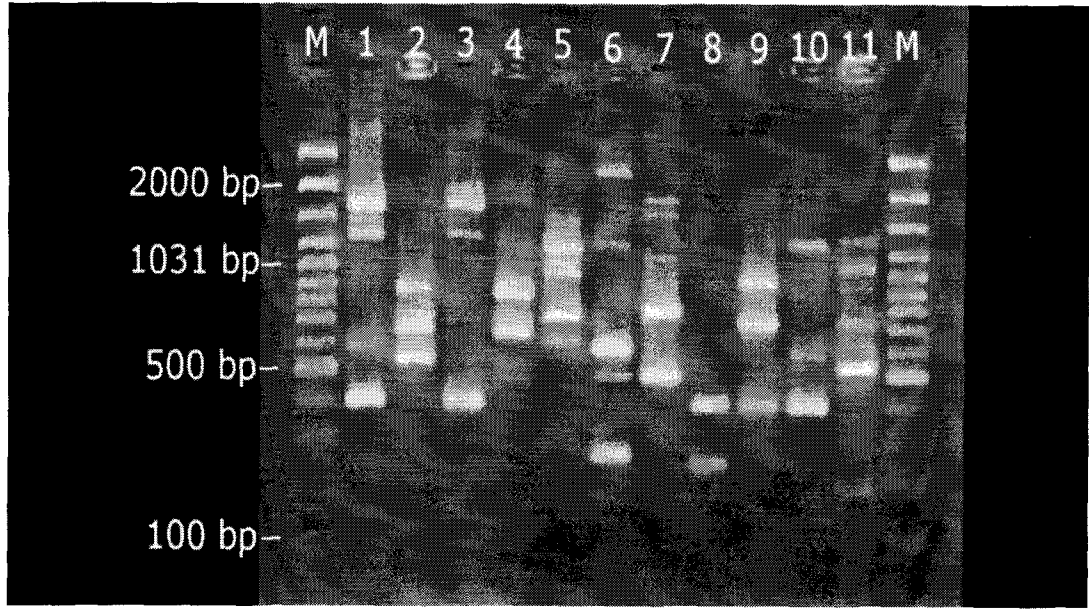
Şekil 5a. *coa* pozitif *S. aureus*'ların RAPD analizi (Primer 786) ile tiplendirilmesi.

M: DNA Ladder (100 bp), 1-12: Birden fazla sayıdaki izolatta gözlenen RAPD profilleri (1 no'lu kuyucuk: en yaygın profil).

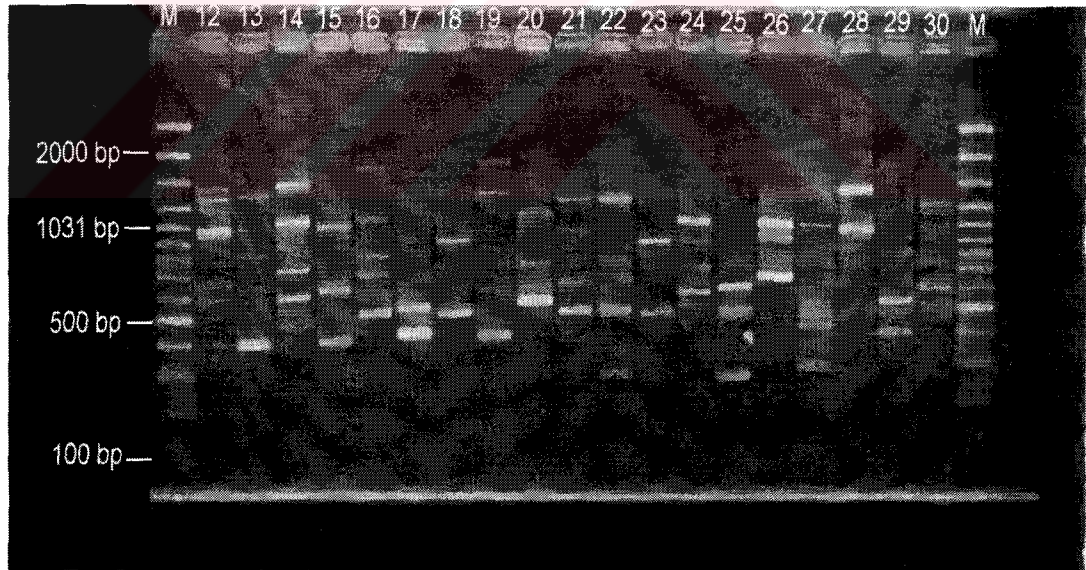


Şekil 5b. *coa* pozitif *S. aureus*'ların RAPD analizi (Primer 786) ile tiplendirilmesi.

M: DNA Ladder (100 bp), 13-32: Sadece birer izolatta gözlenen RAPD profilleri.



Şekil 6a. *coa* pozitif *S. aureus*'ların RAPD analizi (OPS 11) ile tiplendirilmesi.
M: DNA Ladder (100 bp), 1-11: Birden fazla sayıdaki izolatta gözlenen RAPD profilleri
(1 no'lu kuyucuk: en yaygın profil).



Şekil 6b. *coa* pozitif *S. aureus*'ların RAPD analizi (OPS 11) ile tiplendirilmesi.
M: DNA Ladder (100 bp), 12-30: Sadece birer izolatta gözlenen RAPD profilleri.

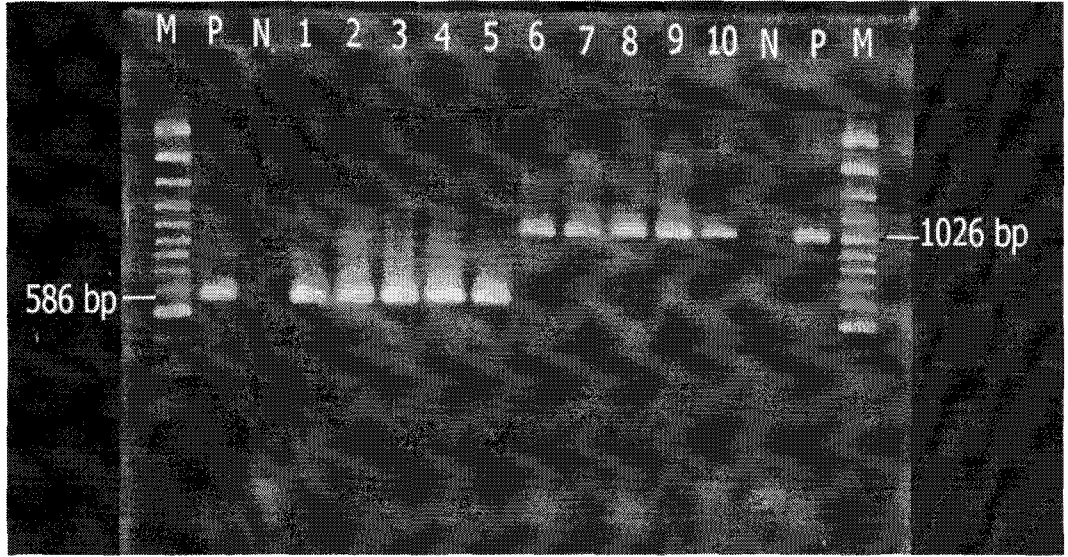
5.2. STREPTOCOCCUS AGALACTIAE

5.2.1. Streptococcus sp. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Subklinik mastitisten şüpheli süt ineklerinden toplanan süt örneklerinin % 24,3'ü (199/820) uygulanan kültür ve biyokimyasal işlemler neticesinde *Streptococcus sp.* olarak izole ve identifiye edildi.

5.2.2. PCR ile *S. agalactiae* İdentifikasyon Bulguları

S. agalactiae'nın 16S rRNA geninden türetilen spesifik primerler ile PCR amplifikasyonuna tabi tutulmaları neticesinde izolatların % 42,7'sinde (85/199) *S. agalactiae*'ya spesifik 586 bp uzunluğunda bantlar elde edildi (Şekil 7). Böylece CMT pozitif süt numunelerinin % 10,4'ünde (85/820) *S. agalactiae*'nın izolasyon ve identifikasyonu gerçekleştirildi. Süt örneği toplanan bölgeler arasında *Streptococcus sp.* ($p<0,001$) ve *S. agalactiae* ($p<0,001$) izolasyon ve identifikasyon oranları istatistiksel olarak farklılık gösterdi. Tablo 7'de süt numunelerinin toplandığı bölgelere göre izolasyon ve identifikasyon bulguları özetlenmiştir.



Şekil 7. *Streptococcus sp.* olarak tanımlanan kültürlerden elde edilen DNA'ların *S. agalactiae* 16S rRNA genine ve *cfb* genine spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR analizi sonucu oluşan ürünlerin etidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü.

M: DNA Ladder (100 bp),

P: Pozitif kontrol,

N: Negatif kontrol,

1-5: 16S rRNA geni yönünden pozitif *S. agalactiae* süt örnekleri,

6-10: *cfb* geni yönünden pozitif *S. agalactiae* örnekleri.

Tablo 7. CMT pozitif süt örneklerinden izole edilen Streptokokların bölgelere göre dağılımı

Bölgeler	Süt Örnekleri	Non- <i>agalactiae</i>			<i>S. agalactiae</i> *	
		<i>Streptococcus sp.</i> *	Streptokoklar	16S rRNA	<i>cfb</i>	
A	126	19 (% 15,1)	13 (% 10,3)	6 (% 4,8)	6 (% 4,8)	
B	151	18 (% 11,9)	18 (% 11,9)	0	0	
C	108	32 (% 29,6)	9 (% 8,3)	23 (% 21,3)	23 (% 21,3)	
D	85	17 (% 20)	4 (% 4,7)	13 (% 15,3)	13 (% 15,3)	
E	350	113 (% 32,3)	70 (% 20)	43 (% 12,3)	43 (% 12,3)	
Toplam	820	199 (% 24,3)	114 (% 13,9)	85 (% 10,4)	85 (% 10,4)	

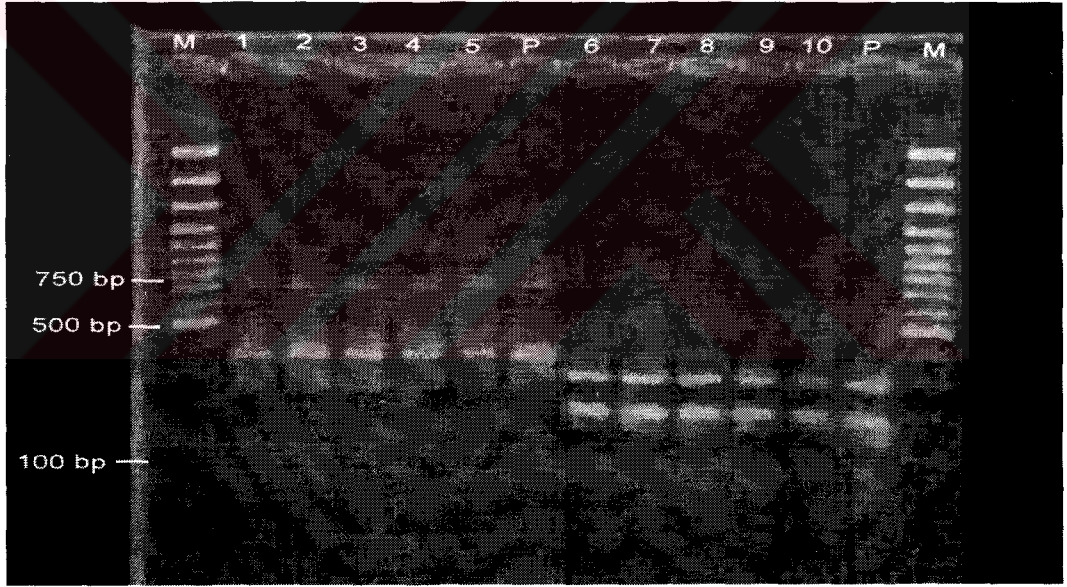
* p < 0,001

5.2.3. *S. agalactiae* *cfb*-PCR Bulguları

Tür spesifik PCR ile *S. agalactiae* olarak identifiye edilen 85 izolatın *cfb* genine spesifik primerler ile PCR amplifikasyonu sonucunda izolatların tümünde 1026 bp uzunluğundaki spesifik bantlar gözlemlendi (Şekil 7).

