

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIĞIRLARDA MASTİTİSİN TEŞHİSİNDE
MİKROBİYOLOJİK KÜLTÜR VE ÇİFTLİK-
KÜLTÜR YÖNTEMLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI

Halid TEKKAL

YÜKSEK LİSANS

DANIŞMAN
Prof. Dr. Osman Yaşar TEL

ŞANLIURFA

2022

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIĞIRLARDA MASTİTİSİN TEŞHİSİNDE
MİKROBİYOLOJİK KÜLTÜR VE ÇİFTLİK-
KÜLTÜR YÖNTEMLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI

Halid TEKKAL

YÜKSEK LİSANS

DANIŞMAN
Prof. Dr. Osman Yaşar TEL

ŞANLIURFA

2022

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında her türlü yardımlarını esirgemeyen, başta danışman hocam Prof. Dr. Osman Yaşar TEL olmak üzere kıymetli bilgilerini benimle paylaşan, Prof. Dr. Oktay KESKİN, Prof. Dr. Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK, Dr. Öğr. Ahmet Murat SAYTEKİN'e, Arş. Gör. Ayfer GÜLLÜ YÜCETEPE'ye, meslektaşım, değerli büyüğüm Veteriner Hekim Veysi ÖZTÜRK'e , dostum Semih YAĞCI'ya ve her zaman yanımda olan Türkiyeli meslektaşlarıma teşekkür ederim.

Halid TEKKAL

ocak 2022

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	IV
TABLolar DİZİNİ.....	V
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	VI
ÖZET.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Mastitis.....	2
2.1.1. Mastitisin Sınıflandırılması.....	2
2.1.1.1. Subklinik Mastitis.....	2
2.1.1.2. Klinik Mastitis.....	4
2.1.2. Mastitise Neden Olan Unsurlar.....	5
2.1.2.1. Mikroorganizmalar.....	5
2.1.2.2. Hayvandan Kaynaklanan Faktörler.....	6
2.1.2.2.1. Meme Başı Yaralanmaları.....	6
2.1.2.2.2. Genetik ve Irk.....	6
2.1.2.2.3. Hayvanın Yaşı.....	7
2.1.2.2.4. Yüksek Süt Verimi.....	7
2.1.2.3. Çevresel Faktörler.....	7
2.1.3. Mastitisin Neden Olduğu Kayıplar.....	7
2.1.4. Mastitisten Korunma Yolları.....	8
2.2. Mastitislerin Teşhis Yöntemleri.....	9
2.2.1. Genel Muayene.....	10
2.2.2. Meme Muayenesi.....	10
2.2.3. Süt Muayenesi.....	11
2.2.4. Klinik Mastitislerin Tanısı.....	12
2.2.5. Subklinik Mastitislerin Tanısı.....	12

2.2.5.1. Sütte Somatik Hücre Sayısı	13
2.2.5.2. California Mastitis Test(CMT)	15
2.2.5.3. Sütün Elektriksel İletkenliği	16
2.2.5.4. Sütün pH Değeri.....	18
2.2.5.5. Sütün Bakteriyolojik Muayenesi.....	18
2.2.6. PCR Tabanlı Yöntemler.....	20
2.2.7. Nanoparçacık Bazlı Test	22
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	23
3.1. Süt Numunesi Toplama.....	23
3.2. Elektriksel İletkenlik Testi.....	23
3.3. Çalışmada kullanılan Besiyeri	23
3.3.1. Kanlı Agar (Columbia Blood Agar Base)	23
3.3.2. MacConkey Agar	24
3.3.3. Edwards Medium (Modified, Oxoid).....	25
3.3.4. Columbia CNA Agar.....	25
3.3.5. Mueller Hinton Agar (Merck, 70191).....	25
3.4. Besiyere Ekim	26
3.4.1. <i>E. coli</i> İzolasyon.....	27
3.4.2. <i>Streptococcus</i> İzolasyonu	27
3.4.3. <i>Staphylococcus</i> izolasyonu	27
3.5. Kullanılan Testler.....	27
3.5.1. Gram Boyama	27
3.5.2. Katalaz Testi.....	28
3.5.3. Koagülaz testi.....	28
3.5.4. Antibiyotik Duyarlılık Testi	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. İzole Edilen Bakterilere İlişkin Bulgular	29
4.2. Antibiyotik Duyarlılık Testin Bulguları	32
5. TARTIŞMA.....	35
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	38
7. KAYNAKLAR	39
8. EKLER	44

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Eleckronik mastitis dedektorü	17
Şekil 2.2. SHS'in cihazı	19
Şekil 3.1. Ekimler için hazırlanan besiyeri.	26
Şekil 4.1. İzole edilen <i>E. coli</i> bakterileri.....	30
Şekil 4.2. İzole edilen <i>Streptococcus</i> türleri	30
Şekil 4.3 İzole edilen <i>Staphylococcus spp.</i> türleri.....	31
Şekil 4.4. Disk diffuzyon testi.....	34

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 2.1. Kalifornia Mastitis Test Skoru	15
Tablo 2.2. Mikrobiyoloji ile somatik hücre sayısı sonuçlarının değerlendirilmesi.....	18
Tablo 4.1. Mastitisli sığırlardan elde edilen sütlerde görülen bakteri türü ve sayısına ilişkin veriler	29
Tablo 4.2. Süt örneklerinin elektrik iletkenliğine ilişkin bulgular	31
Tablo 4.3. Süt ürünlerinde besi yerine göre belirlenen bakteri türü sayısı.....	32
Tablo 4.4. Araştırmada izole ve identifiye edilen bakteri türlerinin antibiyotik direncine ilişkin bulgular.....	33

KISALTMALAR VE SİMGELER

CLSI	: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
CNA	: Columbia Naladixic Acid
CNS	: Koagülaz Negatif <i>Staphylococcus</i>
E.M.	: Edwards Medium
Eİ	: Elektriksel iletkenlik
K.A.	: Kanlı Agar
MCC	: MacConkey agar
NBT70C	: Neomisin-Basitrasin-Tetrasiklin

ÖZET

SIĞIRLARDA MASTİTİSİN TEŞHİSİNDE MİKROBİYOLOJİK KÜLTÜR VE ÇİFTLİK- KÜLTÜR YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Halid TEKKAL

Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Bu çalışmada sığırlarda mastitisin teşhisinde kullanılan mikrobiyolojik kültür ve çiftlik-kültür yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla Adıyaman bölgesinde klinik mastitisli süt ineklerinden toplam 83 adet süt örneği mikrobiyolojik olarak incelenmiştir. Araştırmada süt numunelerinin mikrobiyolojik analizlerin yapılabilmesi amacıyla kanlı agar, MacConkey agar, edwards medium ve Columbia CNA agar, besi yerlerine numuneler ekilerek uygun şartlarda inkübe edilmiştir. Araştırmada incelenen süt örneklerinin %90,3 (75)'ünde bakteri izolasyonu ve identifikasyonu yapılırken, süt örneklerinin %9,7 (8)'inde ise üreme olmadığı belirlenmiş, bazı örneklerde iki farklı patojen türüne rastlanmıştır. Kanlı agara ekimi yapılan ve kültür pozitif sonuç veren süt örneklerinin %17,9 (14)'unda *Staphylococcus aureus*, %61,6 (48)'sında *Streptococcus spp.*, %7,7 (6)'sinde *E. coli*, %6,4 (5)'ünde *Enterococcus spp.*, %3,8 (3)'inde Maya ve %2,6 (2)'sında de Koagulaz negatif *Staphylococcus* (CNS); MacConkey agara ekimi yapılan ve kültür pozitif sonuç veren süt örneklerinin %60 (6)'ında *E. coli*, %30 (3)'sinde *Enterococcus spp.* ve %10 (1)'unda maya; Edwards Mediuma ekimi yapılan ve kültür pozitif sonuç veren süt örneklerinin %91,5 (43)'inde *Streptococcus*, %6,4 (3)'ünde *Enterococcus* ve %2,1 (1)'inde maya ve CNA ya ekimi yapılan ve kültür pozitif sonuç veren süt örneklerinin ise %20 (14)'sinde *Staphylococcus aureus*, %68,6 (48)'sında *Streptococcus spp.*, %4,3 (3)'ünde *Enterococcus spp.*, %4,3 (3)'ünde maya ve %2,8 (2)'inde ise CNS identifiye edilmiştir. Bu araştırmada çiftlik kültür yöntemleri ile standart mikrobiyolojik tanı yöntemlerinin karşılaştırılması sonucunda çiftlik kültür yöntemlerinin, standart mikrobiyolojik yöntemlere benzer başarı oranına sahip oldukları belirlenmiştir. Sonuç olarak, Çiftlik kültür yöntemlerinin kullanımının, mastitis patojenlerinin tespiti ve oluşturulacak koruma ve kontrol programlarında antibiyotik direnç oluşumunun izlenmesi açısından etkili kontrol stratejilerinin oluşturmada yararlı olacağı kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Sığır, bakteri, mastitis, izolasyon, antibiyogram

ABSTRACT

COMPARISON OF MICROBIOLOGICAL CULTURE AND FARM-CULTURE METHODS FOR DIAGNOSIS OF MASTITIS IN CATTLES

Halid TEKKAL

Department of Veterinary Microbiology, Master Thesis

In this study, it was aimed to compare the microbiological culture and farm-culture methods used in the diagnosis of mastitis in cattle. For this purpose, 83 milk samples from dairy cows with clinical mastitis in Adıyaman region were examined microbiologically. In the study, blood agar, MacConkey agar, Edwards medium and Columbia CNA agar were inoculated in the media and the samples were incubated under appropriate conditions in order to perform microbiological analysis of milk samples. While bacterial isolation and identification were performed in 90.3% (75) of the milk samples examined in the study, it was determined that there was no growth in 9.7% (8) of the milk samples, and two different types of pathogens were found in some samples. Of the milk samples inoculated on blood agar with culture positive results, 17.9% (14) had *Staphylococcus aureus*, 61.6% (48) *Streptococcus spp.*, 7.7% (6) *E. coli*, 6%, 4 (5) *Enterococcus spp.*, 3.8% (3) Yeast and 2.6% (2) *Coagulase negative staphylococcus* (CNS); *E. coli* was found in 60% (6) and *Enterococcus spp.* in 30% (3) of the milk samples inoculated on MacConkey agar with culture positive results. and in 10% (1) yeast; Of the milk samples inoculated on Edwards Medium with culture positive results, 91.5% (43) of the milk samples were inoculated with *Streptococcus*, 6.4% (3) with *Enterococcus*, and 2.1% (1) with yeast and CNA . On the other hand, 20% (14) *Staphylococcus aureus*, 68.6% (48) *Streptococcus spp.*, 4.3% (3) *Enterococcus spp.* 4.3% (3) of milk samples with culture positive results. Yeast was identified in three and CNS in 2.8% (2). In this study, as a result of the comparison of farm culture methods with standard microbiological diagnostic methods, it was determined that farm culture methods had similar success rates to standard microbiological methods. As a result, it was concluded that the use of farm culture methods would be useful in establishing effective control strategies in terms of detecting mastitis pathogens and monitoring the formation of antibiotic resistance in the prevention and control programs to be established.

Key Words: Cattle, Bacteria, Mastitis, Isolation, Antibigram

1. GİRİŞ

Meme dokusunun, (alveoller, meme parankimi), sütün depolanmasını ve dışarı çıkmasını sağlayan kanal ve boşluklarının, sebebi ne olursa olsun bütün hastalıklarına mastitis adı verilir. Mastitis, seyrine göre klinik ve subklinik olmak üzere ikiye ayrılır. Hastalığın kesin tanısı, hastalığın nedeni ve tedavisi arasındaki en önemli adımdır. Hastalık ne kadar erken teşhis edilirse, hasar o kadar az olacaktır; bu nedenle, çiftlikte kullanılmak üzere güvenilir teşhis araçları geliştirmeye çalışılmaktadır. Mastitisin yıllık olarak, modern işletmelerde inek başına yaklaşık 150-220 \$ zarara neden olduğu hesaplanmıştır (1). Mastitislere neden olan etkenlerin başında *Staphylococcus aureus* ve diğer *Staphylococcus* türleri, *Streptococcus spp.* ve *E. coli*'ler gelmektedir. Gelişmiş ülkeler ile ülkemizdeki durum karşılaştırıldığında mastitis etiyolojisi olarak büyük bir benzerlik bulunmaktadır. *Staphylococcus* türleri, hem akut seyirli hem de subklinik seyirli mastitise neden olmaktadır. İneklerde subklinik mastitislere şekillenen ekonomik kayıpların, klinik mastitislere göre daha fazla olduğu ortaya konmuştur (3). Türkiye'de yapılan çalışmalarda, Erzurum'da %40, Ankara'da %35.7, Adana'da %53.1, Kayseri'de %24.3, Eskişehir'de %15 ve Konya'da ise %5 oranında mastitisli inek belirlenmiştir (4). Klinik mastitisli ineklerin tedavi kararının verilmesi ve etkenlerin tespiti için ticari olarak kullanılan çiftlik kültür testleri mevcuttur (2). Çiftlik kültür testlerinde mastitis patojeni identifiye edildiğinden dolayı gereksiz antibiyotik kullanımından kaynaklanan ekonomik kayıplar azalmaktadır. Daha önceki çalışmalar çiftlik kültür testlerinin kullanılmasıyla antibiyotik kullanımının %50 azaldığı belirtilmiştir (5). İlk hazırlanan çiftlik kültür testi McConkey agar ve Kanlı agardan oluşmaktaydı. Bu test ile etkenler gram pozitif ve Gram negatif etkenler olarak 24-32 saat içinde belirlenebiliyordu. Bu testler mikrobiyolojik kültür metotlarından daha düşük maliyetli olarak bildirilmiştir. Kromojenik besiyeri kullanılarak yapılan çiftlik kültür testlerinde mastitis patojenleri çıplak gözle daha kolay bir şekilde identifiye edilebildiği tespit edilmiştir (1). Bu çalışmada, çiftlik kültür testlerinin etkinliği ve tanısal doğruluğunu, standart mikrobiyolojik kültür metodu ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilerek çiftlik kültür sistemlerinin etkinliği saptamak amaçlanmıştır. Bu çalışmadan sağlanan bilgilerin kullanılması, özellikle çiftlik kültür testlerinin etkinliğinin belirlenmesinin yanında, uygun antibiyotik önerilmesiyle, etkin koruma ve sağaltım programlarının uygulanmasına ve antibiyotik kalıntı probleminin çözümüne de katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mastitis

Mastitis, tüm memeli hayvanlarda görülebilen meme bezlerinde mikroorganizmalar (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Arcanobacterium*, *Corynebacterium* v.d.) tarafından meydana getirilen yangılı ve iltihabi bir meme hastalığıdır. Süt veren bütün ineklerde görülebilen bu hastalık, özellikle süt verimi yüksek olan ineklerde daha fazla görülmekte olup, dolayısıyla bu tür ineklerde daha çok önem taşımaktadır. Hastalık süt veriminin azalması, süt bileşiminin değişimi ve bozulması gibi belirtilerle dikkat çeker. Ayrıca meme loblarında sıcaklık artışı, kızarıklık ve şişkinlik gibi belirli belirsiz bulgularla kendisini gösterir (6).