5.2.4. *S. agalactiae* *cfb*-RFLP Bulguları

cfb-PCR sonucunda elde edilen amplifikasyon ürünlerinin *AluI* ve *Tsp* 509I restriksiyon enzimleri ile yapılan RFLP analizi neticesinde *S. agalactiae* izolatlarının tümünde her iki enzim ile aynı restriksiyon profilleri saptandı (Şekil 8).

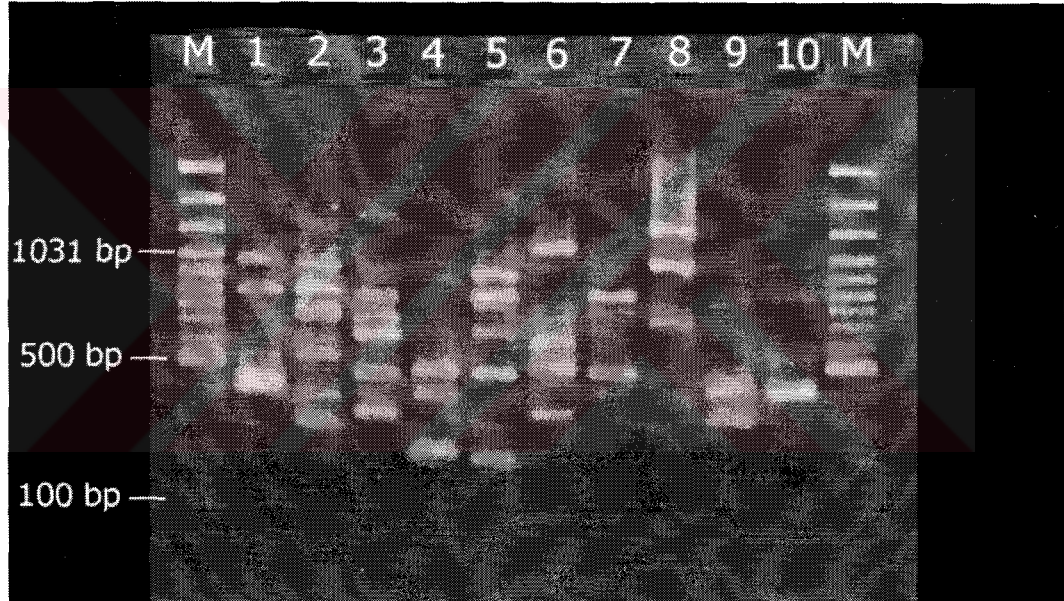


Şekil 8. *AluI* ve *Tsp* 509I ile muamele edilmiş *cfb*-PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü

M: DNA Ladder (100 bp), P: Referens *S. agalactiae* kültürü, 1-5: *AluI* restriksiyon profilleri, 6-10: *Tsp* 509I restriksiyon profilleri.

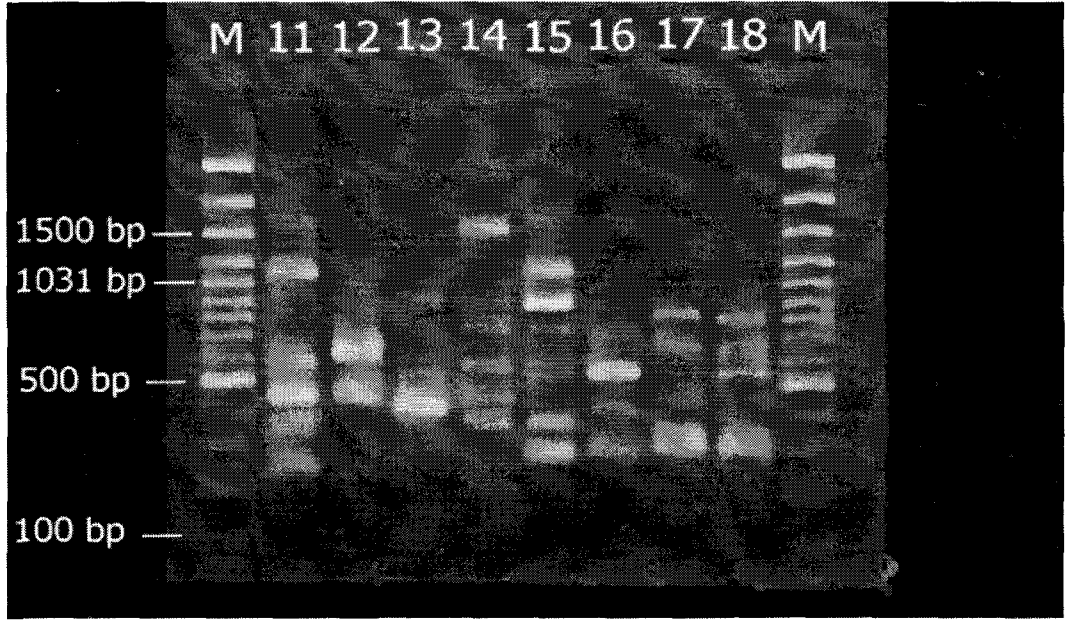
5.2.5. *S. agalactiae* RAPD Bulguları

S. agalactiae olarak tanımlanan 85 izolatın OPB 18 primeri ile yapılan RAPD analizi neticesinde 18 farklı profil elde edildi. En yaygın RAPD profili % 55,3 ile 47 izolatta (Şekil 9a) saptanırken, profillerden sekiz tanesinin sadece birer izolatta gözlenmesi dikkat çekti (Şekil 9b). C bölgesinden elde edilen izolatlardaki en yaygın profil tipi 23 izolatın 11'inde saptandı. Bu profil tipi A, B ve D bölgelerinde saptanmazken E bölgesinde sadece bir izolatla tespit edildi. RAPD profillerinin bölgelere göre dağılımı Tablo 8'de gösterilmiştir.



Şekil 9a. *cfb* pozitif *S. agalactiae*'ların RAPD analizi (OPB 18) ile tiplendirilmesi.

M: DNA Ladder (100 bp), 1-10: Birden fazla sayıdaki izolatla gözlenen RAPD profilleri.



Şekil 9b. *cfb* pozitif *S. agalactiae*'ların RAPD analizi (OPB18) ile tiplendirilmesi.

M: DNA Ladder (100 bp), 11-18: Sadece birer izolatta gözlenen RAPD profilleri.

Tablo 8. *S. agalactiae* izolatlarındaki RAPD profillerinin dağılımı

Profil Tipi	İzolat Sayısı	Bölgesel Dağılım
I	47	A (2), C (2), D (11), E (32)
II	12	C (11), E (1)
III	3	C (3)
IV	3	A (3)
V	2	C (1), E (1)
VI	2	C (1), E (1)
VII	2	C (2)
VIII	2	D (2)
IX	2	E (2)
X	2	E (2)
XI	1	C (1)
XII	1	C (1)
XIII	1	E (1)
XIV	1	C (1)
XV	1	A (1)
XVI	1	E (1)
XVII	1	E (1)
XVIII	1	E (1)

6. TARTIŞMA

Mastitis, son derece kompleks bir etiyolojiye sahip olduğundan dolayı mevcut koşullarda eradikasyonu mümkün olmayan bir yetiştirme hastalığıdır. Türkiye’de mastitisin neden olduğu ekonomik kayıplarla ilgili herhangi bir istatistik bulunmamakla birlikte batı ülkelerinde yapılan çalışmalarda süt sığırcılık işletmelerinde endemik olarak seyreden hayvan hastalıkları içerisinde en fazla ekonomik kaybın mastitis, özellikle subklinik mastitis nedeniyle olduğu bildirilmiştir (21, 176). Türkiye’de subklinik mastitislerin büyük bir çoğunluğuna Gram pozitif kok mikroorganizmaların neden olduğu yapılan araştırmalar sonucunda ortaya konmuştur (11).

Bu çalışmada, dünyada ve Türkiye’de süt sığırcılık endüstrisinin ekonomik yönden en önemli problemlerinden biri olan mastitis vakalarında çok yaygın olarak gözlenen *S. aureus*’ların CMT ile pozitif olarak belirlenen sığır süt örneklerinden izolasyonu ve koagülaz pozitif olan izolatların moleküler tiplendirilmesi amaçlandı. Buna ilaveten yine Türkiye’de süt sığırcılığını etkileyen en önemli patojenlerden birisi olan *S. agalactiae*’nın izolasyonu ve *cfb* geni yönünden pozitif bulunan izolatlar arasındaki genetik polimorfizmin saptanmasına çalışıldı. Bu amaçla öncelikli olarak etken izolasyonu ve spesifik PCR ile identifikasyon işlemleri gerçekleştirildi. Bu işlemler neticesinde Elazığ ili ve civarındaki ineklerden toplanan süt örneklerinin % 28,6’sında *S. aureus*, doğu ve güneydoğudaki beş farklı bölgeden toplanan süt örneklerinin % 10,4’ünden ise *S. agalactiae* izole ve identifiye edildi. *S. aureus*’un, *S. agalactiae*’ya göre daha yüksek oranda izole edilmesi önceki yıllarda yapılan çalışmalarda da

gözlemlenmiş olup bu durumun; *S. agalactiae*'nin zorunlu meme içi bir bakteri olması, dış ortamda canlı kalabilme yeteneğinin düşük olması ve mastitis saptanan sürülerde uygulanan meme içi antibiyotik uygulamaları sonucunda Stafilokokların penisilinler başta olmak üzere farklı antibiyotiklere karşı direnç geliştirme mekanizmalarının Streptokoklara oranla daha yüksek olması gibi faktörlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinde gerçekleştirilen önceki çalışmalarda, subklinik mastitisli ineklerde *S. aureus*'un yaklaşık olarak % 20 ile % 40, *S. agalactiae*'nin ise % 10 ile % 20 arasında değişen oranlarda tespit edildiği bildirilmiştir (80, 103, 161). Bu veriler, mastitisin nedeni olan en önemli etkenlerden *S. aureus* ve *S. agalactiae*'nin tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de halen önemli seviyelerde seyrettiğini göstermektedir. Ancak şimdiye kadar yapılan çalışmalardan elde edilen verilerin ışığında uygulanan tedavi stratejilerinden uzun vadede başarı elde edilememiştir. Bu durumu doğuran nedenler arasında mastitisin risk faktörlerinin sağlıklı bir şekilde saptanamaması ve bu yönde gerekli koruyucu tedbirlerin alınamamasının yanı sıra hastalık etkenlerinin genetik yapı farklılıklarının bilinmemesinin de önemli rol oynadığı düşünülmektedir (133, 150, 183, 184). Türkiye'de mastitise neden olan etkenlerde ne oranda bir genetik polimorfizm olduğunu ya da bu etkenlerin kaç farklı suşunun mastitiste dominant olduğunu ortaya koymaya yönelik bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmada, tür spesifik PCR sonucunda *S. aureus* olarak tanımlanan izolatlarda koagülaz geninin varlığı *coa*-PCR ile ortaya konduktan sonra bu geni taşıyan suşlardaki genetik polimorfizm araştırıldı. Koagülaz üretiminin fagositoz gibi konakçı savunmasıyla karşılaştığında bakteriyel üremeyi sağladığı ve

dolayısıyla infeksiyonu arttırdığı göz önüne alınacak olursa, bu faktördeki genetik yapı farklılıklarının ortaya konmasının önemi anlaşılabilir (1, 7, 70). Zaten halen klinik mikrobiyoloji laboratuvarları tarafından patojenik *S. aureus*'ların identifikasyonu amacıyla konvansiyonel yöntemler ile koagulaz üretiminin varlığının ortaya konulması en önemli fenotipik belirleyici olarak kullanılmaktadır (56, 65, 144). Bu gen bölgesinin çalışmada kullanılmasının nedenlerinden birisi de *S. aureus*'un tiplendirilmesinde çok etkili şekilde kullanılma imkanı tanıyan yüksek heterojeniteye sahip olmasıdır. *Coa* geninin 3' ucu, *S. aureus* izolatları arasında *AluI* restriksiyon bölgelerinin hem sayıları hem de yerleşimleri bakımından farklılıkları ortaya koyan bir seri 81 bp'lik ardı sıra tekrarlanan seri bölgeler içerir (78). Sommerhauser ve ark. (2003) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada; subklinik mastitis vakalarından elde edilen 110 *S. aureus* izolatu fenotipik ve genotipik tiplendirme metotları kullanılarak incelenmiş ve antibiyogram tiplendirilmesi ile iki, biyotiplendirme ile sekiz, protein A gen polimorfizminin saptanmasıyla yedi ve PFGE ile 17 profil saptanırken *coa* gen tiplendirilmesi ile toplam 19 farklı *S. aureus* profili bildirilmiştir (150).