Batı ülkelerinde yapılan araştırmalara göre, süt inekçiliğinde endemik seyreden hayvan hastalıkları içerisinde en fazla ekonomik kaybın mastitisten kaynaklandığını ortaya koymuştur. Mastitis ülkemizde de görülmekte olup, süt inekçiliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Dünyada ve ülkemizde mastitis üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Buna rağmen mastitis günümüzde süt inekçiliğinin önemli bir sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır (7, 8).

2.1.1. Mastitisin Sınıflandırılması

Mastitisler hastalığın seyri ve yangı belirtilerine göre değişik şekillerde sınıflandırılır. Ancak yapılan çalışmalarda patolojik bulgulara göre mastitisler genel olarak, subklinik ve klinik mastitis olarak sınıflandırılmıştır (9).

2.1.1.1. Subklinik Mastitis

Gizli mastitis adını da verebileceğimiz bu olgular klinik mastitise göre çok daha yaygındır. Süt inekçiliği yapılan işletmelerde karşılaşılan en önemli problemlerden biri olan subklinik mastitiste klinik olarak memede ve hayvanda hiçbir belirti gözlenemez. Ancak laboratuvar çalışmaları ile sütteki somatik hücre sayısının artışı ve biyokimyasal

parametrelerin değişimleri belirlenerek subklinik mastitisin teğhisine gidilebildiği ve patojenik etkenlerin izolasyonlarının yapıldığı bildirilmektedir (9- 10).

Subklinik mastit tanısı için birçok test değerlendirilmiştir. Daha yaygın olanlardan bazıları burada listelenmiştir (11).

Somatik hücre sayısı (SCC): Mililitre süt başına lökosit konsantrasyonu olarak ifade edilir. Lökositler enfekte olmayan memelerde somatik hücrelerin %80'ini ve enfekte memelerde% 99'unu oluşturur. Mastitisli sütte laktoz oranı daha düşüktür. Bu durum, sekretuar hücrelerdeki enzim sistemlerinin sentetik yeteneğinin azalmasına neden olan ve böylece laktoz biyosentezinin azalmasına neden olan doku hasarı nedeniyle meydana gelir (12).

Laktat dehidrojenaz (LDH): Lökositlerin sitoplazması dahil olmak üzere çoğu dokuda bulunan bir enzimdir. Hücre hasarı meydana geldiğinde, meme epitel hücrelerine veya lökositlere LDH salınır. Ticari olarak temin edilebilen bazı mastitis saptama araçları LDH aktivitesinin ölçümünü içerir (13).

N-asetil-b-D-glukozaminidaz (NAGase): Hasar görmüş meme epitel hücrelerinden ve daha az ölçüde süt somatik hücrelerinden süte salınan bir lizozomal enzimdir (11).

Akut faz proteinleri: Mastitis yangısının yoğun dönemlerinde kandaki değerleri önemli düzeyde değişkenlik gösteren proteinler akut faz proteinleri (APP) olarak adlandırılmaktadır. Hayvanlarda ortaya çıkan doku hasarlarının büyüklüğü ve rahatsızlığın boyutu akut faz proteinlerin kandaki düzeyi ile yakından ilişkilidir. Bu nedenle APP'lerinin konsantrasyonları diagnostik ve prognostik bilgi sağlar (14).

İletkenlik: Sodyum ve klorür konsantrasyonlarındaki bir artış ve potasyum konsantrasyonundaki bir azalma nedeniyle süütün elektrik iletkenliği (EC) mastitis ile artar. Birçok sağım ekipmanı üreticisi, mastitisi tespit etmek için hat içi bir yöntem olarak EC'yi kullanmıştır (13).

Subklinik mastitiste, memelerde ve hayvanın genel durumunda hiçbir anormallik göze çarpmaz. Fakat yangılı meme lobunun süt verimi diğer loblara kıyasla belirli bir şekilde azalmıştır. Subklinik mastitisler, memelerin tamamen normal görünüşte olması ve süütün kalitesinde gözle görülebilir bir bozukluk bulunmaması nedeniyle, genellikle dikkatten kaçır. Halbuki, sağlık açısından ve ekonomik açıdan klinik mastitisten çok daha

önemlidir. Çünkü subklinik mastitis dikkatten kaçtığı için sağıım sırasında mastitisli ineklerden sağlıklı ineklere bulaşabileceği gibi zamanla mikroorganizmaların artması sonucu klinik mastitise dönüşebilir. Subklinik mastitis vakalarının yaklaşık % 40' ı zaman içinde klinik mastitis vakasına dönüşebilir (15).

2.1.1.2. Klinik Mastitis

Klinik mastitisten hayvanın genel durumunda halsizlik, iştahsızlık, ateş gibi genel hastalık belirtileri görülür. Memede şişlik, kızarıklık, ağrı ve büyüklük farklılıkları vardır. Sütte kanlı, irinli ve pıhtılı bir görüntü tespit edilir. Ateşin hafif yükselmesiyle hastalık başlar. Bulaşma süresi 1-2 hafta kadar sürer. Meme şişer ve sertleşir. Hızlı bir şekilde memede doku tahribatı şekillenir ve süt salgısı azalır. Genelde sütün görünüşü de normal değildir. Memeden önceleri pıhtılı, iltihaplı sonra su gibi akıntı gelir. Süt sarımtırak bir renk alır. Klinik mastitisin kronikleşmiş şeklinde yangılı meme lobu sertleşir, hasta memenin sütü iyice azalır veya hiç gelmez ve sonuçta meme körleşir (16).

Rutin sağıımdan hemen önce toplanan bir süt akışının görsel muayenesi ile klinik mastit kolayca tespit edilebilir. Klinik mastitis şiddet düzeyine göre hafif, orta veya şiddetli olarak tanımlanabilir. Şiddet skorlama sistemleri uygun tedaviyi ve istenmeyen sonuç riskini belirlemek için kullanılabilir (17).

Hafif klinik mastitis: Sadece sütteki anormal değişikliklerle (genellikle pıhtı veya süt salgısının renginde ve kıvamındaki değişiklikler) kendini gösterir.

Orta derecede klinik mastitis: Sütteki ve meme bezindeki anormal değişikliklerle (kızarıklık, ısı, ağrı ve şişlik gibi dokudaki enflamatuvar) kendini gösterir.

Şiddetli klinik mastitis: Sütteki ve meme bezindeki anormal değişikliklerin yanı sıra aynı zamanda inekte hastalık durumunun (vücut ısısı, ruminasyon oranı, iştah, hidrasyon durumu ve tavırdaki değişiklikler) ortaya çıkmasıyla kendini gösterir.

2.1.2. Mastitise Neden Olan Unsurlar

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de hayvancılık sektöründe önemli ekonomik kayıplara neden olan mastitise bir çok faktör neden olmaktadır. Ancak, mastitis daha çok patojen mikroorganizmalar, hayvanlardan kaynaklanan faktörler ve çevresel faktörler gibi üç ana faktörün karşılıklı etkileşimi sonucu şekillenmektedir. Olumsuz çevre koşulları hayvanın direnç gücünü aştığı zaman mastitis ortaya çıkmaktadır (13).

2.1.2.1. Mikroorganizmalar

Mastitiste hastalığın esas nedeni çoğunlukla mikroorganizmalardır. Yapılan araştırmalar 50'nin üzerinde bakteri türünün ve 20'den fazla mantar türünün mastitisin oluşumuna neden olduğunu göstermektedir. Bu etkenlerden önemli olanlarını bakteriler, virüsler, mantarlar ve mayalar olarak sıralamak mümkündür (18).

Mikroorganizmaların parankim dokusuna ulaşmaları şu şekilde gerçekleşir

1. Meme başı deliği, meme başı kanalı, meme başı sinüsü, sinüs laktiferus ve duktus laktiferus yolu ile memeye ulaşan, bulaşma yolu ile meydana gelen mastitisler (Galaktojen enfeksiyon).
2. Meme başı ve meme derisinin doku bütünlüğünün bozulması sonucu meydana gelen mastitisler (Yara enfeksiyonu).
3. Hayvanın herhangi bir yerinde bilinen veya gizli bir enfeksiyon kaynağından köken alan, kan, lenf ve diğer yollarla memeye ulaşan etkenler ile meydana gelen mastitisler (Hematojen mastitis).

Bulaşmada birinci yol çoğunlukta ve önem teşkil etmektedir. Araştırmacılar, gerek elle sağım ve gerekse makine ile sağım sonunda mikroorganizmaların sağımın bitmesinden hemen sonra meme başı deliğinden içeri girdiklerini bildirmektedir. Böylece memeye giren mikroorganizmalar, meme lobunun alt kısmındaki sekretorik dokuda ve süt kanallarında çoğalmaya başlar. Enfeksiyon daha sonra buradan bütün memeye yayılır. Enfeksiyona neden olan mikroorganizmalar yerleştiği yerlerde asit, toksin ve iritan maddeler salgılayarak yangısal tepkilerin meydana gelmesine neden olurlar.

Bu nedenle mastitisin meydana gelmesi özet olarak üç aşamada meydana gelir (16):

1. Hastalık etkenlerinin memeye girmesi (İnvazyon dönemi).
2. Süt kanalları meme dokularına ulaşan etkenlerin çoğalması ve meme dokusunu istila etmesi (Enfeksiyon dönemi)
3. Memenin hastalık etkenlerine ve bunların toksinlerine karşı reaksiyon göstermesi (Yangı dönemi).

2.1.2.2 Hayvanlardan Kaynaklanan Faktörler

Meme ve meme başı yaralanmaları, kalıtım ve ırk, hayvanın yaşı, yüksek süt verimi gibi durumlar mastitisin oluşumunda etkili faktörlerdendir. Hayvanlardan kaynaklanan faktörler aşağıdaki gibi sıralanabilir (19):

2.1.2.2.1. Meme Başı Yaralanmaları

Anatomik olarak normal ve sağlam olan bir meme kanalı, mikroorganizmaların meme içine geçmesine mani olur. Meme loblarında ve meme başlarında oluşan kesik yaraları, travma ve ezikler memenin normal yapısını bozarlar. Böylece hastalık etkenleri memeye girerek hastalık oluştururlar. Ayrıca memelerin büyük ve sarkık oluşu da mastitisin oluşumuna zemin hazırlar (20).

2.1.2.2.2 Genetik ve Irk

Saf kan hayvanlarda, tek yönlü verim elde etmek için yetiştirilen hayvanlarda daha çok görülür. Süt ineklerinde kalıtımla mastitis arasında doğru bir orantı bulunmaktadır. Jersey ırkı inekler gerek mastitise gerekse meme başı bozuklukları bakımından Siyah Beyaz ırklarla Danimarka Kırmızılarında daha dayanıklıdırlar (18).

2.1.2.2.3. Hayvanın Yaşı

Yapılan araştırmalar yaş ılerledikçe mastitisin arttığını ortaya koymuştur. Genç hayvanlarda meme başı kanalının dar ve gevmemiş olması mikroorganizmaların memeye girişini engeller. Ancak yaşlı hayvanlarda meme başı sfinkterlerinin gevşemesi sonucu mikroorganizmalar memeye kolaylıkla girerek mastitise neden olmaktadır (21).

2.1.2.2.4. Yüksek Süt Verimi

Yüksek süt verimine sahip ineklerde meme lobları verdikleri süt miktarına bağlı olarak büyür ve gelişir. Böylece büyüyen memeler yaralanmalara ve travmalara daha çok maruz kalacağından mastitis görülme oranı bu tip ineklerde daha fazladır (22).

2.1.2.3. Çevresel Faktörler

Beslenme, barınakların yapısı ve hijyeni, hava şartları, sağım makineleri, hatalı elle sağım, buzağı emzirtme, eksik sağım, stres, yüksek östrojenik etki gibi faktörler mastitisin meydana gelmesinde etkili olan çevresel faktörlerdir (20).

2.1.3. Mastitisin Neden Olduğu Kayıplar

Mastitis, süt inekçiliği yapılan işletmelerde en fazla ekonomik kayba neden olan hayvan hastalıklardan biridir. Ülkemiz süt inekçiliği tüm dünyada olduğu gibi mastitisten olumsuz etkilenmektedir. Mastitisin neden olduğu kayıplar şunlardır(23).

- Hasta olan meme lobları diğer sağlam meme loblarına oranla daha az süt verirler. Bazen halkın meme kr oldu deyimi gibi hiç süt alınmayabilir. Bu süt verimini etkileyen önemli bir kayıptır.
- Bazı durumlarda mastitisli olgularda meme bozukluğu ve süt verimi düşüklüğü yanı sıra hayvanın genel durumu da bozulur. Gangrenli mastitisler zamanında tedavi edilmezse lme sebep olur.