Bu çalışmada, subklinik mastitisli sığır süt örneklerinden elde edilen koagulaz pozitif *S. aureus* izolatlarının yaklaşık % 84'ünde tek amplifikasyon ürünü elde edilmesine karşın, geriye kalan % 16'sında iki banttardan oluşan amplifikasyon ürünlerinin saptanması dikkat çekici idi. Aynı yöntem ve COAG2 ve COAG3 primerleri kullanılarak yapılan önceki çalışmalarda hayvan orijinli *S. aureus* izolatlarında sadece tek banttardan oluşan amplifikasyon ürünleri saptanmıştır (10, 82, 133, 142, 167). *Coa*-PCR'da çift bant oluşması, şimdiye kadar yapılan çalışmalarda sadece insan orijinli izolatlarda nadiren gözlemlenmiş olup (56, 144),

bu durum süt numunesi toplanan işletmelerde sağım yapan kişilerin ellerinden kaynaklanan bir kontaminasyonu akla getirmektedir. Çalışma populasyonunu oluşturan sığırların çoğunlukla küçük aile işletmelerine ait olması ve bu işletmelerde sağım işlemlerinin önemli boyutlarda elle yapılıyor olması yukarıdaki gr destekler niteliktedir. Bu veriler doğrultusunda, infeksiyonun bir hayvandan diğerine bulamasında taşıyıcı rolü üstlenen sağım işçilerinin gerekli hijyenik tedbirleri almasıyla, özellikle elle sağım yapılan işletmelerde, bulamaların minimum seviyelere indirilmesinin sağlanabileceği ve dolayısıyla mastitise karşı yapılan kontrol ve eradikasyon çalışmalarında bu durumun göz önünde bulundurulması gerektiği kanısına varıldı.

İncelenen 161 koagulaz pozitif izolattan elde edilen amplifikasyon rnlerinin *AluI* ve *Hin6I* restriksiyon enzimleri ile muamelesi sonucunda sırasıyla 23 ve 22 farklı restriksiyon profili saptandı. Elde edilen restriksiyon profilleri arasından en yaygın gözlenen profil tipi her iki enzimle de 55 (% 34) izolatta saptandı. Danimarka'da sığır mastitis vakalarından elde edilen *S. aureus* izolatlarında koagulaz gen polimorfizminin incelenmesine yönelik yapılan bir çalışmada, 187 izolattan *AluI* enzimiyle 15 farklı restriksiyon profili saptanmış ve en yaygın gözlenen profil tipinin % 35 oranında bulunduğu rapor edilmiştir (1). Profil sayıları bakımından bu tez çalışmasında incelenen izolatlarda daha yüksek bir heterojenite saptanırken, predominant profillerin bulunma sıklığı açısından her iki çalışmanın verileri paralellik gösterdi. Dünyanın diğer bölgelerinde yapılan çalışmalarda sayıları 50-200 arasında değişen sığır orijinli *coa* pozitif *S. aureus* izolatlarının *AluI* enzimi ile restriksiyonu neticesinde 6 ile 19 arasında farklı restriksiyon profilleri elde edildiği bildirilmiştir (1, 82, 133, 150). Su ve ark.

(2000), dört farklı ülkeden elde edilen 468 sığır *S. aureus* izolatından toplam 41 farklı koagulaz profili elde etmişlerdir (152). Keza, Su ve ark. (1999) tarafından Çek Cumhuriyeti, Fransa, Kore ve Amerika Birleşik Devletleri'ndeki sığır mastitis vakalarından izole edilen toplam 453 *S. aureus* izolatının koagulaz gen polimorfizmi bakımından incelenmesi neticesinde, 40 farklı restriksiyon profili elde edildiği rapor edilmiştir (153). Bu çalışmalarda, predominant ve nadir gözlenen profiller, nötrofillerin bakterisidal aktivitelere karşı direnç göstermeleri bakımından incelenmiş ve predominant profilleri veren etkenlerin ölüm oranı % 16,7, nadir gözlenen profilleri veren etkenlerin ise % 39,7 olarak bildirilmiştir. Araştırmacılar bu değerler arasındaki istatistiksel farklılıktan yola çıkarak, predominant profilleri veren etkenlerin nötrofillerin bakterisidal aktivitelere karşı daha fazla direnç gösterdiğini, her bir bölgede sadece birkaç predominant koagulaz profilinin bulunduğunu ve dolayısıyla coğrafik bölgeler arasında koagulaz gen profilleri bakımından farklılıklar olabileceğini ileri sürmüşlerdir (152, 153). Bu çalışmada, Elazığ ili ve civarındaki yerleşim yerlerinden elde edilen *S. aureus* izolatlarının koagulaz geni açısından gösterdiği polimorfizm araştırıldı ve diğer çalışmaların verileri ile birlikte değerlendirildiğinde *coa* geninin yüksek bir heterojeniteye sahip olduğu gözlemlendi. Ülkemizin diğer bölgelerinde de bu gendeki polimorfizmin saptanmasına yönelik olarak yapılacak benzer çalışmalar ile mastitis vakalarından elde edilen *S. aureus* izolatları arasında epidemiyolojik ilişkilerin ortaya konmasının, daha etkili koruma ve kontrol stratejilerinin geliştirilmesi açısından faydalı veriler sağlayacağı aşikârdır.

Coa-RFLP analizinde elde edilen verilerin güvenilirliğini desteklemek amacıyla iki farklı restriksiyon enzimi kullanıldı ve sonuçlarda genel olarak predominant profil ve toplam profil sayıları bakımından önemli bir fark bulunmamasına rağmen, az sayıda gözlenen profiller arasında iki enzimin ayırım güçleri bakımından bazı küçük farklılıklar saptandı. Bu çalışmada, her iki enzimle de izolatların yaklaşık % 34'ünde aynı restriksiyon profili saptandı. *AluI* enzimi ile elde edilen profillerin 16'sı, *Hin6I* enzimiyle ise 12'si beş'ten az sayıdaki izolatta gözlemlendi. Böyle bir durum ile karşılaştırılması, RFLP analizinde restriksiyon enzimi seçiminin önemli olduğunu göstermekle birlikte, yapılacak restriksiyon analizlerinde daha güvenilir sonuçlar elde etmek için iki veya daha fazla enzim kullanımının daha faydalı olacağı kanısını doğurdu. Bununla birlikte, *AluI* enzimine alternatif olarak, *Hin6I* enziminin de *S. aureus*'ların tiplendirilmesi amacıyla *coa*-RFLP analizlerinde güvenilir bir şekilde kullanılabilmesi sonucuna varıldı.

Ayrıca bu çalışmada, *coa* pozitif *S. aureus* izolatlarının Primer 786 ve OPS 11 primerleri ile yapılan RAPD analizi neticesinde sırasıyla 32 ve 30 farklı RAPD profili elde edildi. Ancak burada ilginç olan nokta, elde edilen toplam farklı profil sayıları yüksek olmasına rağmen, predominant profilin Primer 786 ile izolatların % 49,7'si OPS 11 ile ise % 57,1'i gibi oldukça yüksek oranlarla temsil edilmesiydi. Lipman ve ark. (1996) 71 izolattan sadece üç farklı RAPD profili elde ederken, Myllys ve ark. (1997) 20 izolatta dört farklı RAPD primeri ile üç ile altı arasında profil saptamışlardır (86, 104). Fitzgerald ve ark. (1997) ise 63 izolatta 12 farklı RAPD profili bildirmişlerdir (48). Bu çalışmalardan elde edilen verilerin kıyaslanması farklı RAPD primerleri kullanıldığından dolayı

gerçekleştirilememiştir. Bununla birlikte profil sayılarındaki farklılıkların çok fazla değişkenlik göstermesinin, çevresel faktörlerin yanısıra primer seçiminin farklı olması ve yukarıda bahsi geçen çalışmalarda sadece tek veya az sayıdaki sürülerden elde edilen izolatların değerlendirilmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, RAPD sonuçlarının analizinde major bantların yanı sıra silik bantların da bulunması verilerin yorumlanmasında farklı değerlendirmelere neden olabilmektedir. Bu durumda özellikle RAPD analizi gerçekleştirilirken, farklı primerlerin denemeleri yapıp optimizasyonları sağlandıktan sonra en uygun primerin veya primerlerin seçilmesinin önemi ortaya çıkmaktadır.

Subklinik mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *coa* pozitif *S. aureus*'ların hem *coa* geninin RFLP analizi hem de RAPD yöntemiyle genotiplendirilmesinde kullanılan enzimler (*AluI* ve *Hin6I*) ve RAPD primerleri (Primer 786 ve OPS 11) bakımından tiplendirme kabiliyetleri % 100 olarak saptandı. Ancak ayırım güçleri bakımından RAPD analizinde kullanılan her iki primerin RFLP analizine kıyasla daha iyi bir ayırım gücüne sahip olduğu gözlemlendi. RFLP yönteminde sadece spesifik bir gen bölgesi dikkate alınırken RAPD analizinde tüm genomun hedeflenmesi, ayırım gücü yönünden iki metot arasında farklılık oluşmasının nedeni olarak düşünülebilir.

Bu çalışmada *S. aureus*'un yanı sıra saha taraması yapılan ve mastitiste ikinci önemli patojen olan *S. agalactiae*'nin izolasyon oranı, bölgeler arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar gösterdi. CMT pozitif süt örneklerinde *S. agalactiae*'nin izolasyon oranı en fazla % 21,3 ile C bölgesinde ve en düşük % 4,8 ile A bölgesinde elde edildi. Buna karşılık B bölgesinde *S. agalactiae* izolasyon ve identifikasyonu gerçekleştirilemedi. Ancak bu bölgede *agalactiae* olmayan

çevresel streptokoklar yaklaşık olarak % 12 oranında tespit edildi. Bazı araştırmacıların bildirdiklerine göre, son yıllarda uygulanan mastitis kontrol programları sonucunda *S. agalactiae*'nin neden olduğu mastitis olguları dünyanın bazı bölgelerinde eradike edilebilmiştir (30, 78). B bölgesinden toplanan süt örneklerinde *S. agalactiae* identifiye edilememesi, bu bölgedeki sürülerin daha önce bu etkene maruz kalmış herhangi bir bulaşma kaynağı ile karşılaşmamasından kaynaklanabilir. Kontagiyöz bir etken olan *S. agalactiae*'nin varlığıyla ilgili olarak yerleşim yerleri arasında istatistiksel olarak önemli farklılıkların tespit edilmesi, düzenli koruma ve kontrol stratejileri (örneğin sürülere yabancı hayvan girişlerinde alınacak önlemler) sayesinde *S. agalactiae* mastitisinin insidensinin düşürülmesi ve dolayısıyla ekonomik kayıpların asgari düzeye indirilmesinin mümkün olabileceği kanaatini doğurmaktadır.