- Mastitisli sütler değerini kaybeder. Bu tür sütlerde yağ oranı düşer. Süt rnleri imalatında randıman alınmaz. Peynir ve yoğurt yapımında mayalanma şekillenmez.
- Hasta memelere tedavi sırasında ödenecek veteriner hekimlik hizmetleri bedeli ve ilaç masrafları tutarı küçümsenmemelidir.
- Mastitisli sütler insan sağlığı için zararlıdır. Kontrolsüz olarak tüketime sunulan ve insan sağlığını bozan mastitisli sütlerin yol atığı zarar çok önemli ve üzerinde ciddi bir şekilde durulması gereken bir konudur.

2.1.4. Mastitisten Korunma Yolları

Süt ineklerini mastitisten korumanın en geçerli yolu; iyi bakım ve beslenme, iyi sağım, temizlik ve sağlık kurallarına zen göstermek, aşılama, sürüdeki mastitisli hayvanları ayırmak ve hemen tedavi etmektir.

Mastitisten korunmak için alınması gereken tedbirler şunlardır (24):

- Altlığı ve ahır dezenfekte etmek
- Süt ineklerinin altına daima kuru altlık sermek,
- Makine ile sağımda, makine bakımını düzenli yaptırmak,
- Sağımı günün belirli saatlerinde düzenli olarak yapmak,
- Elle sağımda, sağıma başlamadan önce memelerin ve ellerin temizliğine dikkat etmek, her ineğin sağımından sonra elleri ilaçlı su ile yıkamak,
- Sağımdan sonra memeyi mutlaka dezenfektanlı suyla yıkamak ve kurulamak,
- Yaşlı hayvanların meme başı bzc kasları gevshek olduğundan daha sık hastalığa yakalanırlar. Bunun için yaşlılar ile geç hayvanlar ayrı yerlerde barındırılmalıdır,
- Belirli aralıklarla veteriner hekim tarafında genel sağlık kontrolü yapılmalıdır.

2.2. Mastitislerin Teşhis Yöntemleri

Hastalığın kesin tanısı, hastalığın nedeni ve tedavisi arasındaki en önemli adımdır. Meme sağlığının yönetimi için ekonomik, güvenilir ve hızlı bir teşhis aracı esastır (21). Hastalık ne kadar erken teşhis edilirse, hasar o kadar az olacaktır, bu nedenle güvenilir teşhis araçlarını geliştirmek için birçok çalışma yapılmaktadır. Mastitis, bazı patojenlerin, alerjilerin veya fiziksel travmaların istilası sonucu meme bezinin iltihaplanmasıdır (2). Sığır mastitisleri, süt üretiminde azalma, tedavi maliyetleri ve itlaf açısından büyük ekonomik kayıplar nedeniyle süt endüstrisinin en yaygın hastalıklarından biridir. Enfeksiyonun şiddetine bağlı olarak, klinik ve subklinik olmak üzere iki tip mastit vardır. Klinik mastitte fizyolojik semptomlar ortaya çıkar ve süt görünümünde ve memede değişiklikler meydana gelir. Subklinik mastitte gözle görülür semptom gözlenmez (25).

Subklinik mastit için geleneksel olarak somatik hücre sayısı (SCC) ve California mastitis testi çiftlik içi tarama testleri kullanılır. SCC mastitis tespiti için evrensel bir gösterge olarak kabul edilir ve bireysel çiftliklerde ve dökme tanklarda süt kalitesini belirlemek için yaygın olarak kullanılır. Test maliyeti ve eğitilmiş personel gereksinimi gibi dezavantajı vardır (18).

Mastitis, süt üretiminin azalmasına, veteriner bakım maliyetlerine ve itlaftan dolayı kayıplara neden olur. Mastitis ve etiyolojisi hakkında pek çok bilgiye rağmen, mastitis birçok süt sürüsünde hala yaygındır; ortadan kaldırılması veya kontrol edilmesi zordur ve dünya çapında süt endüstrisi üzerinde büyük olumsuz finansal etkiye sahiptir. Sütte belirgin kompozisyon değişiklikleri ile toplam süt çıktısında azalma (kalite ve endüstriyel kullanılabilirlikte bir azalma), tedavi maliyeti, işçilik maliyetleri gibi çeşitli kayıplar, şekillenmektedir. Azalan süt üretimi genellikle patojenin doğrudan etkisinden veya konakçı bağışıklık tepkisinin neden olduğu hasardan kaynaklanır. Mastitis, etiyoloji, kayıp derecesi ve tedavi stratejisi açısından çok karmaşıktır (26).

Mastitis sadece hayvanların sağlığını etkilemekle kalmaz, süt üretiminin azalmasına neden olur, aynı zamanda sütün kalitesi üzerinde de olumsuz bir etkiye sahiptir. Subklinik mastitisli süt örneklerinde süt yağı, protein, laktoz, potasyum, kalsiyum, magnezyum, fosfor, demir, çinko azalmış ve pH, elektrik iletkenliği, malondialdehit, lökositler ve nötrofil sayısı artmıştır (21).

Mastitis, farklı muayene yöntemleriyle teşhis edilir (22). Klinik muayeneler; ineğin genel muayenesini, özel meme muayenesini ve sütün fiziksel muayenesini ve bir takım kimyasal testlerle süt muayenesini kapsar. Laboratuvar muayenesi ise sütün mikrobiyolojik muayenesini, bakteriyolojik ve viral izolasyon ve identifikasyonu kapsar. Ayrıca mastitis teşhisinde ve sütün sağlıklı olup olmadığının tespit edilmesinde, önemli diğer bir metot ise sütte somatik hücre (SHS) sayımıdır.

2.2.1. Genel Muayene

Mastitis muayenesine, her hastalıkta olduğu gibi öncelikle genel muayene ile başlanmalıdır. Hayvan sahibinden alınacak anamnez çok önemlidir. Hayvanın ne zamandır hastalık belirtileri gösterdiği, daha önce tedavi olup olmadığı, yaşı, kaçınıcı laktasyonda olduğu, yem miktarı ve çeşidi, ne zaman doğum yaptığı gibi hastalık açısından önem arzeden bilgiler elde edilir. Bu bilgiler ışığında hayvanın genel durumuna bakılarak yeme ve içme, sıvı kaybı ve vücut sıcaklığı değerlendirilir (22).

2.2.2. Meme Muayenesi

Memelerin inspeksiyonunda meme loblarının ve meme başlarının birbirlerine orantılı şekil ve büyüklükleri gözlemlenmelidir. Klinik mastitisli meme lobları yangının şiddeti ve sürecine göre farklı derece ve çeşitlerde semptomlar gösterir. Klinik mastitisin erken döneminde kızarıklık, ağrı ve şişkinlik görülürken, ilerleyen zamanlarda bağ doku artışına bağlı sertleşme, küçülme ve körelme görülür. Enfekte olmuş meme lobu diğer meme loblarıyla kıyaslandığında net bir şekilde ayırt edilir. İnspeksiyon ile meme başı ve meme derisinde oluşan yırtık, ezik, kesik yaraları, apse, fistül, gangren tarzı oluşumlar tespit edilebilir (22,23).

Memelerin palpasyonu, sağımdan sonra memenin boşaltılmasıyla ve memenin elle muayene edilmeye uygun hale geldikten sonra yapılan el muayenesidir. Palpasyonda, öncelikli olarak meme başı muayene edilir. Meme başları, meme başı tabanından başlayarak memenin tabanına kadar boylu boyunca baş ve işaret parmakları arasında yuvarlanarak palpe edilir. Palpasyonla meme başı ve kanalında olabilecek anormal oluşumlar, doku kalınlaşmaları, fibrozis kontrol edilir. Normal bir meme başı sinüsü

yumuşak, elastik iken fibrozis vakalarında bağ dokunun oluşturduğu sertlik hissedilir (23).

Meme loblarının muayenesinde de mutlaka süt boşaltılmış olmalıdır. Aksi takdirde memelerdeki patolojiler el ile hissedilemez. Avuç içleri memelerin altına yerleştirilerek ağırlıkları büyüklükleri ve simetrisi kontrol edilir. Klinik mastitislerde genellikle memeler arasında asimetri vardır. Meme sinüsünün derinlemesine palpasyonunda iki elin arasına alınan meme de varolan anormallikler parmak hareketleriyle tespit edilmeye çalışılır. Normalde memeler yumuşak ve elastik olmalı, içinde bir kitle vb. bir yapı bulundurmamalıdır. Klinik mastitisin akut evresinde yangı semptomları hissedilirken, hastalık kronikleştikçe yangı geriler ve yerini bağ dokunun oluşturduğu sertlikler alır. Meme palpasyonu mutlaka diğer memelerle kıyas yapılarak uygulanmalıdır (24).

2.2.3. Süt Muayenesi

Sütün fiziksel muayenesi genel görüntüsü, kokusu kıvamı, rengi gibi özelliklerine bakılarak Strip Cup Test (SCT) ile yapılır. Strip Cup Test siyah zemin üzerine ön sağım yapılarak süte kıvam, renk pıhtı, flakon, irin ve koku yönünden incelenerek yapılır. Süte kıvam azalması ve sulanma, enfeksiyöz olmayan mastitisleri, memedeki irritasyonları ya da mastitis başlangıcını gösterir. Sütteki pıhtı, memede yangı olduğuna işarettir. Sütün sarı olması ve irinli görünümü, süpüratif bir enfeksiyonu ifade edebilirken bazı ırklarda kolostrum rengi sarı olabilir. Süt rengi beslenme ile ilgili olarak değişiklik gösterebilir ki; yeşil ot tüketimi fazla olduğunda, havuç, safran gibi renklendirici gıdalar tüketildiğinde süt rengi sarı olabilir. Jersey ırklarının sütlerinin rengi ise fizyolojik olarak diğer sütlere göre daha sarı renklidir. Şap, antraks, piroplozmozis gibi enfeksiyonlar ve tetrasiklinler de süte sarı renk verirken, fenotiyazin süte pembe- kahverengi renk verir. Sütte görülen kan; meme damarlarının travma ya da bir lezyon sonucu çatlaması veya buzağılamadan hemen sonra görülen haliyle, memeye kan hücumu sonucu oluşan kapillar kanamanın işaretidir. Fizyolojik olan bu kanama, postpartum birkaç gün sürebildiği gibi birkaç hafta da devam edebilir (22, 23). Sütte patolojik olarak kan görülmesinin sebepleri ise hatalı sağım sonucu zedelenme, Leptospirozis, C vitamini eksikliği, zehirli otların tüketilmesi, intrasisternal (İS) irritan maddelerin verilmesi olabilir(24).

Sütteki anormal kokunun sebepleri, süpürasyonlu bir enfeksiyona, ketozise ve ovaryum kistlerine bağlı endokrin bozukluklara işaret edebilir. Patolojik olmayan sebepler ise kötü şartlarda tutulan silaj ya da ağır kokusu olan harici gıdalar tüketilmesidir (22, 23).

2.2.4. Klinik Mastitislerin Tanısı

Klinik mastitisler; meme de oluşan enfeksiyonun gözle görülebildiği, yangı belirteçlerinin tespit edilerek, teşhis edilebildiği mastitis çeşitleridir (25, 26). Klinik mastitis semptomları yangıyı ifade eden şişkinlik, kızarıklık, ağrı ve sıcaklık artışıdır. Süt, kötü kokulu, sulu, kanlı, pıhtılı olabilir (22- 26). Klinik mastitis olan meme lobunda süt üretimi azalmış veya tamamen durmuş olabilir (22, 27). Sütteki somatik hücre sayısı (28) ve bakteri sayısında (29) şiddetli bir artış vardır.

Klinik mastitisler çoğunlukla lokal enfeksiyonlar oluşturmalarına rağmen, nadiren sistemik bir hal alıp, hayvanda iştahsızlık ve letarji gibi semptomların ortaya çıktığı bir hastalık haline gelebilir (22, 28, 29). Klinik mastitisler günlük olarak meme ve sütün gözlemlenmesi ile kolayca fark edilerek erken tanıya gidilebilir. Bu nedenle özellikle ön sağım yapılmalı ve sütün klinik muayenesi günlük yapılmalıdır. Sütün klinik muayenesinde en iyi yöntem SCT'dir. Bu yöntem ön sağım sütünün siyah bir zemin üzerine alınarak, patolojik görünüm yönünden incelenmesi şeklinde yapılır (30, 31). Klinik mastitis tanısında yalnızca fiziksel muayeneler yeterli olurken, tedavide antibiyotik seçimi için antibiyotik duyarlılık testlerin yapılması gereklidir (32).

2.2.5. Subklinik Mastitislerin Tanısı

Subklinik mastitislerde, memede ve sütte gözle görülebilen klinik semptomlar mevcut değildir (22, 23, 33). Subklinik mastitis; üretilen süt miktarında azalma (22, 34), sütte somatik hücre sayısında (SHS) artış (22, 35), bakterilerin sütte mevcudiyeti (36) ve sütteki bakteri sayısındaki artış (37) ile teşhis edilir. Ayrıca subklinik mastitislerde sütün bileşiminde de değişiklik oluşur (22). Subklinik mastitislerin tanısı amacıyla; California Mastitis Test (CMT), bakteriyolojik izolasyon ve identifikasyon, sütün somatik hücre

sayısı (SHS) ölçümü ve sütün pH'ının saptanması gibi testler ve tanı yöntemleri kullanılır (22, 23).

2.2.5.1. Sütte Somatik Hücre Sayısı

İnek sütü içerisinde çok sayıda hücre vardır. Bu hücreler nötrofiller, lenfositler, eozinofiller, makrofajlar ve epitel hücreleridir (22, 38). Sütte toplam hücre sayısının hesaplanmasında, epitelyum hücrelerinin de olması nedeniyle bu hesaplama; sütte bulunan somatik hücre sayısı (SHS) olarak ifade edilir (80). 1 ml süt içindeki toplam hücre sayısı, SHS'nın rakamsal karşılığıdır (33).

Sütteki somatik hücrelerin bileşimi fizyolojik ve patolojik durumlara göre değişkenlik gösterir (34). Laktasyonun dönemi, enfeksiyonun varlığı, enfeksiyonun latent seyri, geçmiş hastalıklar gibi etkenler SHS değişiminde etkilidir (22, 35). Yine, memedeki fizyolojik ve patolojik durumlara göre de somatik hücrelerin sayısı ve tipleri değişmektedir (22, 28).

Sağlıklı sütteki hücrelerin çoğunluğu %30–74 gibi bir oranla makrofajlar olarak tespit edilmiştir (39). Enfekte süt hücrelerini %90'dan fazla nötrofiller, az miktarda lenfosit ve epitel hücreleri oluşturmaktadır (40). Bakteriyel mastitislerde sütteki SHS birkaç saat içinde ml'de 1 milyona ulaşabildiğinden enfeksiyonun tanısında rolü büyüktür (41).

Sütte somatik hücre sayısının mastitis tanısı açısından referans değerleri çalışmalara ve ülkelere göre değişiklik göstermektedir. Duval (1997), Hamann (2002), Harmon (1994) ve İşcan (1993)'a göre laktasyondaki sağlıklı bir ineğin sütünde SHS < 100.000 hücre/ml olmalıdır (42, 43). Alaçam (1997)'a göre ise, sağlıklı sütte 50.000-200.000 somatik hücre olmalıdır (44). Avrupa'da SHS, 200.000 hücre/ml normal kabul edilmektedir (22). ABD'de tank sütündeki SHS 250.000 hücre/ml ise normal, 500.000 hücre/ml ise patolojik bir durum olduğu kabul edilmektedir (22, 45). Avrupa'da tank sütündeki 400.000 hücre/ml normal kabul edilmektedir. Türk gıda kodeksine göre ise çiğ sütteki hücre miktarı < 500.000 hücre/ml olmalıdır (41). Mastitis taramaları açısından SHS skoru önemli bir parametredir (46).

Somatik hücre sayısında, mastitis haricinde de yükselmeler olabilir. Postnatal dönemde SHS yüksek olması iki hafta süreyle fizyolojiktir ancak sağlıklı memelerde

doğumdan sonra 5. gün SHS<100.000 hücre/ml olmalıdır (47). Beslenmeyle ilgili bozukluklar ve takibinde süt verimindeki değişimler SHS sayısını arttırabilir. Östrus döneminde süt veriminin azalmasına bağlı SHS yükselebilir. Ayrıca ilk sağım ve takiben sağılan süt ve son sütün SHS arasında da farklar vardır ki; SHS, her zaman ilk sağım sütünde yüksek, takibinde düşük ve son sütte daha yüksektir (48). Mevsime göre değişiklikler de fizyolojik olarak şekillenir, kış aylarında SHS düşük iken, yaz aylarında SHS artış gösterir (36).

SHS her bir hayvanın 4 ayrı memesi için bireysel yapılabileceği gibi tank sütünden de yapılabilir. Elde edilen veriler kayıt altına alınarak, belli periyotlarda tedaviye alınması gereken, sürüden çıkarılması gereken ve mikrobiyoloji testleri yapılması gereken hayvanlar olarak ayrılıp, sürü yönetimi yapılabilir (48).

Sütte SHS tespiti; CMT gibi indirekt mikroskopi, DNA filter metod, Coulter Counter, Fossamatik gibi direkt testlerle belirlenmektedir (45). Direkt mikroskopik hücre sayım yöntemi (DMHSY) ve otomatik ölçüm yapabilen cihazlar somatik hücre sayımı için kullanılmaktadır. Ancak elektronik cihazların artışı ile DMHSY kullanımı azalmıştır. Ancak halen ihtiyaç halinde kullanılabilen güvenli bir yöntemdir.

SHS ölçümü için kullanılan elektronik yöntemler Fossamatik ve Coulter Counter gibi yöntemlerdir. Fossomatik yönteminde numuneye bir boya eklenir ve hücreler floro-optik elektronik hücre sayım tekniği ile sadece somatik hücreler sayılır. Coulter Counter ise yaklaşık 4,4 mikron (μ) çapında veya daha büyük partiküllerin sayımı için kalibre edilmiştir. Bu yöntem, bir elektrolit içinde emdirilmiş partiküllerin güçlü bir vakum altında kalibre edilmiş kapillar bir kanaldan emilmesi, güç hareket eden partiküllerin hareket hızına göre geçiş sırasında dalgalanmalar oluşması ve bu dalgalanmaların elektrotlarla güçlendirilerek sayılması prensibiyle hareket etmektedir. Fossomatik ve Coulter Counter yöntemlerinin somatik hücre sayımı yönüyle etkinliklerinin karşılaştırıldığında; Fossomatik yönteminin, Coulter Counter'dan daha iyi sonuçlar verdiği bildirilmiştir (45).

2.2.5.2. California Mastitis Test(CMT)

Subklinikmastitis tanısında, saha da pratik ve ekonomik olarak, indirekt SHS ölçümü için CMT kullanılabilir (29). CMT ayıracı içerisindeki anyonik deterjan ile sütteki somatik hücrelerin parçalanması ve serbest kalan DNA ve RNA ile jelatinöz kıvamlı bir çökelti oluşumu ile subklinikmastitis tanısı konulur (46).

CMT solüsyonu hazırlanmak için; 100 ml anyonik deterjan, 50 ml 1/30'luk bromkresol purpur ve 900 ml distile su karıştırılarak (33) ya da %2'lik alkil aril sülfat, %0,01 bromkresol purpur, 15 ml NaOH, 1000 ml distile su karıştırılarak elde edilebilir (41). Ayrıca ticari olarak hazırlanmış CMT solüsyonları da mevcuttur.

CMT ayıracı temin edilmesini takiben ön sağım sütü sağıldıktan sonra, dört bölmeli plastik CMT küreğine her bir meme lobundan birkaç ml süt sağılır ve üzerine CMT solüsyonu birkaç ml dökülür. Kürek, dairesel ve yavaş hareketlerle karıştırılarak, oluşan jelin derecesi (0), (şüpheli), (+1), (+2), (+3) olarak belirlenir (Tablo 2.1, Tablo 2.2) (47). CMT skoru ile SHS arasındaki ilişki yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir (Tablo 2.1, Tablo 2.2) (42).

Tablo 2.1. California Mastitis Test Skoru

CMT Skoru	Reaksiyonundegerlendirilmesi	SHS/ml süt
0	Süt ve test ayıracıkarişımı sıvı haldedir, jelleşme yoktur.	0-100.000
Şüpheli (iz miktar)	Karıştırıldığında kaybolan çok hafif jel oluşumu vardır.	100.000-300.000
(+1)	Hafif-orta düzeyde kalıcı jel oluşumu vardır.	300.000-900.000
(+2)	Karışım, jel oluşumu ile koyulaşır ve çalkalanınca kabın kenarına yayılır.	900.000-2.700.000
(+3)	Viskozitesi yüksektir, çalkalanınca kabın orta kısmında topaklanır ve dibine yapışır.	2.700.000-8.100.000

CMT testi, taze süt ya da en fazla 36 saat bekletilen numunelerden yapılmalıdır. Sütün soğutulmadığı, mikrobiyel üremenin önüne geçilemediği durumlarda %0,5 asit borik eklenir. Formaldehit gibi koruyucular katılmamalı ve numuneler dondurulmamalıdır(23).

Diğer bir tanı yöntemi olan Wisconsin Mastitis Testi'nde; test için, kapaklı özel plastik tüp içine ikişer ml süt ve CMT solüsyonu koyulur. Tüp tersine çevrilip kapaktan sütün akma süresi kayıt altına alınır. On beş saniye üzerinde akan sütlerde jel oluşumu yani mastitis olduğu tespit edilmiş olur (36).

Sütte hücre sayısının artışının tespitine yönelik testlerden White Side Testinde; cam bir test kabına beş damla soğuk süt konur. Üzerine bir damla %4'lük NaOH eklenir. Enfekte sütte, nükleik asit NaOH ile birleşince Na^+ tuzu kitle meydana gelerek süt yağı ile birleşerek çöküntü oluşur (29).

Brabant Mastitis Testinde, birkaç mm eninde iki cm uzunluğunda kapillar bir tüpün üst tarafına bir huni yerleştirilerek sütün kapillar tüpten akış hızı kaydedilir. Tüpten beş saniyeden az zamanda boşalan sütte ortalama 250.000 hücre/ml, beş saniyede tüpten boşalan sütte ortalama 800.000 hücre/ml, beş-on saniyeden fazla zamanda tüpten boşalan sütte ortalama 1.000.000 hücre/ml bulunduğu tespit edilmiştir (42).

2.2.5.3. Sütün Elektriksel İletkenliği

Subklinik mastitislerde sütteki meme kaynaklı bileşenler denilen kazein, laktoz ve yağ içeriğinde azalma olurken, kan kaynaklı serum albumini ve Ig gibi moleküllerin miktarında ise artış olmaktadır. Enfeksiyon olduğu durumlarda nötrofillerin memeye geçişi, fagositozis ve sekretör hücrelerin lize olması esnasında N-asetil-B-D glukozaminidaz gibi enzimler açığa çıkararak, sütteki miktarlarında artış olur. Geçirgenliğin arttığı meme dokusunda iyon değişimleri olur. Sütte Na^+ ve Cl^- miktarı artarken, K^+ oranı düşer ve elektrik iletkenliği artar (39)

Küplülü ve ark.'nın (49) yaptığı çalışmaya göre CMT sonuçları ve sütün elektiriksel iletkenliği (Eİ) sonuçları arasında paralellik varken, Timurkan (50) araştırmasına göre CMT ve Eİ sonuçlarının uyumsuz olduğu tespit edilmiştir ve tek başına Eİ sonuçlarının subklinik mastitis teşhisinde kullanılmasının şüpheli olduğu ifade edilmiştir.

Elektrik iletkenliği ölçümü "Milk Checker" isimli cihazla ve süt analiz cihazlarıyla yapılabilir. Mastitis haricinde elektrik iletkenliğini çok sayıda faktör değiştirebilir. Sütün bileşimi, sıcaklığı, ineğin ırkı, mevsim, bakteriyel flora, laktasyon dönemi, sağım sıklığı ve numunelerin alındığı sağım aşaması elektrik iletkenliğini

etkileyebilir. Bu sebepler elektrik iletkenliğini mastitis tanısı için güvenilir olmaktan çıkarır (22).

Sütün elektriksel iletkenliği için, uluslararası belirlemelere göre, 5,4- 5,6 milisiemens/cm'den büyük değerler (mS/cm) meme enfeksiyonu şüpheli olarak kabul edilmektedir. Atasever ve Erdem (28)'e göre ise sağlıklı sütünler için elektrik iletkenliği değeri; 4,0 - 5,5 mS/cm'tir.



şekil 2.1. Elektronik mastitis dedektorü

2.2.5.4. Sütün pH Değeri

Meme enfeksiyonlarında laktoz üretimi azalır ve kandan süte alkali tuzlar geçer. Bu nedenle, enfeksiyon vakalarında sütte pH yükselmektedir (47).

Sağlıklı bir memeden sağılan sütün pH'sı hafif asidiktir ve 6,4-6,8 aralığındadır. Bu değerin değişmesi mastitis tanısı için belirteçtir. Genellikle mastitis olgularında, süt pH'sı yükselse de bazen patojenin özel durumuna göre düşüş olabilir. Örneğin *Streptococcus agalactiae* mastitislerinde sütteki laktoz, laktik aside dönüştürüldüğünden süt pH'sı düşer (22).

2.2.5.5. Sütün Bakteriyolojik Muayenesi

Mastitisin birincil nedeni, bakteriyel enfeksiyonlardır (51). Bakteriyel mastitislerde, SHS birkaç saat içinde ml'de bir milyona kadar hızlı bir şekilde artabilmektedir. Meme loblarının enfekte veya nonenfekte olarak değerlendirilmesinde, yalnızca SHS'na göre yorum yapılmasının eksik olacağı bildirilmektedir. Enfeksiyonun tam teşhisi için sütte etken izolasyonunun yapılması gereklidir. Enfekte olmayan meme loblarında, SHS sütte 200.000 / ml'nin altında olmaktadır (51), SHS 100.000 / ml'nin altında olan sütlerin %20'sinde meme loblarının enfekte olduğunu bildirmişlerdir. Dohoo ve Meek (48) ise, yaklaşık 228.000 hücre / ml'lik hücre eşiğinin, enfekte olan ineklerin sınıflandırılmasında %85,5 oranında doğru sonuç verdiğini, bu nedenle gerçekte bir meme lobunun enfekte olup olmadığının ayrılma eşiğinin 250.000 hücre / ml süt olması gerektiğini belirtmişlerdir.

Mastitislerin teşhisinde SHS ile mikrobiyolojik muayene birlikte değerlendirildiğinde ortaya çıkan sonuçlar tabloda özetlenmiştir (Tablo 2.2) (46).

Tablo 2.2. Mikrobiyoloji ile somatik hücre sayısı sonuçlarının değerlendirilmesi

SHS (Hücre/ml süt)	Meme Patojenleri	
	Etken Belli Değil	Etken Belli
<100.000	Normal süt	Latent enfeksiyon
>100.000	Spesifik olmayan mastitis	Spesifik mastitis

Çalışmalar SHS ve mikrobiyolojik muayene arasındaki ilişkileri genellikle aynı şekilde yorumlamış ve kabul etmiştir. Zecconi ve Piccinini (2002), SHS 100.000 / ml ve bakteriyel üreme olmayan meme loblarını sağlıklı kabul ederken, SHS<100.000/ml ve bakteriyel pozitif meme loblarını latent enfeksiyon olarak belirlemiştir. Atasever ve Erdem (28) düşük SHS ve mikrobiyolojik üremenin bir arada olduğu vakaları latent enfeksiyon olarak nitelendirmiştir.