Bakteriyolojik kültür ve biyokimyasal identifikasyon yöntemiyle *Streptococcus sp.* olarak saptanan toplam 199 izolatın 85'i (% 42,7), 16S rRNA genine spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR neticesinde *S. agalactiae* olarak identifiye edildi. Kullanılan primerlerin yüksek bir spesifiteye sahip olmaları ve diğer gen bölgelerine göre daha stabil olan 16S rRNA geninden türetilmeleri, PCR ile identifikasyon işleminin konvansiyonel metotlara göre çok daha güvenilir bir metot olarak rutin teşhis laboratuvarlarında uygulanabileceğini göstermiştir (17, 136). Son zamanlarda, yetiştirme hastalıkları arasında ekonomik olarak en büyük kayba yol açan mastitise neden olan etkenlerin teşhisi için; zaman kaybı, pahalılığı ve etkenlerin fenotipik özelliklerinin stabil olmaması nedeniyle sensitivite ve spesifitesi daha düşük olan konvansiyonel metotların yerine çok

daha spesifik ve sensitivitesi yüksek olan ve kısa sürede sonuç veren moleküler metotların kullanılmasının daha faydalı olacağı kabul edilmiştir (55).

Hassan ve ark. (2002)'nin yaptıkları bir çalışmada, fenotipik olarak CAMP negatif bulunan *S. agalactiae* izolatlarında *cfb* geni yönünden PCR ile pozitiflik saptanmıştır (62). Bu durum, *cfb* genine spesifik PCR analizinin, *S. agalactiae*'ların biyokimyasal karakterizasyonunda en önemli kriterlerden biri olarak kabul edilen CAMP reaksiyonundan doğabilecek yanlış negatiflik durumlarının önüne geçilebileceğini göstermektedir (173). Ülkemizde değişik yörelerde yapılan araştırmalarda Ekin ve ark. (1998) sığır sütlerinden elde edilen *S. agalactiae* izolatlarının fenotipik olarak % 73,3'ünde CAMP testi yönünden pozitiflik saptarken, Dakman (2000) ise % 93,7 oranında pozitiflik bildirmiştir (37, 42). Bir başka çalışmada ise sığır orijinli *S. agalactiae* izolatlarında % 26,3 oranında CAMP testi yönünden pozitiflik rapor edilmiştir (43). Bu test, mikrobiyologlar tarafından *S. agalactiae* izolatlarının identifikasyonunda belirleyici test olarak kabul edilmesine rağmen (132), yukarıda bildirilen sonuçlara bakıldığında bu testten identifikasyon amaçlı olarak yararlanmanın yeterli olmayacağı açık bir şekilde görülmektedir. Keza, bu araştırmacılar da CAMP testi ve diğer biyokimyasal testlerin *S. agalactiae* izolatlarının identifikasyonunda yeterli olmayacağını ve serolojik olarak etkenin GBS olarak saptanması gerektiğini belirtmişlerdir. Ancak, serotiplendirme ile birçok izolatın tiplendirilemediğine yönelik bulguları ortaya koyan detaylı araştırmalar mevcuttur (37, 42, 43). Bu çalışmada *cfb* genine yönelik PCR analizi neticesinde, diğer araştırmacıların CAMP testi yönünden biyokimyasal test sonuçlarındaki bulgularının aksine, izolatların tamamında pozitiflik belirlendi. Dolayısıyla *cfb*-

PCR'nin de *S. agalactiae*'nin hızlı ve güvenilir bir şekilde identifikasyonu için kullanılabileceği kanaatine varıldı (45, 61, 99).

Bunlara ilave olarak, *cfb* geni yönünden pozitif olan izolatlarda genetik heterojenitenin varlığı, *AluI* ve *Tsp509I* restriksiyon enzimleri kullanılarak RFLP analizi ile incelendi. Bu gen bölgesinin RFLP yöntemi ile analizine yönelik daha önce yapılan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Kullanılacak enzimlerin seçimi için, *AluI*, *DdeI*, *EcoRI*, *Hin6I*, *PfuI*, *PstI* ve *Tsp509I* restriksiyon enzimleri arasından hangisinin daha net sonuçlar verebileceğine yönelik yapılan analizler sonucunda *AluI* ve *Tsp509I* enzimlerinin diğer enzimlere oranla çok daha iyi kesim kapasitesine sahip olduğu belirlendi (Yıldırım A.Ö., Kişisel görüşme; Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Justus-Liebig-Universität Giessen, Milchwissenschaften, Ludwigstr, Giessen, Almanya). RFLP analizi neticesinde farklı bölgelerden elde edilen izolatların tümünde aynı restriksiyon profilleri saptandı. Önceki çalışmalarda, farklı orijinlerden izole edilen *S. agalactiae* suşlarının 16S rRNA genine spesifik primerler ile *RsaI* ve *MspI* restriksiyon enzimleri kullanılarak yapılan RFLP analizlerinde de aynı restriksiyon profilleri gözlemlendiği bildirilmiştir (2, 81, 182). Bu sonuçlara göre, *cfb* geninin de 16S rRNA genine benzer bir şekilde yüksek derecede korunmuş bir gen yapısına sahip olduğu ve RFLP analizi için uygun bir gen bölgesi olarak tanımlanamayacağı kanısına varıldı.

Çalışmada ayrıca *cfb* pozitif *S. agalactiae* izolatlarına RAPD analizi uygulandı. Sınırlı sayıda izolatta farklı primerler kullanılarak gerçekleştirilen RAPD analizi neticesinde daha yüksek ayırım kapasitesine sahip olan ve kolay yorumlanabilen profiller oluşturan OPB 18 primeri, izolatların RAPD analizinde

kullanıldı ve toplam 18 farklı profil elde edildi. Böylece sığır orijinli *S. agalactiae* izolatları arasında da yüksek bir genetik farklılık olduğu saptandı. Bu durumun Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerindeki süt sığırcılık işletmelerinin daha çok küçük aile işletmeleri yapısında olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Sığır orijinli *S. agalactiae* izolatlarının tiplendirilmesinde OPB 18 primerinin yanı sıra farklı primerler kullanılarak gerçekleştirilen RAPD analizlerine de rastlanmaktadır (40, 93).

S. agalactiae'nın tiplendirilmesine yönelik yapılan çalışmalarda, tek bir çiftlik bazında elde edilen izolatlar arasında herhangi bir genetik farklılık saptanmamasına rağmen farklı çiftliklerden elde edilen izolatların kıyaslanmasında yüksek bir genetik heterojenite gözlenmiştir (14, 99). Duarte ve ark. (2004), *S. agalactiae* izolatlarındaki genetik heterojeniteyi tespit etmek amacıyla farklı bir primer kullanarak gerçekleştirdikleri RAPD analizinin ayırım gücünün oldukça yüksek olduğunu ve aynı sürülerden elde edilen profillerin birbirleriyle genetik olarak yakın ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (40). Bu tez çalışmasında da, izolatların % 55'inin aynı RAPD profilini göstermesi ve diğer profiller arasında sadece az sayıdaki bant farklılıklarından kaynaklanan profil dağılımı gözlenmesinden dolayı *S. agalactiae* izolatlarının bölgeler arasında bile genetik olarak yakın ilişkili olabileceği kanısını doğrulamaktadır.

Elde edilen RAPD profilleri içerisinde, tüm bölgelerde gözlenen ve predominant olarak saptanan Profil I, D ve E bölgelerinde en yaygın bulunan profil olarak tespit edildi. Bununla birlikte; Profil II C bölgesinde, Profil IV ise A bölgesinde en yaygın olarak saptanan profiller oldu. Elde edilen 18 profilin 12'si (Profil VII - XVIII) hem çok az sayıdaki izolatta hem de sadece bir bölgede

gözlemlendi. Sığır orijinli *S. agalactiae* izolatlarında yapılan bir çalışmada elde edilen bulgulara göre, RAPD yöntemi ile sadece farklı serotipe sahip izolatlarda değil aynı serotipe sahip izolatlar arasında da genetik heterojenite olduğu gözlenmiştir (93). Dolayısıyla bu çalışmada da izolatlar arasında yüksek heterojenite elde edilmesi, *S. agalactiae* izolatları arasındaki polimorfizimi ortaya koymak için RAPD metodunun, RFLP analizi gibi moleküler metotlar ve serotiplendirme gibi konvansiyonel metotlara göre çok daha iyi bir alternatif olacağı kanısına varıldı. Ayrıca ileriki çalışmalarda insanlardan elde edilen izolatlar ile sığırlardan elde edilen izolatlar arasındaki ilişkinin varlığını ortaya koymak amacıyla RAPD analizinin uygulanmasının faydalı veriler sağlayabileceği, zoonotik olan bu etkenin gerekli koruma ve kontrol stratejilerinin ortaya konmasında ve infeksiyon yollarının açıklanmasında uygun bir metot olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir.

Moleküler epidemiyolojik yaklaşımların tümünde “altın standart” olarak kabul edilen optimal tiplendirilebilirlik, yüksek tekrarlanabilirlik, yeterli stabilite ve yüksek ayırıştırma gücü gibi özellikler moleküler çalışmalarda mutlaka dikkate alınmalıdır. Bunların yanısıra yöntemin çok pahalı ve komplike olmaması, sonuçların kolay yorumlanabilmesi ve hatta laboratuvarlar arası karşılaştırılabilir olması tercih sebepleri arasındadır (164). RAPD, uygulanma kolaylığı ve kısa sürede sonuç vermesine karşın laboratuvarlar arasında ve aynı laboratuvarda bile tekrarlanabilirliği ve üretkenliği düşük bir metottur (165, 171, 174). Dolayısıyla, DNA ve primer konsantrasyonunun optimizasyonuna ihtiyaç duyulması, PCR karışımının uygun şekilde hazırlanması, siklus sayısının optimize edilmesi ve hatta kullanılan thermocycler cihazının farklı olması gibi üretkenlik ve

tekrarlanabilirlik kapasitelerinde etkili olan birçok dezavantajı mevcuttur (89, 118, 140, 165). Bu çalışmada da yukarıda bahsedilen dezavantajların bir kısmı ile karşılaşıldı. Bu durum dolayısıyla, *S. aureus* izolatlarının RAPD analizinde elde edilen sonuçlar ile RFLP analizi sonuçları arasında düşük bir korelasyon olduğu gözlemlendi. Yine RAPD analizinin tekrarlanabilirlik gereksiniminin olması ve üretkenliğinin eğer reaksiyon şartları uygun şekilde sağlanmaz ise RFLP analizinden daha düşük olması gibi dezavantajlarının ön plana çıktığı gözlemlendi. Bununla birlikte genel olarak değerlendirildiğinde, her iki metodun da (*coa*-RFLP ve RAPD) *coa*-pozitif *S. aureus* suşları için uygulanabilirliğinin kolay olması, kısa zamanda sonuç vermesi ve maliyetlerinin düşük olması, çok daha yüksek bir ayırım gücüne sahip olan fakat zahmetli ve uzun sürede sonuç veren PFGE analizi ve DNA sekanslama metodlarının yerine tercih edilme nedenleri oldu (14, 22, 31, 140, 160). Ancak bu durumun, *S. agalactiae* izolatları açısından sadece RAPD analizi için kabul edilebilir olduğu saptandı. *S. agalactiae* izolatlarında RFLP analizi ile polimorfizm araştırmalarını gerçekleştirmek için, *cfb* geninin stabil bir durum göstermesi nedeniyle uygun bir gen bölgesi olarak tanımlanamayacağı ve *S. agalactiae* izolatlarına yönelik yapılacak çalışmalarda virulensle ilişkili olduğu düşünülen farklı gen bölgelerinin hedef olarak seçilmesi ve bu gen bölgeleri üzerinde RFLP metodunun uygulanabilirliğinin saptanmasına yönelik çalışmalara ihtiyaç duyulduğu kanısına varıldı.

Sonuç olarak, subklinik sığır mastitis vakalarının en yaygın etkeni olan *coa* pozitif *S. aureus*'ların genotipik ilişkilerini tespit etmeye yönelik olarak PCR tabanlı *coa*-RFLP ve RAPD analizinin bazı önemli noktalar dikkate alınmak suretiyle güvenilir bir şekilde kullanılabilceği saptandı. Bununla birlikte, bu

metotların aynı anda kullanılmasının aralarındaki düşük korelasyon dolayısıyla tercih edilmemesi ve/veya farklı bir moleküler tiplendirme metodu ile desteklenmeleri gerektiği düşünülmektedir. Ayrıca daha önce sadece insan orjinli izolatlarda ve çok nadir olarak bildirilen *coa*-PCR'daki çift bantların inek sütlerinden elde edilen *S. aureus* izolatlarında saptanması, süt sağım işlemi yapan kişilerin bulaşmada önemli rol oynayabileceğini gösterdi (51, 137, 183, 184). Bu durumda, bulaşmada en önemli rezervuar olarak kabul edilen infekte memelerin ve sığırdan sığıra olan bulaşmanın yanı sıra insanlar ile de bulaşmanın ciddi bir şekilde göz önünde bulundurulması gereken bir nokta olduğu kanısına varıldı.

Ayrıca bu çalışmada *S. agalactiae*'ların moleküler identifikasyonu için kullanılan *cfb* geninin PCR amplifikasyonu sonucunda oluşan bant büyüklüklerinde varyasyon gözlenmemesi, bu gen bölgesinin sığır orijinli *S. agalactiae*'ların hızlı ve güvenilir şekilde identifikasyonuna olanak tanıdığını gösterdi. Bu çalışmada kullanılan moleküler metotlardan RAPD metodunun Türkiye'deki subklinik mastitis vakalarında önemli bir sorun olarak karşımıza çıkan *S. agalactiae* suşları arasında predominant tiplerin saptanmasında yararlı olabileceği ve infeksiyon yollarının izah edilmesinde katkıda bulunabileceği tespit edildi.

Bu bulgular eşliğinde alınacak önemli kontrol stratejilerinin (predominant suşlar kullanılarak yeni aşı geliştirme çalışmaları, etkili antibiyotiklerin seçimi vs.) mastitisin en önemli etkenleri olan *S. aureus* ve *S. agalactiae*'ların insidensinde önemli derecelerde azalmalara sebep olabileceği düşünülmektedir. Böylece, konakçı çevre ve etken üçgeninde etkin olan çeşitli faktörler sebebiyle, eradikasyonu veya kontrolünün oldukça zor olduğu düşünülen Stafilokokal ve

Streptokokal mastitislere karşı uygulanacak daha etkili kontrol programları ile hem hayvan sağlığı açısından hem de halk sağlığı açısından önemli ilerlemeler sağlanabileceği kanısına varıldı. Ayrıca, *S. aureus* ve *S. agalactiae* suşlarının ilave genotipik metotlar kullanılarak değerlendirilmesi ve detaylı genetik analiz çalışmalarına hız verilmesinin, daha spesifik sonuçların alınmasında ve bu etkenlerin epidemiyolojisi hakkında daha ayrıntılı bilgi edinilmesinde faydalı olacağı düşünölmektedir.



7. KAYNAKLAR

- 1- Aarestrup FM, Dangler CA, Sordillo LM. (1995). Prevalence of Coagulase Gene Polymorphism in *Staphylococcus aureus* Isolates Causing Bovine Mastitis. Can. J. Vet. Res. 59:124-128.
- 2- Abdulmawjood A, Lämmler C. (1999). Amplification of 16S Ribosomal RNA Gene Sequences for the Identification of *Streptococci* of Lancefield Group B. Res. Vet. Sci. 67:159-162.
- 3- Akay Ö, Aydın N. (1984). Stafilokokal Mastitisler. I. Mastitis Semineri, Ankara, Sayfa:136-146.
- 4- Alaçam E. (1997). Meme Hastalıkları. "Sığır Hastalıkları" E Alaçam ve M Şahal (Editörler). Medisan, Ankara. Sayfa:389-425.
- 5- Almeida RA, Matthews KR, Cifrian E, Guidry AJ, Oliver SP. (1996). *Staphylococcus aureus* Invasion of Bovine Mammary Epithelial Cells. J. Dairy Sci. 79: 1021-1026.
- 6- Alpan O, Arpacık R. (1998). Sığır Yetiştiriciliği. Şahin Matbaası, Ankara.
- 7- Anderson JC. (1976). Mechanisms of Staphylococcal Virulence in Relation to Bovine Mastitis, Br. Vet. J. 132:229-245.
- 8- Anderson JC, Adlam C, Knights JM. (1982). The Effect of Staphylocoagulase in the Mammary Gland of the Mouse. Br. J. Exp. Pathol. 63(3):336-340.
- 9- Andersson UG. (2004). The Immune Response During Acute and Chronic Phase of Bovine Mastitis with Emphasis on *Staphylococcus aureus* Infection. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Doktora Tezi.
- 10- Annemuller C, Lammler C, Zschock M. (1999). Genotyping of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis. Vet. Microbiol. 69:217-224.
- 11- Arda M, İstanbulluoğlu E. (1978). Mastitislere Sebep Olan Anaerob, Mycoplasma ve Mantarların İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Bunlara Karşı Etkili Antibiyotik ve Fungusitlerin Saptanması. TÜBİTAK Veteriner ve Hayvancılık Grubu, Proje No:254.
- 12- Arda, M. (1994). Biyoteknoloji: Bazı Temel İlkeler. Kükem Derneği Bilimsel Yayınları No:2 İkinci Baskı.
- 13- Ateş M, Erganiş O, Çorlu M, Serpek B. (1991). Konya Yöresindeki Mastitisli İneklerden Elde Edilen Süt Örneklerinin Mikrobiyal Florası ve LDH Aktivitesi. Doğa Tr. Vet. Anim. Sci. 47:152-157.
- 14- Bassegio N, Mansell PD, Browning JW, Browning GF. (1997). Strain Differentiation of Isolates of *Streptococci* from Bovine Mastitis by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Mol. Cell. Probes. 11:349-354.
- 15- Batu A. (1991). Hayvanlarda Meme Hastalıkları ve Mastitis. Kuşak Ofset, İstanbul.
- 16- Baumgartner A, Nicolet J, Eggimann M. (1984). Plasmid Profiles of *Staphylococcus aureus* Causing Bovine Mastitis. J. Appl. Bacteriol. 56:159-163.

- 17- Bentley RW, Leigh JA. (1995). Development of PCR-Based Hybridisation Protocol for Identification of *Streptococcal* Species. J. Clin. Microbiol. 33: 1296-1302.
- 18- Berkin Ş, Milli Ü. (1984). Mastitislerin Patolojisi. I. Mastitis Semineri, Ankara, Sayfa:9-16.
- 19- Bernheimer AW, Linder R, Avigad LS. (1979). Nature and Mechanism of Action of the CAMP Protein of Group B *Streptococci*. Infect Immun. 23(3):838-844.
- 20- Blood DC, Henderson JA, Radostits OM. (1979). Veterinary Medicine: A Textbook of The Diseases of Cattle, Sheep, Pigs and Horses. Bailliere Tindall, London.
- 21- Blosser TH. (1979). Economic Losses from and the National Research Program on Mastitis in the United States. J. Dairy Sci. 62:119-127.
- 22- Boerlin P, Kuhnert P, Hussy D, Schaellibaum M. (2003). Methods for Identification of *Staphylococcus aureus* Isolates in Cases of Bovine Mastitis. J. Clin. Microbiol. 41:767-771.
- 23- Bourry A, Cochard T, Poutrel B. (1997). Serological Diagnosis of Bovine, Caprine, and Ovine Mastitis Caused by *Listeria monocytogenes* by Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. J. Clin. Microbiol. 35(6):1606-1608.
- 24- Bramley AJ, Cullor JS, Erskine RJ, Fox LK, Harmon RJ, Hogan JS, Nickerson SC, Oliver SP, Smith KL, Sordillo LM. (1996). Current Concepts of Bovine Mastitis, 4th ed. National Mastitis Council, Inc, Madison, WI.
- 25- Bramley AJ, Patel AH, O'Reilly M, Foster R, Foster TJ. (1989). Roles of Alpha-Toxin and Beta-Toxin in Virulence of *Staphylococcus aureus* for the Mouse Mammary Gland. Infect. Immun. 57(8):2489-2494.
- 26- Bramley AJ, Dodd FH. (1984). Reviews of the Progress of Dairy Science: Mastitis Control-Progress and Prospects. J. Dairy Res. 51(3):481-512.
- 27- Brglez I. (1981). A Contribution to the Research of Infection of Cows and Human with *Streptococcus agalactiae*. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg (B), 172(4-5):434-439.
- 28- Brown JG, Farnsworth R, Wannamaker LW, Johnson DW. (1974). CAMP factor of Group B *Streptococci*: Production, Assay and Neutralization by Sera from Immunized Rabbits and Experimentally Infected Cows. Infect Immun. 9(2):377-383.
- 29- Brown MB, Scasserra AE. (1990). Antimicrobial Resistance in *Streptococcal* Species Isolated from Bovine Mammary Glands. Am. J. Vet. Res. 51(12):2015-2018.
- 30- Busato A, Trachsel P, Schallibaum M, Blum JW. (2000). Udder Health and Risk Factors for Subclinical Mastitis in Organic Dairy Farms in Switzerland. Prev. Vet. Med. 44:205-220.
- 31- Chiou CS, Wei HL, Yang LC. (2000). Comparison of Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Coagulase Gene Restriction Profile Analysis Techniques in the Molecular Typing of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 38:2186-2190.
- 32- Cifrian E, Guidry AJ, O'Brien CN, Marquardi WW. (1996). Effect of Antibodies to Alpha and Beta Toxins, Cell Wall and Exopolysaccharide Capsule on the Cytotoxicity and Adherence of *Staphylococcal aureus* to Bovine Mammary Secretory Epithelial Cells. Am. J. Vet. Res. 57(9):1308-1311.