Mikrobiyolojik muayene için süt alınmadan önce meme yıkanmalı, kurulanmalı ve alkolle fiks edildikten sonra steril bir kaba meme başı, tüpe değdirilmeden sağılmalıdır. Saprofit bakterilerin sütü kontamine etmemesi için ilk sağım sütü dışarı sağılmalıdır. Muayene için süt örnekleri steril plastik veya cam tüplere alınabilir.



Şekil 2.2. SHS'in cihazı

2.2.6. PCR Tabanlı Yöntemler

Veteriner teşhisinde moleküler tekniklerin kullanılması yeni bir strateji değildir. Bu yöntemler patojeni daha yüksek hassasiyet ve özgüllükle tespit etme potansiyeline sahiptir. PCR teknolojisinin ortaya çıkışı, multipleks PCR, gerçek zamanlı PCR ve LAMP gibi çeşitli uzantılarıyla birlikte tanının hızını ve duyarlılığını geliştirmiştir. Bu DNA bazlı teşhis yöntemleri süt çiftliklerinin daha iyi yönetilmesine büyük ölçüde yardımcı olmuştur. Nükleik asit bazlı saptama, çeşitli patojenlerin genomik sekanslarına dayanır (15).

Bazı mastitis patojenleri bakteri kültüründe büyümez veya yavaş büyüme hızlarından dolayı tespit edilmesi zordur. PCR analizleri, patojeni yüksek özgüllükle hızlı bir şekilde tespit ederek bu tür sorunlarla başa çıkmada oldukça popülerdir (52).

PCR elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometresi, süt örneklerinden sığır mastitis patojenleri için bir teşhis aracı olarak kullanılmıştır. Sadece bakteri türlerini tespit etmekle kalmaz, mayalar, küfler, parazitler ve virüsleride tespit edebilir. Yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahiptir, ancak rutin bir teşhis aracı olarak kullanımı oldukça maliyetlidir (34).

DNA dizilimi genellikle bakterilerin tanımlanması için tercih edilir. rRNA sekanslaması, büyük ölçüde yakından ilişkili bakteri türlerinin tanımlanması için kullanılır. Mastit patojenlerinin saptanması için gerçek zamanlı PCR ile birleştirilmiştir. Bu yöntem aynı zamanda geleneksel tanı yöntemlerine bir alternatif olabilir ve düşük maliyetli ve hızlı sonuçlar da dahil olmak üzere bir dizi fayda sağlayabilir (40).

Daha az yaygın, ölü, yavaş büyüyen ve fenotipik olarak benzersiz patojenlerin rutin teşhis yöntemleri ile tespit edilmesi her zaman zordur. PCR ve DNA dizilimi, bulaşıcı hastalıklar için erken tedaviye ve daha iyi kontrol stratejilerine yol açabilecek olumlu sonuçlar sağlamıştır. Filtre kağıdı diskleri üzerinde toplanan örnekler kullanılarak mastitis patojenlerinin PCR ile hızlı bir şekilde tanımlanması için çeşitli girişimlerde bulunulmuştur. Bu tür yöntemlerle ilişkili birçok avantajı vardır. *Streptococcus agalactiae* bu yöntemle tespit edilmiştir ve örnekler 4 hafta boyunca oda sıcaklığında saklanabileceği belirlenmiştir (15).

PCR daha hassas ve hızlıdır. Ayrıca çeşitli mastitis patojenlerinin saptanması için bakteriyel kültür yöntemine kıyasla güvenilirlerdir. Tek bir testte dört yaygın mastitis

patojeninin saptanması için bir multipleks PCR geliştirilmiştir. Multiplex PCR testi, kolaylık, duyarlılık ve özgüllük açısından geleneksel tekniklere göre birçok avantaja sahiptir. Tek bir reaksiyonda dokuz önemli mastit patojeninin saptanması için yeni geliştirilen yeni bir multipleks PCR testi bildirilmiştir(53). Sonuçlar süt numuneleri üzerinde değerlendirilmiş. Bakteriyel kültür ve 16S rRNA sekanslaması ile karşılaştırılmış ve bu testin en iyisi olduğu belirtilmiştir (44).

Floresan in situ hibridizasyon (FISH), mastitis patojenlerinin saptanması için geliştirilen kültüre bağımlı yöntemdir. Daha kısa zamanda sonuç alınır ve güvenilirdir, ancak sonuçları elde etmek için bir ön işlem adımı gerektirdiğinden dolayı yaygın olarak kullanım alanı bulamamıştır ve yüksek tespit limiti vardır (15).

Çeşitli çalışmalar da, yaygın mastitis patojenlerinin saptamak için multipleks PCR testleri geliştirilmiştir. Jackson ve ark. (8). *Enterococcus*'ların tespiti için geliştirdikleri türe özgü multipleks PCR'ın, Hedef türlerin tanımlanması için mevcut diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında yüksek bir uyum yüzdesi gösterdiğini belirtmişlerdir. Sığır mastitis patojenlerinin tespiti için hızlı, doğru, spesifik ve hassas olan ve kolayca uygulanabilen altın standart bir teste ihtiyaç vardır. Çeşitli çalışmalar, majör mastitis patojenlerinin saptanması için gerçek zamanlı bir multipleks PCR testinin geliştirilmesine odaklanılmıştır (40).

Döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP), ilk olarak Notomi ve ark. (2000) tarafından kullanılmıştır. Son birkaç yılda, teşhis alanında çok popüler olan bu yöntem, birkaç değişiklikle saha testi olarak kullanılabilme potansiyeline sahip oldukça hızlı, ekonomik, hassas ve spesifik bir yöntemdir (45). Bst polimeraz varlığında izotermal koşullarda DNA'nın aktivitesine dayanır. Sonuçlar agaroz jel üzerinde görüntülendiğinde merdiven benzeri bir desen veren çeşitli uzunluklarda DNA üretilir (41). Sonuçlar, SYBR yeşili gibi bir boya eklenerek doğrudan görselleştirilebilir: bir LAMP yan ürünü olan magnezyum pirofosfatın varlığından dolayı renkte bir değişiklik, numunenin pozitif olduğunu gösterir(46).

2.2.7. Nanoparçacık Bazlı Test

Nanoteknolojiye dayalı bulaşıcı hastalıkların teşhisine yönelik çalışmalar son yıllarda dikkat çekmektedir. Nanoteknoloji tabanlı biyosensörler, patojenlerin hızlı ve doğru bir şekilde tespit edilmesini sağlayabilirler (50). Nanopartiküller, proteomik ile birlikte, sığır mastitis patojenlerinin hızlı teşhisi için gelecekte kullanılabilecek yöntemlerden biri olma potansiyeline sahiptir .

Sütteki plazmin seviyelerini tespit etmek için manyetik nanoparçacık bazlı bir kalorimetrik analiz geliştirilmiştir. İlgili patojenden bağımsız olarak salınan ısıya dayanıklı bir endojen serin proteazdır. Bu yeni geliştirilen biyosensör, mastitis durumunu yüksek hassasiyetle tespit etme yeteneğine sahiptir ve ilk tanı testi olarak kullanılma potansiyeline sahiptir (8).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Süt Numunesi Toplama

Bu çalışmada Adıyaman bölgesinde yüksek ateş, meme şişmesi ve pıhtılaşmış süt belirtileri olan mastitisli süt ineklerinden alınan toplam 83 adet süt örneği mikrobiyolojik olarak incelenmiştir. Süt örnekleri National Mastitis Council (NMC) tarafından bildirilen şartlarda aseptik şekilde toplanmıştır (54). Sütler alınmadan önce meme başı %70'lik etil alkol ile silinerek, meme başından fişkırtılan ilk süt atıldıktan sonra, süt örnekleri steril falkon şişelerine alınarak soğuk zincirde, Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına en kısa sürede ulaştırılmıştır. Laboratuvara hemen getirilemeyecek örnekler buzdolabında saklanmıştır.

3.2. Elektriksel İletkenlik Testi

İneklerin meme lobları temizlendikten sonra elektriksel iletkenlik cihazı kullanıldı. Sütün elektriksel iletkenliği için, uluslararası belirlemelere göre, 5,4- 5,6 milisiemens/cm'den büyük değerler (mS/cm) meme enfeksiyonu şüpheli olarak kabul edilmektedir. Atasever ve Erdem (28)'e göre ise sağlıklı sütler için elektrik iletkenliği değeri; 4,0 - 5,5 mS/cm'tir. 6.0 mS/cm'nin üzerindeki değerler, meme bezlerinde patolojik oluşumları akla getirmekte.

3.3. Çalışmada kullanılan Besiyeri

3.3.1. Kanlı Agar (Columbia Blood Agar Base, CMO331. Oxoid)

Kanlı agar hazırlamak amacıyla koyun kanı kullanıldı. Kan alma işlemi aseptik şartlarda gerçekleştirildi. Kan alınacak hayvanın vena jugularis'in bulunduğu bölge traşlandıktan sonra bölge %70'lik alkol ile silindi ve alkolün uçması beklendikten sonra kan %10 oranında (50 ml alınacaksa 5 ml sitrat solüsyonu) steril sodyum sitrat içeren 50 ml'lik enjektörlere alındı.

Columbia Blood Agar Base

Special peptone	23.0
Sodiumchloride	5.0
Agar	10.0

Hazırlanışı: Hazır besiyerinden 39 g alınarak 1 litre distile suda çözdürüldü. Besiyerinin pH değeri kontrol edilerek (7.3 ± 0.2 , 25 °C’de) ayarlandı ve manyetik karıştırıcıda homojen olacak şekilde eritildi. Otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edildikten sonra 50 °C’ye kadar soğutuldu ve üzerine koyun kanı eklendi. Besi yeri steril petrilere dökülerek 4°C’de muhafaza edildi.

3.3.2. MacConkey Agar (Merck 1.05465).

Bu çalışmada MacConkey agar Gram pozitif bakterileri inhibe etmek ve *enterobakteri* ’leri üremesini desteklemek amacıyla kullanıldı.

Peptone from casein	17,0 g/L
Peptone from meat	3,0 g/L
NaCl.....	5,0 g/L
Lactose.....	10,0 g/L
Bile salt mixture	1,5 g/L
Neutral red	0,03 g/L
Crystal violet.....	0,001 g/L
Agar-agar	13,5 g/L

Besiyeri 50 g tartıldı üzerine 1 litre distile su eklendi, erimesi amacıyla manyetik karıştırıcıda karıştırılarak alttan ısıtıldı. Karışımın pH’sı $7,2 \pm 0,2$ ayarlanarak otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edildi. Otoklav sonrasında 45-50°C’ye soğutulup petrilere döküldü.

3.3.3. Edwards Medium (Modified, CM0027, Oxoid).

Streptococcus etkenlerinin hızlı izolasyonunda kullanılan seçici bir besiyeridir.

Peptic digest of animal tissue	10 g
Beef extract	10 g
Aesculin	1 g
Sodium chloride	5 g
Crystal violet	0.0013 g
Thallous sulphate.....	0.330 g
Agar	15 g
pH (at 25°C)	7.4±0.2

1 litre Distile suya 41.33 gram besiyeri eklendi. Besiyeri manyetik karıştırıcıda homojenize edildikten sonra otoklavda 115°C' de 20 dakika sterilize edildi. Besiyeri 50° C'ye kadar soğuduğunda, steril olarak % 5 koyun kanı eklenerek karıştırıldı. Hazırlanan besiyeri steril petri plakalarına döküldü (Şekil 3.1).

3.3.4. Columbia CNA Agar (CNA)

Bu besiyeri kanlı agar gibi hazırlandıktan sonra besiyerine Modified CNA Selective supplementi eklendi. Her 2.5 litre Columbia Agar' için 1 vial supplement kullanıldı. Besiyerine eklenmeden önce 1 vial supplement steril distile suda eritildi. Besiyeri 45-50 °C sıcaklığına geldiğinde besiyerine katıldı.

Modified CNA Selective supplementi (OXOID, SR176)	
Nalidixicacid	45.0mg
Colistinsulphate	67.5mg

3.3.5. Mueller Hinton Agar (Merck, 70191)

Antibiyogram testinin yapılmasında kullanıldı.

Agar.....	17.0 g/L
Beef infusion solids.....	2.0 g/L

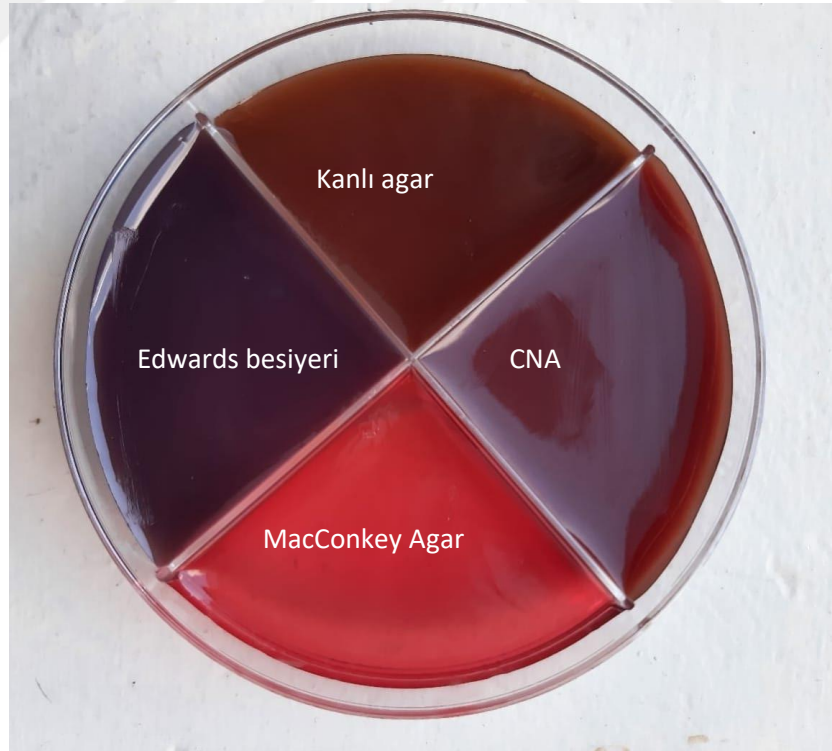
Casein hydrolysate..... 17.5 g/L

Starch..... 1.5 g/L

Toz halinde bulunan besiyerinden 38 g, 1 litre distile su içinde çözündürülerek, 121°'de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra steril petrilere dökülerek hazırlandı.

3.4. Besiyerlerine Ekim

MacConkeyAgar ve %5-7 oranında koyun kanı katılmış CNA, Edwards ve Kanlı agar, besiyerleri 4 gözlü petrilere dökülerek hazırlandı (Şekil 3.1). Laboratuvara getirilen süt örneklerin vorteks ile homojenize edildikten sonra öze ile hazırlanan besiyerine ekimleri yapıldı. Ekim yapılan besiyerleri 37°C' de aerobik ortamda 24-48 saat süreyle inkübe edildi (55). Kanlı agarda saf olarak üreyen etkenler, Gram yöntemi ile boyanarak standart yöntemlere göre identifiye edildi. Selektif besiyerlerinde üreyen koloniler kanlı agar temel alınarak değerlendirildi.



Şekil 3.1. Ekimler için hazırlanan besiyeri.

3.4.1. *E. coli* İzolasyon

Kanlı Agar ve MacConkey Agarda 37 °C'de 18-24 saate üreyen koloniler makroskobik ve mikroskobik olarak incelendi ve standart yöntemlere göre identifiye edildi.

3.4.2. *Streptococcus* İzolasyonu

% 7 koyun kanlı agar ve % 7 koyun kanı ile zenginleştirilmiş Edward's besiyeri ve CNA da, 24-48 saate 37 C'de üreyen koloniler incelendi. Üreyen kolonilerden 1-3 mm çapında şeffaf, parlak ve S tipi koloniler seçilerek gram boyama ile boyandı. Gram boyama ve katalaz gibi biyokimyasal testler yapılarak identifikasyonları standart yöntemlere göre yapıldı. Edwards besiyerinde eskulini pozitif olan koloniler *S. uberis* olarak belirlendi.

3.4.3. *Staphylococcus* izolasyonu

% 7 koyun kanlı agar ve CNA da üreyen koloniler *Staphylococcus spp.* açısından incelendi. Şüpheli koloniler standart yöntemlere göre *Staphylococcus aureus* ve KNS olarak identifiye edildi.

3.5. Kullanılan Testler

3.5.1. Gram Boyama

İdentifikasyon amacıyla üreyen kolonilerden Gram boyama yapıldı. Bu amaçla şüpheli kolonilerden FTS ile lam üzerinde karıştırılarak preparat hazırlandı ve kurutuldu. sonra alevden geçirilerek tespit edildi. Gram boyama için ilk olarak kristal viyole ile 1 dk boyandı, sonra boya dökülerek yıkandı ve lam üzerine lügol çözeltisi damlatılarak 1 dakika beklendi. Lam %96'lık etil alkole 10-15 saniye süreyle dekolere edildi, sonra saf su ile yıkandı. Son olarak lam üzerine safranin damlatılarak 30 saniye süreyle boyandı ve preparat saf su ile yıkanarak kurulandıktan sonra mikroskopta incelendi (Winn ve ark 2006).

3.5.2. Katalaz Testi

Staphylococcus ve *Streptococcus* türlerini ayırımında katalaz testi kullanıldı. Test için besiyerinde üreyen kolonilerden steril öze ile alınıp temiz bir lam üzerine aktarıldıktan sonra üzerine 1-2 damla %3'lük H_2O_2 damlatıldı. Katalaz enzimi oluşturan bakteriler H_2O_2 'i su ve oksijene ayrıştırırlar. Ortamdaki oksijen çıkışı kabarcık oluşumu ile belirlendiğinden, test sonucu kabarcıklar meydana geldiğinde katalaz (+), kabarcıklar oluşmadığında ise katalaz (-) olarak değerlendirildi. *Streptococcus*'lar katalaz (-), *Staphylococcus* ise (+)'dir (Winn ve ark 2006).

3.5.3. Koagulaz testi

S. aureus ve KNS suşlarını ayırmak için koagulaz testi yapıldı. Bu amaçla temiz bir lam üzerine bir damla steril fizyolojik su konularak, agardan bir-iki koloni alınarak sıvı ile bir suspansiyon yapıldı. Sonra bunun üzerine bir damla steril taze plazma konularak, homojenize edildi. Koagülasyonun görülmesi testin pozitif olduğunu gösterdi.

3.5.4. Antibiyotik Duyarlılık Testi

Elde edilen izolatları Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI)'nin önerdiği şekilde disk difüzyon yöntemine göre antibiyotik duyarlılık testi yapıldı. Bu amaçla üreyen bakteri kültürü %0.9'luk NaCl içine konularak 0,5 McFarland (1×10^8 kob/ml) bulanıklığına eşit olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan bakteri süspansiyonları steril swap ile Mueller Hinton Agar yüzeyine yayıldı. Besiyeri kuruduktan sonra antibiyotik diskleri agar yüzeyi ile temas edecek şekilde petrilere yerleştirildi. Daha sonra 37°C'de 18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her bir izolat için disk etrafındaki inhibisyon zon çapları ölçülerek değerlendirme, bildirilen kriterlere göre yapıldı (CLSI, 2017). Bu çalışmada, NBT70C (Neomisin – Basitrasin - Tetrasiklin), CPR30C (Cefapirin, MASTDISCS®). Amoxicillin-clavulanic asit (30µg), Penicillin (10 IU), Tetracycline (30µg), Clindamycin (2µg), Kanamycin (30µg) ve Cephalothin (30µg), (Oxoid®) antibiyotik diskleri kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. İzole Edilen Bakterilere İlişkin Bulgular

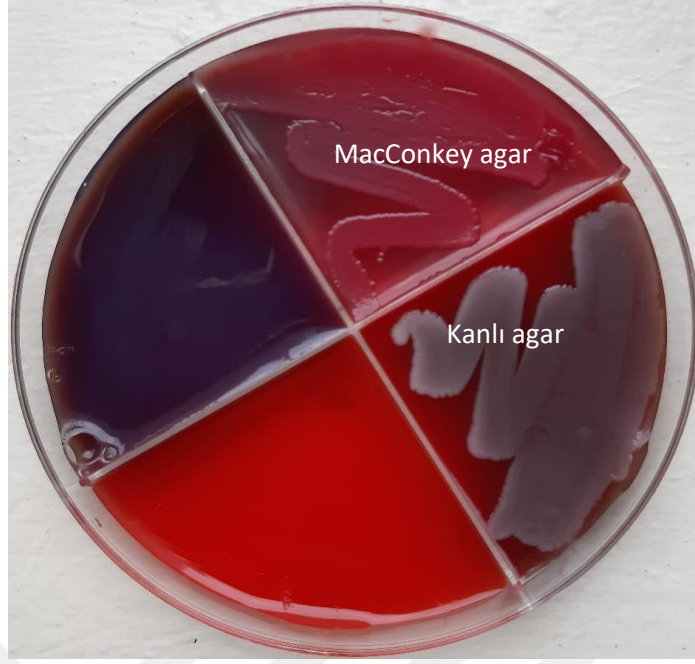
Bu araştırmada Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına getirilen klinik mastitisli sığırlara ait toplam 83 adet süt numunesi incelenmiştir. Süt örneklerinin 75 (%90,7)'inden bakteri izolasyon ve identifikasyonu yapılmıştır. Araştırmada süt numunelerinin üç tanesinde iki farklı patojen türünün ürediği belirlenmiştir. Araştırmada 8 (%9,3) örnekte ise üreme olmadığı belirlenmiştir.

Çalışma sonucunda 75 adet mastitisli süt numunelerinden izole edilen 78 bakterinin 14 (%17,9)'ü *S. aureus*, 12 (%15,4)'si *Streptococcus uberis*, 36 (%46,2)'si *Streptococcus spp.*, 6 (%7,7)'si *E. coli*, 5 (%6,4)'i *Enterococcus spp.*, 3 (%3,8)'ü Maya ve 2 (%2,6)'si de CNS olarak identifiye edildi (Şekil 4.1-4.2-4.3).

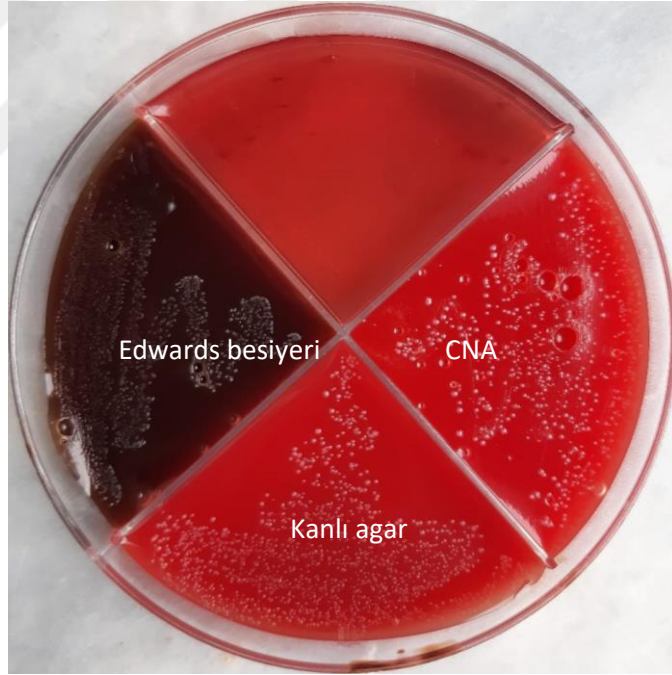
Araştırma kapsamında yapılan mikrobiyolojik analiz sonucunda belirlenen bakteri türleri ve sayısına ilişkin veriler Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Mastitisli sığırlardan elde edilen sütlerde izole edilen bakteri türü ve sayısına ilişkin veriler

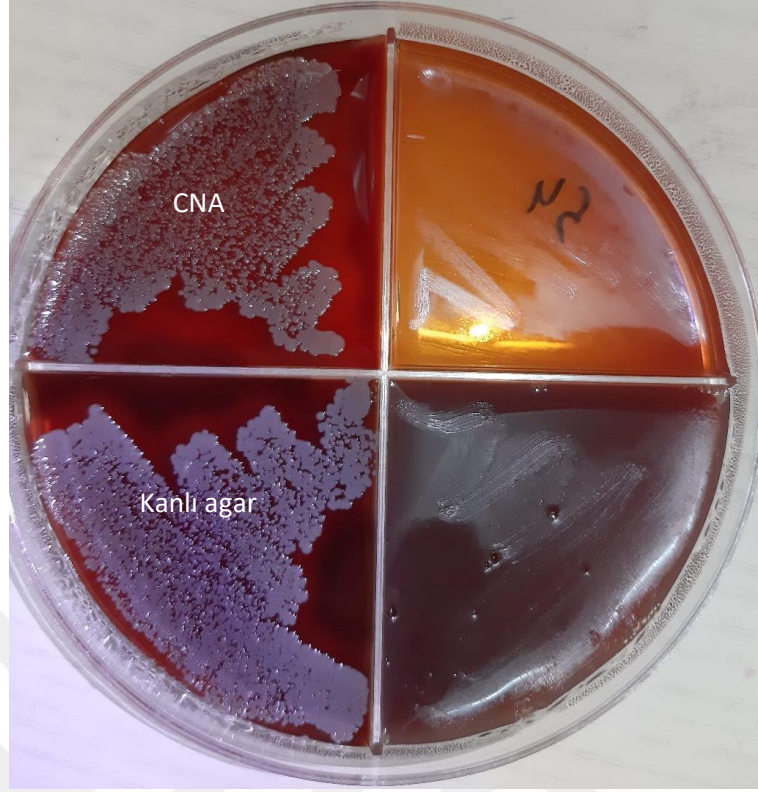
Türler	Sayısı	Yüzde
<i>S. aureus</i>	14	17,9
<i>Streptococcus uberis</i>	12	15,4
<i>Streptococcus spp</i>	36	46,2
<i>E. coli</i>	6	7,7
<i>Enterococcus spp</i>	5	6,4
CNS (koagulaz Negatif <i>Staphylococcus</i>)	2	2,6
Maya	3	3,8
TOPLAM	78	100



Şekil 4.1. MacConkey ve Kanlı agarda üremiş *E. coli*.



Şekil 4.2. Edwards besiyeri, Kanlı agar ve CNA da üremiş *Streptococcus spp.*



Şekil 4.3. Kanlı agar ve CNA da üremiş *Staphylococcus aureus*.

Tablo 4.2. Süt örneklerinin elektrik iletkenliğine ilişkin bulgular

Elektrik İletkenliği Değeri	N	%
6	9	10,8
7	25	30,1
8	40	48,2
9	9	10,8

N: numune

Araştırmada süt örneklerinin elektrik iletkenliğinin 6 ile 9 mS/cm aralığında (28) olduğu için mastitis tanısı konulmuştur.

Tablo 4.3. Sütlerden izole edilen bakteri türü ve sayısı

	K.A	MCC	E.M	CNA
<i>S. aureus</i>	14	-	-	14
<i>Streptococcus</i>	48	-	43	48
<i>E. coli</i>	6	6	-	-
<i>Enterococcus</i>	5	3	3	3
Maya	3	1	1	3
CNS	2	-	-	2

Araştırmada izole edilen *Staphylococcus aureus* türlerinin %100,0 (14)'ü kanlı agar ve CNA; *Streptococcus* türlerinin %100,0 (48)'ü kanlı agar ve CNA, %89,6 (43)'sı edwards medium; *E. coli* türlerinin %100'ü kanlı agar ve MacConkey agar; *Enterococcus* türlerinin %100,0 (5)'ü kanlı agar, ve MacConkey agar, %60,0 (3)'ü Edwards besiyeri ve CNA, %60,0 (3)'ü maya türlerinin %100,0 (3)'ü kanlı agar, %33,3 (1)'ü MacConkey Agar, %33,3'ü edwards medium ve %100,0'ü CNA ve CNS türlerinin %100,0 (2)'ü kanlı agar ve CNA besi yerlerinde tespit edilmiştir.

4.2. Antibiyotik Duyarlılık Testin Bulguları

Araştırmamızda identifiye edilen *S. aureus*, *Streptococcus* ve *E. coli* suşlarının disk difüzyon tekniği ile antibiyotik duyarlılıkları incelenmiştir. İzole edilen etkenlerin amoksisilin-klavulanik asit, Tetracycline, Kanamycin, Penisilin, Cefapirin, Clindamycin, Cephalothin ve Neomycin-Basitracin-Tetracycline antibiyotiklerine duyarlılık sonuçları Tablo 4.4'ta gösterilmiştir. İzole ve identifiye edilen bakteri türlerinden *Enterococcus*'ların tetracycline dirençli olduğu, *E. coli*'lerde Amoxicillin-clavulanic asit, Clindamycin ve pencilin direnci görülmesine karşın *Streptococcus spp* ve *S. aureus* suşlarında çeşitli oranlarda antibiyotiklere direnç belirlenmiştir.

Tablo 4.4. Araştırmada izole ve identifiye edilen bakteri türlerinin antibiyotik direncine ilişkin bulgular

Antibiyotikler	<i>Staphylococcus aureus</i> (n:12)			<i>Streptococcus spp</i> (n: 48)			<i>E. coli</i> (n:7)			<i>Enterococcus</i> (n:5)			CNS (n:2)		
	S (%)	I (%)	R (%)	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Cephaprime	10 (83,4)	-	2 (16,6)	27 (56,3)	9 (18,8)	12 (24,9)	3 (42,8)	2 (28,6)	2 (28,6)	-	2 (40,0)	3 (60,0)	1 (50,0)	-	1 (50,0)
Kanamycin	9 (75,0)	2 (16,7)	1 (8,3)	15 (31,3)	2 (4,2)	31 (64,5)	3 (42,8)	-	4 (57,2)	1 (20,0)	1 (20,0)	3 (60,0)	1 (50,0)	-	1 (50,0)
Clindamycin	10 (83,4)	1 (8,3)	1 (8,3)	20 (41,7)	3 (6,3)	25 (52,0)	-	-	7 (100,0)	2 (40,0)	-	3 (60,0)	2 (100,0)	-	-
Amoxicillin-clavulanic asit	7 (58,3)	2 (16,7)	3 (25,0)	26 (54,2)	6 (12,5)	16 (33,3)	-	-	7 (100,0)	3 (60,0)	-	2 (40,0)	1 (50,0)	-	1 (50,0)
Cephalothin	6 (50,0)	2 (16,7)	4 (33,3)	13 (27,1)	3 (6,3)	32 (66,6)	2 (28,6)	2 (28,6)	3 (42,8)	-	2 (40,0)	3 (60,0)	-	-	2 (100,0)
Pencilin	8 (66,7)	-	4 (33,3)	30 (62,5)	-	18 (37,5)	-	-	7 (100,0)	2 (40,0)	-	3 (60,0)	1 (50,0)	-	1 (50,0)
NBT70	12 (100,0)	-	-	44 (91,6)	1 (2,1)	3 (6,3)	3 (42,8)	2 (28,6)	2 (28,6)	5 (100,0)	-	-	1 (50,0)	-	1 (50,0)
Tetracycline	6 (50,0)	2 (16,7)	4 (33,3)	18 (37,5)	10 (20,8)	20 (41,7)	3 (42,8)	2 (28,6)	2 (28,6)	-	-	5 (100,0)	1 (50,0)	-	1 (50,0)

Tablo 4.4. incelendiğinde araştırmada izole ve identifiye edilen bakteri türlerinin antibiyotik türlerine karşı duyarlı (S), orta duyarlı (I) ve dirençli (R) oldukları belirlenmiştir.



Şekil 4.4. Disk diffuzyon testinde görülen zonlar.

5. TARTIŞMA

Süt ve süt ürünlerinin sağlık ve insan beslenmesi üzerindeki olumlu etkilerine yönelik çalışmaların sayısındaki artışa bağlı olarak söz konusu ürünlere olan ilgi artmakta ve uzmanların süt ve süt ürünlerinin sağladığı yararlarla ilişkin görüşleri bu ürünlerin kullanımının gelecek dönemlerde daha da fazla artabileceğini göstermektedir.

Sağlıklı beslenme açısından temel gıda ürünlerinden biri olan sütün, söz konusu olumlu etkileri gösterebilmeleri için, süt ve süt ürünlerinin sağlıklı hayvanlardan elde edilmesi büyük önem taşımaktadır. Meme dokusunda birtakım fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkiler sonucunda veya süt akımını engelleyen birtakım etkiler sonucunda mastitis oluşumu gözlenebilmektedir (60). Hem klinik hem de subklinik mastitis, süt örneklerinde önemli düzeyde farklılıkların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (60, 61). *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *E. coli* gibi bakteriyel patojenler süt sığırlarında mastitis oluşumuna neden olmaktadır. Bu araştırmada 83 adet klinik mastitis bulgusuna sahip inekten alınan süt numuneleri incelenmiştir.

Literatürde yer alan araştırmalarda subklinik mastitis (56-59) ve klinik mastitis (64-67) vakalarında patojenlerin türü ve sayısına ilişkin farklı sonuçlar yer almaktadır. Bu araştırmada mastitisli ineklerden alınan süt numuneleri mikrobiyolojik açıdan analiz edilmiş ve örneklerin %92,8'inde bakteri izolasyonu ve identifikasyonu yapılırken, %7,2'sinde ise üreme olmadığı gözlenmiştir. Çokal ve Konuş (62) çalışmalarında Bandırma'daki mastitisli süt sığırlarından aldıkları numunelerin mikrobiyolojik analizleri sonucunda %75'inde aerobik bakteri izole etmişlerdir. Benzer şekilde Fox (63), ilk doğumunu yapan mastitisli düvelerle yaptığı çalışmada, mastitis etkenlerinin dağılımını incelemiş ve %43-87,7 arasında farklı oranlarda etken tespit ettiklerini ifade etmişlerdir. Özdemir (64) klinik mastitisli inek sütlerinden *Staphylococcus* türlerini izole ve identifiye etmeyi amaçladığı araştırmasında klinik mastitisli ineklerden aldığı 448 süt örneğini incelemiş ve örneklerin %65,2'sinde bakteri izole etmiştir. Arda ve İstanbulluoğlu (65) Türkiye'nin farklı bölgelerinde mastislere yol açan mikroaerofilik, aerobik ve anaerobik bakterileri belirlemeyi amaçladıkları çalışmada mastitis vakalarının %50,3'ünde aerobik bakteri izole ve identifiye etmişlerdir. Araştırmada ulaşılan bu bulgunun literatürde yer alan çalışmalardaki bulgularla benzerlik gösterdiği söylenebilir.

Ayrıca araştırmada, örneklerin % 7.2'sinde üreme saptanamamıştır. Üreme görülmemesinin antibiyotik kullanımından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu araştırmada kültür pozitif çıkan örneklerin % 17,9'ünde *Staphylococcus aureus*, %61,6'sinde *Streptococcus spp.* %7,7'sinde *E. coli*, %6,4'ünde *Enterococcus spp.* %2,6'sında KNS (koagülaz negatif *Staphylococcus*) ve %3,8'inde de maya izolasyonu ve identifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Persson (58), 226 farklı çiftlikten aldığı 583 meme lobunu, subklinik mastitis açısından incelemiş ve araştırma sonucunda bakteri pozitif olan örneklerin %31'inde *Staphylococcus aureus*, %27'sinde CNS, %15'inde *Streptococcus dysgalactiae*, %14'ünde *Streptococcus uberis*, %4,8'inde *E. coli* ve %3,1'inde de *Streptococcus spp.* izole etmiştir. Barrett vd. (56) İrlanda'da 15 farklı çiftlikten temin ettikleri toplam 285 sığır süt örneklerini mikrobiyolojik açıdan incelemişlerdir. Araştırma sonucunda kültür pozitif numunelerin %21'inde *Staphylococcus aureus*, %19'unda *Streptococcus uberis*, %9'unda CNS ve %3'ünde de koliform bakteri izole edildiği belirlenmiştir. Çokal ve Konuş (62) çalışmalarında mikrobiyolojik açıdan inceledikleri mastitisli sığırlardan aldıkları süt örneklerinin %75'inde aerobik bakteri üremesi gözlediklerini ve süt örneklerinin %41'inde *Staphylococcus aureus*, %17'sinde CNS, %12'sinde *Enterobacter aerogenes*, %9,4'ünde *E. coli*, %8,5'inde *Streptococcus spp.* %6,8'inde *Klebsiella pneumonia*, %5,1'inde *Citrobacter spp* ve %2,6'sında da *Bacillus spp.* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Arda ve İstanbulluoğlu (65) Türkiye'nin farklı bölgelerinde mastitislere yol açan mikroaerofilik, aerobik ve anaerobik bakterileri belirlemeyi amaçladıkları çalışmada mastitis vakalarının %50,3'ünün *Staphylococcus aureus*, %11,4'ünün *S. epidermidis*, %8,7'sinin *Streptococcus agalactia*, %6,7'sinin *Klebsiella pneumonia*, %5,3'ünün *E. coli*, %4,6'sının *Streptococcus uberis*, %4,6'sının *Proteus vulgaris*, %4'ünün *Corynebacterium bovis*, %1,3'ünün *Coynebacterium pyogenes*, %1,3'ünün *Psudomonas aeruginosa* ve %1,3'ünün de *Candida albicans* kaynaklı olduğunu tespit etmişlerdir. Kaya vd. (66) Aydın bölgesindeki 141 klinik mastitisli inekten aldıkları süt örneklerini, mikrobiyolojik açıdan inceleyerek, antibiyotiklere dirençlerini araştırmışlardır. Araştırmada bakteriyolojik üreme görülen vakaların %57'sinde *Staphylococcus aureus*, %12'sinde *Streptococcus spp.* %5'inde *E. coli*, %5'inde *Lactobacillus*, %5'inde *Klebsiella pneumonia*, %4'ünde *Corynebacterium pyogenes* ve %13'ünde de *Candida*

albicans tespit edilmiştir. Bu bağlamda araştırmada izole edilen bakteriler bakımından literatürde yer alan çalışmalarda ulaşılan bulgularla benzerlik gösterdiği söylenebilir.

Bu çalışmada izole ve identifiye edilen bakteri türlerinden *Enterococcus*'ların tetracycline dirençli olduğu, *E. coli*'lerde Amoxicillin-clavulanic asit, Clindamycin ve pencilin direnci görülmesine karşın *Streptococcus spp* ve *S. aureus* suşlarında çeşitli oranlarda antibiyotiklere direnç belirlenmiştir. Mastitis olgularından izole edilen etkenlerin sağaltımında kullanılacak antibiyotiklerin belirlenmesiyle ilgili birçok çalışmalar yapılmıştır (18, 19, 33, 57). Yapılan çalışmalarda etkenlerin antibiyotiklere dirençlilikleri farklılıklar göstermektedir.

Bu çalışmada, çiftlik kültür yöntemi, standart mikrobiyolojik kültür ile karşılaştırdığımızda izole edilen mikroorganizmalar yönünden benzer olarak bulundu. *S. aureus* ve *E. coli* bakterileri her iki yöntemdede aynı oranda tespit edildi (Tablo 4.3). Jones ve ark (12) Yeni Zelanda 292 süt örneğini çiftlik kültür sistemiyle incelemişler ve standart mikrobiyolojik kültür yöntemine benzer sonuçlar aldıklarını bildirmişlerdir. Ferreira ve ark. (67) klinik mastitis ile ilişkili patojenleri tanımlamak için ticari olarak temin edilebilen (Accumast, Minnesota, Easy System, SSGN ve SSGNC Quad plates) çiftlik kültür sistemlerinin performanslarını değerlendirmek amacıyla yaptıkları çalışmada, Accumast'ın en doğru sonuç veren çiftlik- kültür sistemi olduğunu diğer ticari preparatların özellikle negatif durumlarda etkili sonuçlar verdiğini belirtmişlerdir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmada Adıyaman ili süt işletmelerinden alınan süt örneklerinde, mastitise neden olan patojenlerin hızlı ve doğru bir şekilde tayin edilmesini sağlayan çiftlik kültür yöntemleri ile standart mikrobiyolojik tanı yöntemleri karşılaştırılmış ve araştırma sonucunda çiftlik kültür yöntemlerinin, standart mikrobiyolojik yöntemlere benzer başarı oranına sahip oldukları belirlenmiştir.

İzole ve identifiye edilen bakteri türlerinden *Enterococcus*'ların tetracycline dirençli olduğu, *E. coli*'lerde Amoxicillin-clavulanic asit, Clindamycin ve penicilin direnci görülmesine karşın *Streptococcus spp* ve *S. aureus* suşlarında çeşitli oranlarda antibiyotiklere direnç belirlenmiştir. Son dönemlerde yapılan araştırmalarda, hayvanlardan izole edilen bakterilerde çeşitli oranlarda antibiyotik dirençleri görülmektedir. Çiftlik kültür yöntemi, erken tedavide antibiyotik seçimini kolaylaştırarak, gereksiz antibiyotik kullanımının önüne geçebilmektedir.

Sonuç olarak, Çiftlik kültür yöntemlerinin kullanımının, mastitis patojenlerinin tespiti ve oluşturulacak koruma ve kontrol programlarında antibiyotik direnç oluşumunun izlenmesi açısından etkili kontrol stratejilerinin oluşturmada yararlı olacağı kanısına varıldı.