- 33- Craven N, Anderson JC. (1984). Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by Bovine Mammary Gland Macrophages and Intracellular Protection from Antibiotic Action in vitro and in vivo. J. Dairy Res. 51:513-523.
- 34- Craven N. (1987). Efficacy and Financial Value of Antibiotic Treatment of Bovine Clinical Mastitis During Lactation. Br. Vet. J. 143(5):410-422.
- 35- Crist WL, Robert J, O'Leary J, McAllister AJ. (1997). Mastitis and its Control. Kentucky Cooperative Extension Service. 10.92:1-14.
- 36- Cuteri V, Marenzoni ML, Mazzolla R, Tosti N, Merletti L, Arcioni S, Valente C. (2004). *Staphylococcus aureus*: Study of Genomic Similarity of Strains Isolated in Veterinary Pathology Using Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 27(4):247-253.
- 37- Dakman A. (2000). Mastitise Neden Olan B Grubu Streptokokların Teşhisinde Konvansiyonel Testler ile Hemaglutinasyon Testinin Karşılaştırılması. A.Ü Sağ. Bil. Ens. Doktora Tezi.
- 38- De Graves FJ, Fetrow, J. (1993). Economics of Mastitis and Mastitis Control. Vet. Clin. North Am: Food Animal Practice 9:421-434.
- 39- Derbentli Ş. (2002). Hastane İnfeksiyonlarının Epidemiyolojisinde Moleküler Biyolojik Yöntemlerin Yeri. "İnfeksiyon Hastalıklarının Laboratuvar Tanısında Moleküler Yöntemler" A Ağaçfıdan, S Badur ve S Türkoğlu (Editörler) Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayın No:42, İstanbul, Sayfa:6-13.
- 40- Duarte RS, Miranda OP, Bellei BC, Brito MA, Teixeira LM. (2004). Phenotypic and Molecular Characteristics of *Streptococcus agalactiae* Isolates Recovered from Milk of Dairy Cows in Brazil. J. Clin. Microbiol. 42(9):4214-4222.
- 41- Durmaz R. (2004). Moleküler Epidemiyoloji Neden Gerekli, Başlarken Nelere Dikkat Edilmelidir? 3. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara, Sayfa:52-59.
- 42- Ekin İH. (1998). İneklerde Subklinik Mastitis Olgularından İzole Edilen Streptokokların Serogruplandırılması ve Çeşitli Biyokimyasal Özellikleri Üzerine Araştırmalar. YYÜ Sağ. Bil. Ens., Van, Yüksek Lisans Tezi.
- 43- Ekin İH, (2004). Sığır ve İnsanlardan İzole Edilen Grup B Streptokokların (*Streptococcus agalactiae*) Serotiplendirilmesi ve Çeşitli Biyokimyasal Özellikleri ile Karşılaştırılması. Y.Y.Ü. Sağ. Bil Ens. Doktora Tezi.
- 44- Erganiş O, Kaya O, Kuyucuoğlu Y. (1993). İnek Mastitislerine Sebep Olan Mikroorganizmalar ve Antibiyotiklere Duyarlılıkları. Türk Vet Hek Bir Derg. 5:49-50.
- 45- Estuningsih S, Soedarmanto I, Fink K, Lammler C, Wibawan IWT. (2002). Studies on *Streptococcus agalactiae* Isolated from Bovine Mastitis in Indonesia. J. Vet. Med. B. 49:185-187.
- 46- Finch LA, Martin DR. (1984). Human and Bovine Group B *Streptococci*: Two Distinct Populations. J. Appl. Bacteriol. 57:273-278.

- 47- Fitzgerald JR, Hartigan PJ, Meaney WJ, Smyth CJ. (2000). Molecular Population and Virulence Factor Analysis of *Staphylococcus aureus* from Bovine Intramammary Infection. J. Appl. Microbiol. 88:1028-1037.
- 48- Fitzgerald JR, Meaney WJ, Hartigan PJ, Smyth CJ, Kapur V. (1997). Fine-Structure Molecular Epidemiological Analysis of *Staphylococcus aureus* Recovered from Cows, Epidemiol. Infect. 119:261-269.
- 49- Forsman P, Tilsala-Timisjarvi A, Alatosava T. (1997). Identification of *Staphylococcal* and *Streptococcal* Causes of Bovine Mastitis Using 16S-23S rRNA Spacer Regions. Microbiology. 143 (11):3491-3500.
- 50- Foster TJ, O'Reilly M, Bramley AJ. (1990). Genetic Studies of *Staphylococcus aureus* Virulence Factors. "Pathogenesis of Wound and Biomaterial Associated Infections" T Wadstrom, I Eliasson, I Holder, A Ljungh, (Editörler). Springer-Verlag, London, Sayfa:35-46.
- 51- Fox LK, Gershman M, Hancock DD, Hutton CT. (1991). Fomites and Reservoirs of *Staphylococcus aureus* Causing Intramammary Infections as Determined by Phage Typing: The Effect of Milking Time Hygiene Practices. Cornell Vet. 81:183-193.
- 52- Fox LK, Ferens WA, Bohach GA, Bayles KW, Davis WC. (2000). *Staphylococcus aureus*: Super Mastitis Pathogen. Proc. 39th Annu. Meet. Natl. Mastitis Council., Inc. Atlanta, GA. Sayfa: 98-103.
- 53- Francis PG. (1989). Update on Mastitis. III. Mastitis Therapy. Br. Vet. J. 145(4):302-311.
- 54- Gillespie BE, Owens WE, Nickerson SC, Oliver SP. (1999). Deoxyribonucleic Acid Fingerprinting of *Staphylococcus aureus* from Heifer Mammary Secretions and from Horn Flies. J Dairy Sci. 82(7):1581-1585.
- 55- Gillespie BE, Jayarao BM, Oliver SP. (1997). Identification of *Streptococcus* Species by Randomly Amplified Polymorphic Deoxyribonucleic Acid Fingerprinting. J. Dairy Sci. 80(3):471-476.
- 56- Goh S, Byrne SK, Zhang JL, Chow AW. (1992). Molecular Typing of *Staphylococcus aureus* on the Basis of Coagulase Gene Polymorphisms. J. Clin. Microbiol. 30:1642-1645.
- 57- Guidry AJ. (1985). Mastitis and the Immune System of the Mammary Gland. "Lactation" BL Larson (Editör) Iowa State Univ. Press, Ames, Sayfa:240-251.
- 58- Gürtürk K, Boynukara B, Ekin İH, Gülhan T. (1998). Van ve Yöresindeki İneklerde Subklinik Mastitisin Etiyolojisi Üzerine Bir Çalışma. Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg, 9:1-4.
- 59- Hadimli HH. (2000). Süt ineklerinde Stafilokokkal Mastitisler İçin Aşı Çalışmaları. Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Konya, Doktora Tezi.
- 60- Hadimli HH, Erganiş O. (2001). Mastitis ve Bağışıklık. Veterinarium, 13 (1):37-42.
- 61- Hassan AA, Abdulmajood A, Yıldırım AÖ, Fink K, Lämmel C, Schlenstedt R, (2000). Identification of *Streptococci* Isolated from Various Sources by Determination of *cfb* Gene and other CAMP-Factor Genes. Can. J. Microbiol. 46:946-951.

- 62- Hassan AA, Akineden O, Lammler C, Huber-Schlenstedt R. (2002). Molecular Characterization of Phenotypically CAMP-Negative *Streptococcus agalactiae* Isolated from Bovine Mastitis. J. Vet. Med. B. 49:257-259.
- 63- Hensen SM, Pavicic MJ, Lohuis JA, Poutrel B. (2000). Use of Bovine Primary Mammary Epithelial Cells for the Comparison of Adherence and Invasion Ability of *Staphylococcus aureus* Strains. J. Dairy Sci. 83:418-429.
- 64- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. (1994). Gram Positive Cocci. "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" Ninth ed. Williams and Wilkins, Baltimore, Sayfa:527-584.
- 65- Hookey JV, Richardson JF, Cookson BD. (1998). Molecular Typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR Restriction Fragment Length Polymorphism and DNA Sequence Analysis of the Coagulase Gene. J. Clin. Microbiol. 36:1083-1089.
- 66- Hutton CT, Fox LK, Hancock DD. (1990). Mastitis Control Practices: Differences between Herds with High and Low Milk Somatic Cell Counts. J. Dairy Sci. 73(4):1135-1143.
- 67- Hynes WL, Walton SL. (2000). Hyaluronidases of Gram-Positive Bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 183:201-207.
- 68- İstanbulluoğlu E. (2001). Mastitislerde Antimikrobiyal Dirençlilik Sorunu ve Yeni Gelişmeler. Süt İnekçiliğinde Mastitis Sempozyumu, Burdur. Sayfa:113-120.
- 69- İzgür M. (1984). Streptokokal Mastitisler. I. Mastitis Semineri, Ankara, Sayfa:127-135.
- 70- Jain NC. (1979). Common Mammary Pathogens and Factors in Infection and Mastitis. J. Dairy Sci. 62:128-134.
- 71- Jayarao BM, Dore JJE, Oliver SP. (1992). Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of 16S Ribosomal DNA of *Streptococcus* and *Enterococcus* Species of Bovine Origin. J. Clin. Microbiol. 30:2235-2240.
- 72- Jürgens D, Shalaby FYYI, Fehrenbach FJ. (1985). Purification and Characterization of CAMP-factor from *Streptococcus agalactiae* by Hydrophobic Interaction Chromatography and Chromatofocusing. J. Chromatogr. 348:363-370.
- 73- Jürgens D, Sterzik B, Fehrenbach FJ. (1987). Unspecific Binding of Group B *Streptococcal* Cocytolysin (CAMP Factor) to Immunoglobulins and its Possible Role in Pathogenicity. J. Exp. Med. 165(3):720-732.
- 74- Keefe GP. (1997). *Streptococcus agalactiae* Mastitis. A Review. Can. Vet. J. 38:429-437.
- 75- Kerr DE, Plaut K, Bramley AJ, Williamson CM, Lax AJ, Moore K, Wells KD, Wall RJ. (2001). Lysostaphin Expression in Mammary Glands Confers Protection Against *Staphylococcal* Infection in Transgenic Mice. Nat. Biotech. 19:66-70.
- 76- Kinsman O, Jonsson P, Haraldsson I, Lindberg M, Arbuthnott JP, Wadstrom T. (1981). Decreased Virulence of A-Haemolysin Negative Mutants of *Staphylococcus aureus* in Experimental Infections in Mice. "Staphylococci and Staphylococcal Diseases" J Jeljaszewicz (Editör), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Sayfa:651-659.

- 77- Kirk JH, Berry SL, Gardner IA, Maas J, Ahmadi A. (1997). Dry Cow Antibiotic Treatment in a Herd with Low Contagious Mastitis Prevalence. Proc. 36th Annu. Meet. Natl. Mastitis Counc, Madison, WI, Sayfa:164-172.
- 78- Kloppert B, Wolter W, Riße K, Zschock M. (1999). Erregerspektrum Bei Bovinersubklinischer Mastitis Des Rindes in Hessischen Milcherzeugerbetrieben. Tagungsbericht Des 23. Kongresses Der Deutschen Veterinarmedizinischen Gesellschaft E. V. In Bad Nauheim. Sayfa:350-355.
- 79- Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. (1997). The Gram Positive Cocci Part II: *Streptococci*, *Enterococci* and *Streptococcus* like bacteria, "Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology" 5th Ed., Lippincott Comp, Philadelphia, New York, Sayfa:577-629.
- 80- Kuyucuoğlu Y, Uçar M. (2001). Afyon Bölgesi Süt İneklerinde Subklinik ve Klinik Mastitislerin Görülme Oranları ve Etkili Antibiyotiklerin Tespiti. Vet. Hek. Mikr. Derg. 1:19-24.
- 81- Lammler C, Abdulmawjood A, Weiss R. (1998). Properties of Serological Group B *Streptococci* of Dog, Cat and Monkey Origin. Zentralbl. Veterinarmed. B. 45:561-566.
- 82- Lange C, Cardoso M, Senczek M, Schwarz S. (1999). Molecular Subtyping of *Staphylococcus aureus* Isolates from Cases of Bovine Mastitis in Brazil. Vet. Microbiol. 67:127-141.
- 83- Larsen HD, Sloth KH, Elsborg C, Enevoldsen C, Pedersen LH, Eriksen NH, Aarestrup FM, Jensen NE. (2000). The Dynamics of *Staphylococcus aureus* Intramammary Infection in Nine Danish Dairy Herds. Vet. Microbiol. 71(1-2):89-101.
- 84- Leloğlu N. (1999). Gram Pozitif Koklar. "Özel Mikrobiyoloji" M Arda, A Minbay, N Aydın ve ark. (Editörler), 5. Baskı, Medisan, Ankara, Sayfa:31-39.
- 85- Lin B, Hollingshead SK, Coligan JE, Egan ML, Baker JR, Pritchard DG. (1994). Cloning and Expression of the Gene for Group B *Streptococcal* Hyaluronate Lyase. J. Biol. Chem. 269(48):30113-30116.
- 86- Lipman LJ, De Nijs A, Lam TJ, Rost JA, Van Dijk L, Schukken YH, Gaastra W. (1996). Genotyping by PCR, of *Staphylococcus aureus* Strains, Isolated from Mammary Glands of Cows. Vet. Microbiol. 48:51-55.
- 87- Loeffler DA, Creasy MT, Norcross NL, Paape MJ. (1988). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Leukocidin Toxin from *Staphylococcus aureus* in Bovine Milk Samples. J. Clin. Microbiol. 26(7):1331-1334.
- 88- Loeffler DA, Norcross NL. (1985). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Milk Immunoglobulins to Leukocidin Toxin of *Staphylococcus aureus*. Am. J. Vet. Res. 46(8):1728-1732.
- 89- Macpherson JM, Eckstein PE, Scoles GJ, Gajadhar AA. (1993). Variability of the Random Amplified Polymorphic DNA Assay Among Thermal Cyclers, and Effects of Primer and DNA Concentration. Mol. Cell. Probes. 7:293-299.