7. KAYNAKLAR

1. Deveci H, Apaydın AM, Kalkan C, Öcal H, Evcil Hayvanlarda Meme Hastalıkları, Elazığ: Fırat Üniversitesi Basımevi, 1994.
2. Alaçam E, Meme Hastalıkları, “Sığır Hastalıkları” Ed. E. Alaçam ve M. Şahal, Ankara: Medisan Yayınları 1997.
3. Kesenkaş H, Karagözlü C, Akbulut N, Kaliteli süt üretiminde somatik hücre sayım yöntemleri ve önemi. GAP II. Tarım Kongresi, 24-26 Ekim, I. Kitap, 287-296, Şanlıurfa 2001.
4. Sargeant JM, Leslie KE, Shirley JE, Pulkrabenk BJ, Lim GH. Sensitivity and specificity of somatic cell count and California mastitis test for identifying intramammary infection in early lactation. Journal of Dairy Science, 2001; 84:2018-2024.
5. Şimşek H, Aksakal M, Subklinik Mastitisli İneklerde Kan ve Sütte Lipit Peroksidasyon ve Bazı Antioksidanlar Üzerine E Vitamininin Etkisi, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2005;52,71-76.
6. Aydın N, Mastitisten Korunma Yöntemleri ve İmmünizasyonun Önemi, Mastitis Semineri, Ankara 1984.
7. Huang LQ, Rongxiang-Cai MS. Correlation Between Somatic Cell Counts, *Bacteria and Enzymes* in Milk of Subclinical Mastitis, Proceeding of the Third IDF International Mastitis Seminar, Telaviv, Israel, 2018:88- 91.
8. Ashraf A, Imran M. Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. Tropical Animal Health and Production, 2018:1193-1202.
9. Podpecan O, Pengov A, Hrastnik U. Treatment of subclinical *staphylococcal* mastitis. Slovenya Veterinar Research, 2004; 41 (1),31-34.
10. Nickerson SC, Control of heifer mastitis: Antimicrobial Treatment- An Overview. Veterinar Microbiology, 2008: 134,128-135.
11. Ferreyra EC, Bernacchi AS, Castro JA. Increased Glutathione (GSH) Content in Livers of Control and Carbon tetrachloride Poisoned Rats Treated. With the Anticardiolipin Drug Trifluoperazine (TFP), Res. Commun Chem. Path. Pharmacol., 1986; 53(3), 399-402.
12. Jones GM, Bailey TL. Understanding the basics of mastitis. Virginia Cooperative Extension, 2009:1-5.
13. Hansen PJ, Soto P, Natzke RP. Mastitis and fertility in cattle-possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. Am Journal Reprod Immunology. 2004;51,294-301.
14. Coşkun A, Şen, İ. Sığırlarda akut faz proteinleri ve klinik kullanım alanları. Sağlık Bilimleri Dergisi. 2011; 20(3), 240-246.

15. Adkins PRF, Middleton JR. Methods for diagnosing mastitis, Veterinar Clinic Food Animal 2018: 34,479-491.
16. Schrick FN, Hockett ME, Saxton AM, Lewis MJ, Dowlen HH, Oliver SP. Influence of subclinical mastitis during early actation on reproductive parameters. Journal of Dairy Science, 2001: 84,1407-1412.
17. Oliver SP, Mitchell BA. Prevalence of mastitis pathogens in herds participating in a mastitis control program. Journal of Dairy Science, 1984:67,2436-2440.
18. Rişvanlı A. Elazığ bölgesi süt ineklerinde klinik ve subklinik mastitislerin dağılımı, mastitislere sebep olan mikroorganizmaların izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıkları üzerine çalışma. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Elazığ, 2001.
19. Bishop JR, Bodine AB, Janzen JJ. Sensitivities to antibiotics and seasonal occurrence of mastitis pathogens. Journal of Dairy Science, 1980: 63, 1134- 1137.
20. Emanuelson U, Danell B, Philipsson J. Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell counts and milk production estimated by multiple-trait restricted maximum likelihood. Journal of Dairy Science, 1988: 71, 467- 476.
21. Haas Y, Barkema HW, Veerkamp RF. Genetic parameters of pathogen- specific incidence of clinical mastitis in dairy cows. Animal Science, 2002: 74 (2),233-242.
22. Morse D, Delorenzo MA, Wilcox CJ, Collier RJ, Natzke RP, Bray DR. Climatic Effects on Occurrence of Clinical Mastitis. Journal of Dairy Science, 1988:71,848-853.
23. Suriyasathaporn W, Schukken YH, Nielsen M, Brand A. Low Somatic Cell Count: a risk factor for subsequent clinical mastitis in a dairyherd. Journal of Dairy Science, 2000: 83, 1248-1255.
24. Yalçın C. Cost of mastitis in Scottish dairyherds with low and high subclinical mastitis problems. Turkish Journal Veterinar Animal Science, 2000: 24,465-472.
25. Rupp R, Boichard D. Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cells core, production, udderty petraits, and milking ease in first lactation Holsteins. Journal of Dairy Science, 1999: 82,2198-2204.
26. Ogata A, Nagahata H. Intramammary application of ozone therapy to acute clinical mastitis in dairy cows. Journal of Veterinary Medicine Science, 2000: 62 (7),681-686.
27. Leitner G, Yadlin N, Lubashevsky E, Ezra E, Glickman A, Chaffer M, Winkler M, Saran A, Trainin Z. Development of a *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows. II. Fieldtrial. Veterinar Immunology Immunopathol, 2003:93,153-158.
28. Atasever S, Erdem H. Süt sığırlarında mastitis ile sütün elektriksel iletkenliği arasındaki ilişkiler. Anadolu Journal of Agricultural Sciences, 2008; 23 (2):131-136.
29. Kart A, Uzul E, Karapehlivan M, Ögün M, Merhan O. Buzağılarda İmmuno modülatör Zylexis' in Kan Glutasyon, Malondialdehit, Nitrik Oksit, Toplam ve Lipit Bağlı Sialik Asit Seviyelerine Etkileri. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, 2010: 5(2),43-48.

30. Nash DL, Rogers GW, Cooper JB, Hargrove GL, Keown JF, Hansen LB. Heritability of clinical mastitis incidence and relationships with sire transmitting abilities for somatic cells count, udder traits, productive life, and protein yield. *Journal of Dairy Science*, 2000; 83:2350-2360.
31. Sandgren CH, Waller KP, Emanuelson U. Therapeutic effects of systemic intramammary antimicrobial treatment of bovine subclinical mastitis during lactation. *Veterinary Journal*, 2008; 175, 108-117.
32. Hillerton JE, Berry EA. Treating mastitis in the cow—a tradition or an archaism. *Journal of Microbiology*. 2005; 98:1250-1255.
33. Erskine RJ, Walker RD, Bolin CA, Bartlett PC, White DG. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. *Journal of Dairy Science*, 2002; 85,1111-1118.
34. Brightling P, Dyson RD, Hope AF, Penry J. A National Programme for mastitis control in Australia: Countdown Downunder. *Irish Veterinary Journal*, 2009;62,52-58.
35. Fleischer P, Metzner M, Beyerbach M. The relationship between milk yield and the incidence of some disease in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 2001; 84,2025-2035.
36. Gunne H, Tenhagen BA, Kutzer P, Forderung D, Heuwieser W. Do lactoferrin, lysozyme and the lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogenperoxide-system cause negative microbiological results in mastitis secretions? *Deutsche Tierärztl Wochenschr*, 2002; 109 (7),300-305.
37. Mukherjee R. Assessment of reactive oxygen species and phagocytosis of milk leukocytes by alpha-tocopherol and enrofloxacin in bovine mastitis. *Veterinarski Arhiv*, 2006; 76 (1):1-9.
38. Savill J. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *British Medical Bulletin*, 1997;53 (3), 491-508.
39. Watson DL, McColl ML, Davies HI. Field trial of a *staphylococcal* mastitis vaccine in dairy herds: clinical, subclinical and microbiological assessments. *Australian Veterinary Journal*, 1996;74 (6),447-450.
40. Duarte, C.M., Freitas, P.P., Bexiga, R. Technological advances in bovine mastitis diagnosis: an overview. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2015; 27(6),665-672.
41. Jain N.C. Common mammary pathogens and factors in infection and mastitis. *Journal of Dairy Science*, 1979; 62 (1),128-134.
42. Uzmay C., Kaya A., Kaya İ., Akbaş Y. İzmir İli Holstein Damızlık Süt Sığırcı Yetiştirici Birliği İşletmelerinde Mastitisin Yaygınlık Düzeyi ve Etkileyen Etmenler Üzerine Araştırmalar, *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2001;38(2-3),71-78.

43. Yalçın C, Cevger Y, Türkyılmaz K, Uysal G, "Süt İneklerinde Subkilinik Mastitisten Kaynaklanan Süt Verim Kayıplarının Tahmini", Türk Journal of Animal Science, 2000:24,599-604.
44. Lamphug, S.M., Apeagyei, F., Mwanmut, D., Hendrickse, R.G., "Aflatoxins in Breast Milk, Neonatal Cord Blood and Serum of Pregnant Women", British Medicine Journal, 1988: 296,968.
45. Atroshi, F., Työppönen, J., Sankari, S., Kangasntemi, R., Parantainen, J., "Possible Roles of Vitamin E and Glutathione Metabolism in Bovine Mastitis", Internat. J. Vit. Nutr. Res., 1986, 57:37-43.
46. Dündar Y, Eryavuz A, Aslan R, Uçar M, "Malondialdehyde and Glucose-6- Phosphate Dehydrogenase Levels in Healthy and Subclinical Mastitis Cows", Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 2000: 6,84-86.
47. Barber MR, Yang TJ. Chemotactic activities in nonmastitic and mastitic mammary secretions: presence of interleukin-8 in mastitic but not nonmastitic secretions. Clin Vaccine Immunology, 1998;5 (1),82-86.
48. Dohoo IR, Meek AH. Somatic cell counts in bovine milk. Canadian Veterinary Journal, 1982: 23, 119-125.
49. Küplülü Ş, Vural R, İzgür H, Kılıçoğlu C, Baştan A, Kaymaz M, Erdeğer J. Subklinik mastitislerin Tanısında Milk Checker'ın Kullanılması. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 1995: 42,281-284.
50. Timurkan H. İneklerde California mastitis testi ve sütün elektrik iletkenliğinin karşılaştırılması. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi, 2014: 28 (3),135-136.
51. Djabri B, Bareille N, Beaudeau F, Seegers H. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. Veterinar Research, 2002: 33, 335-357.
52. Ajitkumar, P., Barkema, H.W. and De Buck, J., 2012. Rapid identification of bovine mastitis pathogens by high-resolution melt analysis of 16S rDNA sequences, Veterinary Microbiology, 155, 332–340 (Elsevier B.V).
53. Ashraf, A., Imran, M., Yaqub, T., Tayyab, M., Shehzad, W., & Thomson, P. C. (2017). A novel multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically significant bacterial pathogens associated with bovine mastitis. Molecular and cellular probes, 33, 57-64.
54. Harmon RJ, Eberhart RJ, Jasper DE, Langlois BE, Wilson RA. Microbiological Procedures for Diagnosis of Bovine Udder Infection, National Mastitis Council Inc. 1990.
55. Baştan A. İneklerde Meme Sağlığı ve Sorunları. Kardelen Matbaacılık Ankara 2010.
56. Barrett DJ, Healy AM, Leonard FC, Doherty ML. Prevalence of pathogens causing subclinical mastitis in 15 dairy herds in the R.I. Irish Veterinary Journal, 58, 2005: 333-337.

57. Macun HC, Yağcı, IP, Ünal N, Kalender H, Sakarya F, Yıldırım M. Kırıkkale’de belirlenen subklinik mastitisli ineklerde etken izolasyonu ve antibiyotik direnç durumu, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 8(2), 2011:91-95.
58. Persson Y, Nyman AKJ, Anderson UG. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. Acta Vet. Scandinavica, 53, 1979:36-48.
59. Tenhagen BA, Koster G, Wallmann J, Heuwieser W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany, Journal of Dairy Science, 89, 2006: 2542-2551.
60. Stuhr T, Aulrich K (2010). Intramammary infections in dairy goats: recent knowledge and indicators for detection of subclinical mastitis. Landbauforsch, 4, 267-280.
61. Elizabeth A. McInnis EA, Kalanetra KM, Mills DA, Maga EA (2015). Analysis of raw goat milk microbiota: impact of stage of lactation and lysozyme on microbial diversity. Food Microbiol, 46, 121-131.
62. Çokal Y, Konuş R. Subklinik mastitisli ineklerin sütlerinden aerobik bakterilerin izolasyonu, Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi, 1(2) 2012:65-69.
63. Fox LK. Prevalance, incidence and risk factors of heifer mastitis, Veteriner Microbiology, 134: 2009: 82-88.
64. Özdemir M, Mastitisli inek sütlerinden *Staphylococcus* türlerinin izolasyonu ve identifikasyonu, Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, İstanbul 2005.
65. Arda M, İstanbulluoğlu E, Mastitislere sebep olan aerobik, mikroaerofilik anaerobik bakterilerin izolasyon ve idantifikasyonu üzerinde çalışmalar, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu Veterinerlik ve Hayvancılık Araştırma Grubu, Proje no: VHAG-304, 1980.
66. Kaya O, Kırkan Ş, Gülal M, Ünal B, Aydın yöresinde ineklerde klinik mastitise neden olan mikroorganizmaların saptanması ve bunların antibiyotiklere duyarlılıklarının incelenmesi. Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 30, 1999: 25-29.
67. Ferreira JP, Anderson KL, Correa MT, Lyman R, Ruffin F, Reller LB, Fowler VG. Transmission of MRSA between companion animals and infected human patients presenting to outpatient medical care facilities. PLoS ONE, 6, 2011:1-6.