- 90- Mallard BA, Barnum DA. (1993). *S. aureus* Mastitis: Genetics and Immunity. Proc. 32nd Annu. Meet. Natl. Mastitis Counc, Inc. Kansas City, MO. Sayfa:27-35.
- 91- Marques MB, Kasper DL, Pangburn MK, Wessels MR. (1992). Prevention of C3 Deposition by Capsular Polysaccharide is a Virulence Mechanism of Type III Group B *Streptococci*, Infect Immun. 60(10):3986-3993.
- 92- Martinez G, Harel J, Gottschalk M. (2001). Specific Detection by PCR of *Streptococcus agalactiae* in Milk. Can. J. Vet. Res. 65(1):68-72.
- 93- Martinez G, Harel J, Higgins R, Lacouture S, Daignault D, Gottschalk M. (2000). Characterization of *Streptococcus agalactiae* Isolates of Bovine and Human Origin by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. J. Clin. Microbiol. 38:71-78.
- 94- Matos JS, White DG, Harmon RJ, Langlois BE. (1991). Isolation of *Staphylococcus aureus* from Sites other than the Lactating Mammary Gland. J Dairy Sci. 74 (5):1544-1549.
- 95- Matthews KR, Jayarao BM, Oliver P. (1992). Restriction Endonuclease Fingerprinting of Genomic DNA of *Staphylococcus* Species of Bovine Origin. Epidemiol. Infect. 109:59-68.
- 96- Maurer JJ, Mattingly SJ. (1991). Molecular Analysis of Lipoteichoic Acid from *Streptococcus agalactiae*, J. Bact. 173(2):487-494.
- 97- McDonald JS. (1979). Bovine Mastitis: Introductory Remarks. J. Dairy. Sci. 62:117-118.
- 98- Meiri-Bendek I, Lipkin E, Friedmann A, Leitner G, Saran A, Friedman S, Kashi Y. (2002). A PCR-Based Method for the Detection of *Streptococcus agalactiae* in Milk. J. Dairy Sci. 85(7):1717-1723.
- 99- Merl K, Abdulmawjood A, Lammler C, Zschock M. (2003). Determination of Epidemiological Relationships of *Streptococcus agalactiae* Isolated from Bovine Mastitis. FEMS Microbiol. Lett. 226:87-92.
- 100- Milner P, Page KL, Hillerton JE. (1997). The Effects of Early Antibiotic Treatment Following Diagnosis of Mastitis Detected by a Change in the Electrical Conductivity of Milk. J. Dairy Sci. 80(5):859-863.
- 101- Montanaro L, Arciola CR, Baldassarri L, Borsetti E. (1999). Presence and Expression of Collagen Adhesin Gene (*cna*) and Slime Production in *Staphylococcus aureus* Strains from Orthopaedic Prosthesis Infections. Biomaterials. 20:1945-1949.
- 102- Mullarky IK, Su C, Frieze N, Park YH, Sordillo LM. (2001). *Staphylococcus aureus agr* Genotypes with Enterotoxin Production Capabilities can Resist Neutrophil Bactericidal Activity. Infect Immun. 69:45-51.
- 103- Muz A, Gülcü HB, Ertuş HB, Kalender H. (1992). Mastitisli İnek Sütlerinden İzole Edilen Mikroorganizmaların İdentifikasyonları ve Antibiyotiklere Duyarlılıkları Üzerinde Bir Araştırma, F.Ü. Sağlık Bil. Der. 6:113-121.
- 104- Myllys V, Ridell J, Bjorkroth J, Biese I, Pyorala S. (1997). Persistence in Bovine Mastitis of *Staphylococcus aureus* Clones as Assessed by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis, Ribotyping and Biotyping. Vet. Microbiol. 51:245-251.

- 105- Natzke RP, Everett RW, Guthrie RS, Keown JF, Meek AM, Merrill WG, Roberts SJ, Schmidt GH. (1972). Mastitis Control Program: Effect on Milk Production. *J. Dairy Sci.* 55(9):1256-1260.
- 106- Nickerson SC. (1993). Eliminating Chronic *Staphylococcus aureus* Mastitis. *Vet. Med.* 88:375-381.
- 107- Nickerson SC. (1999). Role of Vaccination and Treatment Programs. Proc. 38th Annu. Meet. Natl. Mastitis Counc. Inc. Arlington, VA, Sayfa:76-85.
- 108- Nickerson SC, Owens WE, Boddie RL. (1995). Mastitis in Dairy Heifers: Initial Studies on Prevalence and Control. *J. Dairy Sci.* 78(7):1607-1618.
- 109- Nordhaug ML, Nesse LL, Norcross NL, Gudding R. (1994). A Field Trial with an Experimental Vaccine Against *Staphylococcus aureus* Mastitis in Cattle: I. Clinical Parameters. *J. Dairy Sci.* 77(5):1267-1275.
- 110- Norman CB. (2004). Efficacy of Prepartum Intramammary Lactating Cow Treatment in Dairy Heifers Louisiana State University and Faculty of Agriculture & Mechanical College, Doktora Tezi.
- 111- Olive DM, Bean P. (1999). Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *J. Clin. Microbiol.* 37:1661-1669.
- 112- Oliver SP, Mitchell BA. (1984). Prevalence of Mastitis Pathogens in Herds Participating in a Mastitis Control Program. *J. Dairy Sci.* 67(10):2436-2440.
- 113- Osteras O. (2000). The Cost of Mastitis: An Opportunity to Gain More Money. Proc. British Mastitis Conf. Shepton Mallet, Sayfa:67-77.
- 114- Owens WE, Watts JL. (1988). Antimicrobial Susceptibility and B-Lactamase Testing of *Staphylococci* Isolated from Dairy Herds. *J. Dairy Sci.* 71:1934-1939.
- 115- Owens WE. (1987). Isolation of *Staphylococcus aureus* L-forms from Experimentally Induced Bovine Mastitis. *J. Clin. Microbiol.* 25:1956-1961.
- 116- Owens WE, Watts JL, Boddie RL, Nickerson SC. (1988). Antibiotic Treatment of Mastitis: Comparison of Intramammary and Intramammary Plus Intramuscular Therapies. *J. Dairy Sci.* 71(11):3143-3147.
- 117- Pankey JW, Boddie NT, Watts JL, Nickerson SC. (1985). Evaluation of Protein A and A Commercial Bacterin As Vaccines Against *Staphylococcus aureus* Mastitis by Experimental Challenge. *J. Dairy Sci.* 68(3):726-731.
- 118- Penner GA, Bush A, Wise R, Kim W, Domier L, Kahsa K, Laroche A, Scoles G, Molnar SJ, Fedak G. (1993). Reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis Among Laboratories. *PCR Methods Appl.* 2:341-345.
- 119- Pereira MSV, Leal NC, Leal TCA, Sobreira M, De Almeida AMP, Siquiera-Junior JP, Campos-Takaki GM. (2002). Typing of Human and Bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR and Ribotyping-PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 35:32-36.
- 120- Philpot WN. (1984). Economics of Mastitis Control. *Vet Clin North Am: Food Animal Practice* 6:233-245.

- 121- Philpot WN. (1979). Control of Mastitis by Hygiene and Therapy. *J. Dairy Sci.* 62:168-176.
- 122- Phonimdaeng P, O'Reilly M, Nowlan P, Bramley AJ, Foster TJ. (1990). The Coagulase of *Staphylococcus aureus* 8325-4. Sequence Analysis and Virulence of Site-Specific Coagulase-Deficient Mutants. *Mol. Microbiol.* 4 (3):393-404.
- 123- Phuektes P, Mansell PD, Browning GF. (2001). Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for Simultaneous Detection of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcal* Causes of Bovine Mastitis. *J Dairy Sci.* 84(5):1140-1148.
- 124- Pitt TL. (1994). Bacterial Typing Systems: The Way Ahead. *J. Med. Microbiol.* 4:1-2.
- 125- Podbielski A, Blankenstein O, Luticken R. (1994). Molecular Characterization of the *cfb* Gene Encoding Group B *Streptococcal* CAMP-Factor. *Med. Microbiol. Immunol.* 183(5):239-256.
- 126- Poutrel B, Mendolia C, Sutra L, Fournier JM. (1990). Reactivity of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Cow and Goat Milk with Monoclonal Antibodies to *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharide Types 5 and 8. *J. Clin. Microbiol.* 28(2):358-360.
- 127- Poyart C, Pellegrini E, Gaillot O, Boumaila C, Baptista M, Trieu-Cuot P. (2001). Contribution of Mn-Cofactored Superoxide Dismutase (*SodA*) to the Virulence of *Streptococcus agalactiae*. *Infect. Immun.* 69(8):5098-5106.
- 128- Pyörälä S. (1988). Indicators of Inflammation to Evaluate The Recovery from Acute Bovine Mastitis. *Res. Vet. Sci.* 45:166-169.
- 129- Pyörälä S, Pyörälä E. (1997). Accuracy of Methods Using Somatic Cell Count and N-Acetyl-Beta-D-Glucosaminidase Activity in Milk to Assess the Bacteriological Cure of Bovine Clinical Mastitis. *J. Dairy Sci.* 80(11):2820-2825.
- 130- Pyörälä S. (2002). New Strategies to Prevent Mastitis. *Reprod. Dom. Anim.* 37:211-216.
- 131- Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GB. (1994). *Clinical Veterinary Microbiology*, Moby-Year Europe Limited, Graphos-Spain. Sayfa:327-344.
- 132- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. (2002). *Veterinary Microbiology and Microbial Diseases*. Blackwell Science Ltd, Oxford.
- 133- Raimundo O, Deighton M, Capstick J, Gerraty N. (1999). Molecular Typing of *Staphylococcus aureus* of Bovine Origin by Polymorphisms of the Coagulase Gene. *Vet. Microbiol.* 66:275-284.
- 134- Rainard P, Lautrou Y, Sarradin P, Poutrel B. (1991). Protein X of *Streptococcus agalactiae* Induces Opsonic Antibodies in Cows. *J. Clin. Microbiol.* 29(9):1842-1846.
- 135- Reneau JK, Packard VL. (1991). Monitoring Mastitis, Milk Quality and Economic Losses in Dairy Fields. *Dairy, Food and Environ. Sanit.* 11:4-11.
- 136- Riffon R, Sayasith K, Khalil H, Dubreuil P, Drolet M, Lagace J. (2001). Development of a Rapid and Sensitive Test for Identification of Major Pathogens in Bovine Mastitis by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 39:2584-2589.

- 137- Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Gay CC, Besser TE. (1994). Ecology of *Staphylococcus aureus* Isolated from Various Sites on Dairy Farms. J. Dairy Sci. 77:3354-3364.
- 138- Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Gay CC, Besser TE. (1998). Sources of Intramammary Infections from *Staphylococcus aureus* in Dairy Heifers at First Parturition. J.Dairy Sci. 81:687-693.
- 139- Rodenburg J. (1990). Mastitis Prevention: Environmental control. Ministry of Agriculture and Food Factsheet, Ontario. AGDEX 410/662.
- 140- Saulnier P, Bourneix C, Prevost G, Andremont A. (1993). Random Amplified Polymorphic DNA Assay is Less Discriminant than Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Typing Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 31:982-985.
- 141- Schalm OW, Carroll EJ, Jain NC. (1971). Bovine Mastitis. Lee and Febiger, Philadelphia.
- 142- Schlegelova J, Dendis M, Benedik J, Babak V, Rysanek D. (2003). *Staphylococcus aureus* Isolates from Dairy Cows and Humans on a Farm Differ in Coagulase Genotype. Vet. Microbiol. 92:327-334.
- 143- Schleifer KH. (1986). Gram Positive Cocci. "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.2" PHA Sneath, NS Mair, ME Sharpe, JG Holt. (Editörler) Williams and Wilkins, Baltimore, Sayfa:999-1103.
- 144- Schwarzkopf A, Karch H. (1994). Genetic Variation in *Staphylococcus aureus* Coagulase Genes: Potential and Limits for Use as Epidemiological Marker. J. Clin. Microbiol. 32:2407-2412.
- 145- Sears PM, Belschner AP. (1998). Eliminating *Staphylococcus aureus* Intramammary Infections Using Immune Enhancement and Antibiotic Therapy. Proc. 37th Annu. Meet. Natl. Mastitis Counc, Inc. St. Louis, MO. Sayfa:275-276.
- 146- Segura M, Gottschalk M. (2004). Extracellular Virulence Factors of *Streptococci* Associated with Animal Diseases. Frontiers in Bioscience. 9:1157-1188.
- 147- Sischo WM, Heider LE, Miller GY, Moore DA. (1993). Prevalence of Contagious Pathogens of Bovine Mastitis and Use of Mastitis Control Practices. J. Am. Vet. Med. Assoc. 202(4): 595-600.
- 148- Sol J, Sampimon OC, Barkema HW, Schukken YH. (2000). Factors Associated with Cure After Therapy of Clinical Mastitis Caused by *Staphylococcus aureus*. J. Dairy Sci. 83:278-284.
- 149- Sol J, Sampimon OC, Snoep JJ, Schukken YH. (1997). Factors Associated with Bacteriological Cure During Lactation After Therapy for Subclinical Mastitis Caused by *Staphylococcus aureus*. J Dairy Sci. 80(11):2803-2808.
- 150- Sommerhauser J, Kloppert B, Wolter W, Zschock M, Sobiraj A, Failing K. (2003). The Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Infections from Subclinical Mastitis in Dairy Cows During A Control Programme. Vet. Microbiol. 96:91-102.
- 151- Spellerberg B. (2000). Pathogenesis of Neonatal *Streptococcus agalactiae* Infections, Microbes Infect. 2:1733-1742.

- 152- Su C, Kanevsky I, Jayarao BM, Sordillo LM. (2000). Phylogenetic Relationships of *Staphylococcus aureus* from Bovine Mastitis Based on Coagulase Gene Polymorphism. *Vet. Microbiol.* 71:53-58.
- 153- Su C, Herbelin C, Frieze N, Skardova O, Sordillo LM. (1999). Coagulase Gene Polymorphism of *Staphylococcus aureus* Isolates from Dairy Cattle in Different Geographical Areas. *Epidemiol. Infect.* 122(2):329-336.
- 154- Sutra L, Poutrel B. (1994). Virulence Factors Involved in the Pathogenesis of Bovine Intramammary Infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 40(2):79-89.
- 155- Swaminathan B, Matar GM. (1993). Molecular Typing Methods. "Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications". ASM Press Washington DC. Sayfa:26-50.
- 156- Swartz R, Jooste PJ, Novello JC. (1985). Bacteriophage Typing of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Bloemfontein Dairy Herds. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 56(2): 69-73.
- 157- Şanlı Y. (1984). Mastitis sağıtımında kemoterapötik ilaç seçenekleri ve meme içi farmakokinetik. I. Mastitis Semineri, Ankara, Sayfa:92-117.
- 158- Takaisi-Kikuni NB, Jurgens D, Wecke J, Fehrenbach FJ. (1997). Immunochemical Localization of CAMP factor (Protein B) in *Streptococcus agalactiae*, *Microbios.* 89:171-185.
- 159- Tamura GS, Herndon M, Przekwas J, Rubens CE, Ferrieri P, Hillier SL. (2000). Analysis of Restriction Fragment Length Polymorphisms of the Insertion Sequence IS 1381 in Group B *Streptococci*. *J. Infect. Dis.* 181:364-368.
- 160- Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, Hancock G, Hebert A, Hill B, Hollis R, Jarvis WR, Kreiswirth B, Eisner W, Maslow J, McDougal LK, Miller JM, Mulligan M, Pfaller MA. (1994). Comparison of Traditional and Molecular Methods of Typing Isolates of *Staphylococcus aureus*, *J. Clin. Microbiol.* 32:407-415.
- 161- Türitoğlu H, Ateşoğlu A, Salıhoğlu H, Öztürk M. (1995). Marmara Bölgesi Süt İneklerinde Mastitise Neden Olan Etkenler. *Pendik Vet. Mikrobiyol. Derg.* 26:125-137.
- 162- Tyler JW. (1992). Treatment of Subclinical Mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 8(1):17-28.
- 163- Van Belkum A. (1994). DNA Fingerprinting of Medically Important Microorganisms by Use of PCR. *Clin. Microbiol. Rev.* 7:174-184.
- 164- Van Belkum A, Struelens M, De Visser A, Verbrugh H, Tibayrenc M. (2001). Role of Genomic Typing in Taxonomy, Evolutionary Genetics, and Microbial Epidemiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(3):547-560.
- 165- Van Belkum A, Kluytmans J, Van Leeuwen W, Bax R, Quint W, Peters E, Fluit A, Vandebroucke-Grauls C, Van Den Brule A, Koeleman H, Melchers W, Meis J, Elaichouni A, Vaneechoutte M, Moonens F, Maes N, Struelens M, Tenover F, Verbrugh H. (1995). Multicenter Evaluation of Arbitrarily Primed PCR for Typing of *Staphylococcus aureus* Strains. *J. Clin. Microbiol.* 33:1537-1547.

- 166- Van den Heever LW, Erasmus M. (1980). Group B *Streptococcus*-Comparison of *Streptococcus agalactiae* Isolated from Humans and Cows in the Republic of South Africa, J. S. Afr. Vet. Assoc. 51 (2):93-100.
- 167- Vieira-Da-Motta O, Folly MM, Sakyiama CCH. (2001). Detection of Different *Staphylococcus aureus* Strains in Bovine Milk from Subclinical Mastitis Using PCR and Routine Techniques. Braz. J. Microbiol. 32:27-31.
- 168- Wang G, Whittam TS, Berg CM, Berg DE. (1993). RAPD (arbitrary primer) PCR is more Sensitive Than Multilocus Enzyme Electrophoresis for Distinguishing Related Bacterial Strains. Nucleic Acids Res. 21(25):5930-5933.
- 169- Ward PD, Adlam C, McCartney AC, Arbuthnott JP, Thorley CM. (1979). A Histopathological Study of the Effects of Highly Purified Staphylococcal Alpha and Beta Toxins on the Lactating Mammary Gland and Skin of the Rabbit. J. Comp. Pathol. 89(2):169-177.
- 170- Watts JL. (1988). Etiological Agents of Bovine Mastitis. Vet. Microbiol. 16:41-66.
- 171- Welsh J, McClelland M. (1990). Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers. Nucleic Acids Res. 18:7213-7218.
- 172- Wessels MR, Haft RF, Heggen LM, Rubens CE. (1992). Identification of Genetic Locus Essential for Capsule Sialylation in Type III Group B *Streptococci*. Infect. Immun. 60(2):392-400.
- 173- Wilkinson HW. (1977). Camp-Disk Test for Presumptive Identification of Group B *Streptococci*. J. Clin. Microbiol. 6:42-45.
- 174- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. (1990). DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.
- 175- Wilson DJ, Gonzalez RN, Sears PM. (1995). Segregation or Use of Separate Milking Units for Cows Infected with *Staphylococcus aureus*: Effects on Prevalence of Infection and Bulk Tank Somatic Cell Count. J. Dairy Sci. 78(9):2083-2085.
- 176- Yağın C, Cevger Y, Türkyılmaz K, Uysal G. (2000). Estimation of Milk Yield Losses from Subclinical Mastitis in Dairy Cows. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 24:599-604.
- 177- Yancey RJ. (1993). Recent Advances in Bovine Vaccine Technology. J. Dairy Sci. 76(8):2418-2436.
- 178- Yavuz MK, Esendal ÖM. (2002). Mastitisli İnek Sütlerinden İzole Edilen Stafilokokların Tür Düzeyinde İdentifikasyonu ve Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi. 13:19-27.
- 179- Yıldırım AÖ. (2002). Phäno-und Genotypisierung von Streptokokken der Serologischen Gruppe B (*Streptococcus agalactiae*), Isoliert von Verschiedenen Tierarten. Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, Doktora Tezi.
- 180- Yıldırım AÖ, Lämmle C, Weiß R, Kopp P. (2002). Pheno and Genotypic Properties of *Streptococci* of Serological Group B of Canine and Feline Origin. FEMS Microbiol. Lett. 212:187-192.

- 181- Yıldırım AÖ, Fink K, Lammler C. (2002). Distribution of the Hyaluronate Lyase Encoding Gene *Hylb* and the Insertion Element IS1548 in *Streptococci* of Serological Group B Isolated from Animals and Humans. *Res. Vet. Sci.* 73:131-135.
- 182- Yıldırım AÖ, Lammler C, Weiß R. (2002). Identification and Characterization of *Streptococcus agalactiae* Isolated from Horses. *Vet. Microbiol.* 85:31-35.
- 183- Zadoks RN, Van Leeuwen WB, Kreft D, Fox LK, Barkema HW, Schukken YH, Van Belkum A. (2002). Comparison of *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine and Human Skin, Milking Equipment and Bovine Milk by Phage Typing, Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Binary Typing. *J. Clin. Microbiol.* 40:3894-3902.
- 184- Zadoks RN, Van Leeuwen W, Barkema H, Sampimon O, Verbrugh H, Schukken YH, Van Belkum A. (2000). Application of Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Binary Typing as Tools in Veterinary Clinical Microbiology and Molecular Epidemiologic Analysis of Bovine and Human *Staphylococcus aureus* Isolates. *J. Clin. Microbiol.* 38:1931-1939.



8- ÖZGEÇMİŞ

01. 04. 1978 yılında Manisa'nın Soma ilçesinde doğdum. İlkokulu Soma'da, orta ve lise tahsilimi İzmir'in Bergama ilçesinde tamamladım. 1994 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesini kazandım ve 1999 yılında Veteriner Hekim ünvanıyla mezun oldum. Eylül 1999 döneminde Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında doktora başladım ve 15. 12. 2000 tarihinde Araştırma Görevlisi kadrosuna atandım. Halen Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktayım.