



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



KOYUN VE KEÇİ SÜTLERİNDEN İZOLE EDİLEN *E. coli*'DE SUL GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Veteriner Hekim Mehmet KORKMAZ
FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Ömer AKGÜL

VAN-2020

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOYUN VE KEÇİ SÜTLERİNDEN İZOLE EDİLEN *E. coli*'DE SUL
GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Mehmet KORKMAZ
FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Ömer AKGÜL

VAN-2020

ETİK BEYAN

T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*Koyun ve Keçi Sütlerinden İzole Edilen E. coli’de Sul Genlerinin Araştırılması*” başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Mehmet KORKMAZ

Tarih: 20/ 01/ 2020

İmza:

TEŐEKKÖR

Tez çalışmam süresince, bilgi ve hoşgörsünü esirgemeyen, yol göstericiliğiyle çok faydalı olan tez danışmanım, kıymetli hocam Dr. Öğr. Üyesi Ömer AKGÜL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam süresince, çalışmanın en iyi şekilde tamamlanması için yol gösteren ve emek veren kıymetli hocam Doç. Dr. Gülhan BORA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Hayatımın her evresinde bana destek olan eşim, annem, babam ve kardeşlerime sonsuz teşekkür ederim.

Mehmet KORKMAZ



ÖZET

KORKMAZ M., Koyun ve keçi sütlerinden izole edilen *E. coli*'de *sul* genlerinin araştırılması, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van, 2020. Antimikrobiyal ilaçlar, gıda elde etmeye yönelik yetiştirilen hayvanlarda bakteriyel infeksiyonlardan koruma ve tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Fakat, kontrolsüz antibiyotik kullanımı farklı direnç sahip patojen bakterilerin ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır. İnsanlarda, direnç geliştiren bakterilerin yarattığı risk endişe vericidir. Antimikrobiyal direncin gelişmesinde, çoklu ilaç direncine sahip bakteri türlerinin gıda zinciri aracılığıyla insanlara bulaşması ve kişileri taşıyıcı hale getirmesiyle oldukça yaygın bir hale gelebilmektedir. Mastitis hastalığı, gıda sektöründe ciddi riskler yaratan ve insan sağlığını olumsuz etkileyen bakteriyel bir hastalıktır. Van ili köy işletmelerinden 100 koyun ve 100 keçi (klinik veya subklinik mastitis tanılı)'den olmak üzere toplam 200 süt örneği toplandı. Sütlerin tamamına California Mastitis Testi (CMT) uygulandı. Bakterilerin identifikasyonu ve antibiyogram testi değerlendirmesi için Vitek 2 Compact (Biomerieux, USA) cihazı kullanıldı. Klinik ve Subklinik mastitisli vakalardan izole edilen 21 (%58,3) *E. coli* suşunun sülfonamid dirençli olduğu belirlendi. Bu izolatların mPCR ile *sul1*, *sul2* ve *sul3* geni taşıyıcılıkları analiz edildi. 21 *E. coli* izolatının sırasıyla 17'sinin *sul1*, 3'ünün *sul2* ve 1'inin *sul3* geni taşıyıcılığının pozitif olduğu belirlendi. Sonuç olarak, köy işletmelerinde yetiştirilen koyun ve keçilerde sülfonamid direnci ve direnç geni yaygınlığı yüksek görüldü. Sütlerin pastörize edilmeden tüketilmesinin mikrobiyota bakterilerinde *sul* geni yaygınlığını artırabileceği görüldü.

Anahtar Kelimeler: *sul1*, *sul2*, *sul3*, Mastitis, Küçük ruminant.

ABSTRACT

KORKMAZ M., Investigation of *sul* genes in *E. coli* isolated from sheep and goat milk, Van Yüzüncü Yıl University, Health Sciences Institute, Faculty of Pharmacy, Basic Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmaceutical Microbiology, Postgraduate Thesis, Van, 2020. Antimicrobial drugs can be use for treatment and provention animals growen for food production from bacterial infections. However, uncontrolled antibiotic useg plays an important role in the emergence of pathogenic bacteria with different resistance. In humans, the risk of bacteria developing resistance is worrying. In the development of antimicrobial resistance, multi-drug resistant bacteria species can become quite common by infecting people through the food chain and making them carriers. Mastitis is a bacterial disease that poses serious risks to the food industry and adversely affects human health. A total of 200 milk samples were collected from 100 sheep and 100 goats (diagnosed with clinical or subclinical mastitis) from village enterprises in Van province. California Mastitis Test (CMT) was applied to all milk. Vitek 2 Compact (Biomerieux, USA) device was used for identification and evaluation of the antibiogram test. 21 (58.3%) *E. coli* strains isolated from clinical and subclinical mastitis cases were found to be sulfonamide resistant. *Sul1*, *sul2* and *sul3* gene carriers of these isolates were analyzed by mPCR. Of the 21 *E. coli* isolates, 17 were *sul1*, 3 were *sul2* and 1 was *sul3* gene positive. As a result, sulfonamide resistance and resistance gene prevalence was high in sheep and goats reared in village holdings. It was seen that the consumption of milk without pasteurization could increase the prevalence of *sul* gene in microbiata bacteria.

Key Words: *sul1*, *sul2*, *sul3*, Mastitis, Small ruminant.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	II
ETİK BEYAN.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VI
İÇİNDEKİLER.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VIII
TABLolar LİSTESİ.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Tanım.....	4
2.2. Mastitis Hastalığının Ekonomik Etkileri.....	5
2.3. Mastitis Hastalığının Sağlık Yönünden Etkileri.....	7
2.4. Mastitis Hastalığının Etiyolojisi.....	9
2.5. Mastitis Hastalığı ve Antibiyotik Direnç İlişkisi.....	10
2.6. Mastitis Hastalığında Teşhis Yaklaşımları.....	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	14
3.1. Bakteri İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Antibiyogram Testi.....	14
3.2. Genomik Dna Ekstraksiyonu ve Amplifikasyonu.....	14
4. BULGULAR.....	16
4.1. Bakteri İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Antibiyogram Testi Sonuçları.....	16
4.2. Genomik Dna Ekstraksiyonu ve Amplifikasyon Sonuçları.....	17
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	18
KAYNAKLAR.....	23
ÖZGEÇMİŞ.....	30
EKLER.....	31
Ek 1. Etik Kurul Raporu.....	31
Ek 2. Tez Orjinallik Raporu.....	33

SİMGELER VE KISALTMALAR

CMT	:	California Mastitis Testi
CNS	:	Koagülaz Negatif
GSBL	:	Genişlemiş Spektrum Beta-Laktamaz



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.	Çalışmada kullanılan referans oligonükleotid dizileri.....	15
Tablo 2.	Klinik ve Subklinik mastitisli küçük ruminantlardan izole edilen <i>E. coli</i> suşlarının antibiyotik direnç oranları.....	16



1. GİRİŞ

Antimikrobiyal ilaçlar, gıda elde etmeye yönelik yetiştirilen hayvanlarda bakteriyel infeksiyonlardan koruma ve tedavi amaçlı kullanılmaktadır (McEwen ve Fedorka-Cray, 2002). Ancak, bu tür hayvanlarda kullanılan antimikrobiyal ilaçlara karşı gelişen flora ve patojen bakterilerindeki dirençten kaynaklı dikkatli olunması önem arz etmektedir (Landers ve ark., 2012). Özellikle veteriner hekimler ve toplumda, direnç geliştiren bakterilerin yarattığı risk endişe vericidir. Antimikrobiyal direncin gelişmesinde, çoklu ilaç direncine sahip bakteri türlerinin gıda zinciri aracılığıyla insanlara bulaşması ve kişileri taşıyıcı hale getirmesiyle oldukça yaygın bir hale gelebilmektedir. Bakterilerdeki direnç ise insanlarda ve hayvanlarda yanlış tedaviler uygulanmasına neden olarak tıbbi bakım ile hayvansal gıdaların üretiminde ciddi harcamalar yapılmasına neden olmaktadır (Bengtsson ve ark., 2014).

Veteriner hekimler, klinik mikrobiyologlar, toplum sağlığı merkezleri ile devlet bakanlıklarının aktif rol aldığı bir süreçte, antimikrobiyal direnç bileşenlerini ve hayvanlarda gelişen infeksiyonlarda bakteriyel etkinliği bilerek, patojen sipsifik ve en uygun ampirik tedavi seçeneği, tedavi protokol rehberi ve kanunların geliştirilmesinin dirençli bakteriler ile mücadele de oldukça önemli olduğu bildirilmektedir (Blondeau ve Tillotson, 1999; Lubbers ve Hanzlicek, 2013). Antimikrobiyal duyarlılık bileşenleri ve bakteriler, bir hayvandan diğerine veya bir bölde diğerine çok hızlı bir şekilde yayılabilirler (Blondeau ve Tillotson, 1999; Lubbers ve Hanzlicek, 2013). Bu bakterilerin bölgesel veya sınırlı alanlardaki bilgilerine sahip olmak oldukça önemlidir (Checkley ve ark., 2010). Ek olarak sürvelans, evcil hayvanlar arasında yeni veya gelişmekte olan bakteriyel hastalıkların hemen tedavi edilmesinde ve ilaç direncindeki değişikliklerin tanımlanması adına oldukça önemli arz etmektedir (Awosile ve ark., 2018).

Ülkeler de peynir, tereyağı, yoğurt, krema ve dondurma (pastörize değildir) ile pastörize sütler ticari olarak insanların tüketimine sunulan önemli hayvansal gıdalar olarak bilinmektedir. Gıda sektörünün başarısının devam etmesinde hayati olarak görülen kurallar içerisinde, tüketicinin ürünün kaynağını bilmesi ve ürünü takip

edebilmesindeki kolaylık oldukça önemlidir. Ticari sütlerde yerel kaynaklı kalite ile hijyenik üretim mevcut olması, sektörün büyümesindeki ve gelişiminin devam etmesindeki başarının temelini oluşturur (Murphy ve ark., 2007).

Koyun ve keçilerde mastitis, gösterdiği farklılıklar nedeniyle özel yaklaşım gerektiren hastalıklar sınıfında değerlendirilmektedir (Contreras ve ark., 2007). Mastitis hastalığı konak, patojen ve vre arasındaki ilişkinin bir sonucu olarak ortaya çıkan çoğu zaman benzer özellikler gösteren bir hastalıktır. Etiyolojisinin farklı nedenleri içerisinde bulundurduğu bu hastalık ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Hawari ve ark., 2014; Vasileiou ve ark., 2019). Çevrenin, koyunlarda subklinik mastitisler üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada sıcaklığın oldukça düşük olduğu kış aylarında hastalığın daha fazla grldğu belirlenmiştir (Vasileiou ve ark., 2019). Stres ve meme dokusunun yaralanması sonucu yangı ortaya çıkabilmektedir. Ancak mastitisin birincil sebebi olarak bakteriler ve mantarlar gösterilmektedir. Bu etkenler, insan sağlığı ve hayvansal ürünler üzerine olumsuz birçok etki oluştururlar (Hawari ve ark., 2014). Meme dokusunun yangısı, kompleks ve pahalıya mal olan bir hastalık olarak bilinmektedir (Radostitis ve ark., 1994). Bu hastalık, süt veriminin azalması ile veteriner hizmetleri, tedavi, laboratuvar işlemlerinin artmasıyla ilişkili önemli bir problem olarak tanımlanmaktadır (Fthenakis, 1994).

Dünya çapında mastitis, küçük ruminant sürülerinde görülen sağlık problemleri ve ciddi ekonomik kayıpların oluşmasında rol oynayan hastalıklardan bir tanesi olarak dikkati çekmektedir (Osman ve ark., 2013; Hawari ve ark., 2014). Küçük ruminant sürülerinde, klinik mastitisin yıllık görülme oranı genel olarak %5'den daha az olsa da sporadik görülme yaygınlığı daha yüksek olabilmektedir. Diğer taraftan subklinik mastitislerin görülme oranı %5-30 veya daha fazla oranlarda olabileceği tahmin edilmektedir (Bergonier ve Berthelot, 2003; Contreras ve ark., 2007). Her ne kadar görülme sıklıkları değişiklik göstersede ciddi mastitis olguları, hayvanların ölümlerine ve erken itlafına neden olan önemli bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (Queiroga, 2017). Kuzularda gelişme geriliği ve hayatta kalma oranındaki düşüklük üreticide oluşan krizi daha da bytmektedir (Leitner ve ark., 2004; Quintana ve Martin, 2005). Diğer taraftan, subklinik mastitisli hayvanlardan elde edilen sütlerden yapılan peynirin

kalitesinde oluşan bozukluklarda üreticide önemli maliyet kayıplarına neden olmaktadır (Silanikove ve ark., 2005; Rovai ve ark., 2015).

Koyun ve keçi işletmelerinde mastitis önemli bir sorun olarak güncelliğini korumaktadır. Yıllık olarak oluşan ekonomik kayıplar devlet adına önemli bir yükümlölük ortaya çıkarmaktadır. Sülfanamidler, mastitis tedavisinde yoğun olarak kullanılan ilaçlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Bunlara karşı gelişen direncin ortaya konulması önemli olarak görölmüştür. Van ilinde halkın büyük bir çoğunluğu koyun ve keçi yetiştirerek geçimini sağlamaktadır. Özellikle bu hayvanlardan elde edilen sütlerden Van Otlı Peyniri yapılmaktadır. Van Otlı Peyniri bugün tescillenmiş ve dünyaya tanıtım amaçlı önemli bir besin kaynağı olarak sunulmaktadır. Hayvanlarda gelişen mastitis ile birlikte hem hayvansal gıdalardan hem de direkt çevre kontaminasyonu yoluyla insanlar risk altında kalmaktadır. Bu çalışmada, mastitisin önemli etkenlerinden biri olan *E. coli* varlığı ve yaygınlığı ile birlikte gelişen sulfanamid direncinin fenotipik ve genotipik değerlendirilmesinin yapılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tanım

Mastitis, meme bezlerinde enfeksiyöz veya enfeksiyöz olmayan irritasyonlar sonucunda ortaya çıkan yangının genel bir ifadesi olarak tanımlanmaktadır (Gabli ve ark., 2019). Mastitiste en yaygın görülen yangı sebebi mikroorganizmakaynaklı ortaya çıkmaktadır. Enfeksiyöz olmayan yangılar ise genellikle fiziksel travmalar sonucu meydana gelmektedir (Özyurtlu ve ark., 2011).

Mastitis geleneksel olarak klinik ve subklinik olmak üzere iki şekilde tanımlanmaktadır (Gabli ve ark., 2019). Subklinik mastitis, hayvan popülasyonlarında klinik mastitise göre daha fazla görülmektedir. Süt yönlü yetiştirilen keçilerde meme dokusunun infeksiyonlarının içerisinde yaklaşık %15-40 oranında görülme sıklığına sahip olduğu rapor edilmiştir. Subklinik mastitiste, infekte meme dokusunda klinik semptom bulunmamaktadır fakat patojenler hem sütte hem de dokuda kolonize bir şekilde tespit edilmektedir (Omar ve Mat-Kamir, 2018).

Akut klinik mastitise birincil neden olan etkenler bakterilerdir. Bu bakteriler içerisinde en yaygın görülen patojenlerin *Staphylococcus* spp., *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonas aeruginosa* olduğu bildirilmiştir (Anderson ve ark., 2002). Bakteriyel mastitisli meme dokusunda genellikle kızarıklık, sıcaklık ve şişme görülür. Genellikle, sadece bir meme dokusu etkilenmiştir. Koyu, seröz, kan kırmızısı ve pul pul bir sekresyon görülebileceği gibi purulent veya fibrinli bir akıntıda şekillenebilir. Meme boşluğu ve kanalında görülen kitlesel akıntının mikroskopik incelemesinde lökositler ile nötrofillerin yoğun olduğu görülmektedir. Alveolar epitelyumun kaybı ve nekrozis en sık görülen bulgulardır (Watkins ve Jones, 2007).

Şiddetli akut klinik mastitis, *Staphylococcus aureus*'un genellikle neden olduğu bir hastalıktır. Etkilenen bez ödematöz ve genişlemiştir. Meme dokusu, kırmızı veya mor renktedir. Hastalığın başlangıcında meme dokusuna dokunulduğunda soğukluk hissedilir. Histolojik değerlendirmede, parankim dokuda yaygın nekrozis, ödem ve trombozis görülür. Anne hayvan hayatta kalırsa eğer etkilenen meme amaliyatla uzaklaştırılır (Winter, 2001).

Subklinik mastitis vakalarında, klinik semptomlar veya makroskopik lezyonlar görülmemektedir. Teşhis, süt örneklerinde somatik hücre artışı ve neden olan bakteriyel etkenin tanımlanması üzerine temellendirilmiştir (Contreras ve ark., 1996; Fragkou ve ark., 2014). Koagülaz negatif *Staphylococcus* etkenleri en sık izole edilen bakteriler olmasına rağmen akut mastitisle benzer olarak farklı birçok bakterinin neden olabileceği tespit edilmiştir. Histolojik farklılıklar meydana gelmektedir. Başlangıçta nötrofil infiltrasyonu vardır. Daha sonra nötrofil lizisi ve alveolar yıkım görülür. Enfeksiyonun son evresinde lenfosit infiltrasyonu ve fibröz doku proliferasyonu meydana gelir (Fthenakis ve Jones, 1990).

Kronik mastitis (Long-standing mastitis), bakteriyel enfeksiyonların uzun sürmesi, etkilenen meme dokusunun sertleşmesi, apse veya süt kistlerinin varlığı ile kendini belli eden bir hastalıktır (Watkins ve Jones, 2007). Bu hastalığa en sık neden olan patojenin *Mycoplasma* spp., (*M. agalactia*) olduğu bildirilmiştir. Başlangıç evresinde, hastalık akut mastitise benzerlik gösterir. Kronik dönem başlangıcında, meme bezinde fibrozis ve devam eden atrofi vardır. Histolojik olarak, bir lenfoplazmositik infiltrasyonla karakterizedir ve final olarak subepitelyal lenfoid foliküllerinde organizasyon meydana gelir (Castro-Alonso ve ark., 2010). Kronik mastitis, kontagiyöz agalaksiyanın en sık görülen formudur. Burada ek olarak artrit, keratokonjunktivit, pnömoni ve abortus görülebilir. Kronik mastitis, Lentiviral enfeksiyonlar nedeniyle meydana gelebilir. Sütte makroskopik değişiklikler olmaksızın etkilenen meme dokusunun çift taraflı artan sertleşmesi görülür. Mikroskopik olarak, meme kanalı çevresinde belirgin lenf foliküllerinin oluşumu ile lenfositlerin yaygın infiltrasyonu söz konusudur (van der Molen ve Houwers, 1987; Benavides ve ark., 2015).

2.2. Mastitis Hastalığının Ekonomik Etkileri

İnsan ve hayvan enfeksiyon hastalıklarının klinik tedavisi ile antimikrobiyal direnç gösteren patojenlerin ortaya çıkması arasındaki uyumlu süreç sonucunda global toplum sağlığı ve ekonomi üzerine olumsuz bir etki ortaya çıkmıştır (File ve ark., 2014; Friedman ve ark., 2016). İnsan ve hayvanlarda dirençli bakterilerin tedavisi için tercih edilen antimikrobiyal ilaçların uygun olmayan kullanımları sonucu ciddi riskler ortaya

çıkılmaktadır. Özellikle, antimikrobiyal dirençli bakteriler hayvanlardan insanlara geçerek ciddi infeksiyonlara neden olmaktadır (Leverstein-van Hall et al., 2011; Landers et al., 2012). Antimikrobiyal direnç, zengin veya fakir toplumların içerisinde ciddi bir problem yaratmaktadır. Fakat bu problem, gelişmekte olan toplumlarda hayvansal gıda üretiminde antibiyotik kullanımı ve kısıtlamaların daha az olmasından kaynaklı çok daha ciddi ortaya çıkabilmektedir (WHO, 2014). Kommensal bakterilerde yapılan antibiyotik direnç çalışmalarında, direnç genleri için önemli birer rezervuar olarak görev yaptıkları ve diğer patojen bakterilere direnç genlerini aktarılabildikleri ortaya konulmuştur (DeFrancesco ve ark., 2004; EFSA, 2008). Komensal bakterilerde antimikrobiyal direnç ile sınırlı antibiyotik kullanımı ve yeni dirençli patojenlerin ortaya çıkması arasında pozitif bir korelasyon görülmektedir (Hao et al., 2014). Böylece, hayvalardan izole edilen bakterilerde antimikrobiyal direncin sıkı takip edilmesi yoluyla gıda zinciri içerisinde komensal ve patojen bakterilerde ortaya çıkan antimikrobiyal direnç profillerinin belirlenmesi daha kolay bir hale gelmektedir (Obaidat ve ark., 2017). İnsan ve hayvan infeksiyonlarına (mastitis) neden olan bakterilerin takip edilmesi sonucunda, ciddi sağlık harcamalarının önüne geçilmesi muhtemel olmaktadır.

Ekonomik olarak mastitis, tüm dünyada süt yönlü yetiştirilen hayvanları etkileyen en önemli hastalıklardan biri olarak tanımlanmaktadır (Mishra ve ark., 2018). Modern işletmelerde uygulanan kontrol programlarına rağmen önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Quinn ve ark., 1994). Tüm evcil hayvanlarda görülen önemli bir sorun olduğu bilinmektedir. Ülkemizde mastitis üzerine birçok çalışma yapılmasına rağmen halen süt yönlü yetiştiricilik yapılan işletmelerde yaygın olarak görülmektedir (Tel ve ark., 2009). Özellikle mastitisin sütün miktarı ve kalitesinde ortaya çıkardığı etkileri tanımlarken meme ile sütte fiziksel, kimyasal, mikrobiyolojik ve patolojik özellikleri değerlendirerek ortaya koyabilmekteyiz (Mishra ve ark., 2014)

İşletmelerde klinik mastitise bağlı kayıplar (Thompson-Crispi ve ark., 2014);

- ✓ Süt üretiminde azalma,
- ✓ Düşük kalitede süt elde edilmesi,
- ✓ Sütün veya süt ürünlerinin tüketim dışı bırakılması,
- ✓ Erken ayıklama işlemi,
- ✓ Veteriner hekim harcamaları,

- ✓ Ekstra ortaya çıkan yönetim uygulama giderleri.

Mastitisin özellikle subklinik formu ekonomik açıdan daha önemlidir. Ekonomik kaybın %70-80'i subklinik mastitislerden kaynaklandığı açıklanmıştır (Özyurtlu ve ark., 2011).

- Direkt olarak süt gelirindeki düşüş,
- Antibiyotikle kontamine sütlerin satılamaması,
- Enfeksiyonla birlikte seyreden süt üretiminde düşme ve çeşitli nedenlerle hayvanların sürüden çıkarılmasıdır.

Klinik ve subklinik mastitise bağlı diğer bir kayıp ise et üretimine yönelik kurulan işletmelerde görülmektedir. Süt kalitesinin ve miktarının düşmesine bağlı olarak kuzularda gelişme geriliği ve ölümcül infeksiyonlara kolay yakalanma gibi durumlar ortaya çıkabilmektedir (Fthenakis ve Jones, 1990; Gelesakis ve ark., 2015).

2.3. Mastitis Hastalığının Sağlık Yönünden Etkileri

Mastitisli hayvanlardan elde edilen ve içerisinde anormallik olan süt ile süt ürünleri insan tüketimine sunulması büyük bir risk yaratır. Klinik ve subklinik mastitislerde sütün yapısında bulunan somatik hücrelerin artış gösterdiği belirlenmektedir. Mastitisli sütlerin yapılan analizinde makrofaj, nötrofil, lökosit, epitel hücreleri ile birlikte bakteriler görülmektedir. Sağlıklı sütlerde, somatik hücre sayısı 150.000 h/ml'den az olarak tespit edilir. Sağlıklı meme ile kaliteli süt üretiminde, hedef 200.000 h/ml'nin altı ve bakteri sayısı ise 50.000 h/ml'den az olarak hesap edilmelidir. Yangısal reaksiyonları görüldüğü meme dohkusunda genelde somatik hücre sayısı 250.000 h/ml'den fazla olur. Özellikle klinik mastitis vakalarında somatik hücre sayısının 2.000.000 h/ml'nin üzerine çıkabildiği görülmektedir. Somatik hücre sayısındaki aşırı artışlardan dolayı sütün kalitesi düşecektir ve süt insan tüketimine sunulamayacaktır (Özyurtlu ve ark., 2011).

1992 yılında oluşturulan ve yayınlanan Avrupa Ekonomik Topluluğu (92/46 sayılı) yönergeye göre somatik hücre sayısı 400.000 h/ml'nin üzerinde olan sütler hiçbir şekilde kullanılmamalıdır ve insan tüketimine sunulmamalıdır. Amerika'da somatik

hücre sayısı, insan tüketimine uygunluk açısından 750.000 h/ml iken Kanada’da ise 500.000 h/ml olarak hesaplanmıştır. Ülkemizde Türk Gıda Kodeksi ile bildirilen somatik hücre sayısı, çiğ veya ısı görmüş sütlerde 500.000 h/ml’den az olarak belirlenmiştir (Özyurtlu ve ark., 2011).

Dünyada çiftlik endüstrisi temel olarak sütün kalitesi, insan sağlığı güvenliği ve çiftlik sağlığı ile ilgili mastitisin yarattığı riskleri takip etmektedir (Su ve ark., 2016). Halk sağlığı yönünden ele alındığında süt ve süt ürünlerinde mastitisten dolayı bulunacak patojen mikroorganizmaların insanlara bulaşma riskleri vardır. Süt kaynaklı tuberkülozis, brucellozis, difteri ve Q fever gibi hastalıklar insanlar açısından önemli bir sorun teşkil edebilir. Yine çiğ sütte bulunabilen *Listeria*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Stafilokok* türleri ve *E. coli* gibi bakteriler insanda gıda kaynaklı problemlere yol açabilmektedir. Ancak, günümüzde uygulanan modern teknikler (pastörizasyon gibi) ve hijyenik üretimler ile bunların önüne geçilebilmektedir.

Ticari süt ve süt ürünlerinde gıda kaynaklı bakterilerin bulaşmasında önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin, verositotoksijenik *E. coli* (VTEC) toplum sağlığı üzerine önemli riskler yaratmaktadır. Ruminantlar (sığır, koyun ve keçi), VTEC’i semptom göstermeden taşıyabilmektedirler. Taşıyıcı olan bu hayvanlar çeşitli vücut atıkları (dışkı ve süt) ile çevrede önemli bir kontaminasyon yaratabilirler. Ticari sütlerin kontaminasyonu, toplama ve depolama sırasında dışkı ile bulaş sonucunda meydana gelebilir. Kontamine olan sütler önemli gıda patojenlerinin insanlara bulaşmasında rol oynayabilir (Oliver ve ark., 2005). 1992 ile 2000 yılları arasında İngiltere ve Wales’de süt kaynaklı salgınların %31 (9)’ünün nedenin VTEC O157 olduğu rapor edilmiştir. Bunların 5’inin ticari sütlerden, 3’ünü pastörize sütlerde ve birinin ise her iki ürünün birleştirilmesi nedeni ortaya çıktığı bildirilmiştir (Gillespie et al., 2003). İsviçre’de yapılan bir çalışmada keçi ve koyun süt örneklerinde VTEC pozitifliğinin sırasıyla %16,3 ve %12,7 olduğu ortaya konulmuştur (Muehlherr ve ark., 2003).

Mastitis ve sağlık arasındaki ilişkide diğer önemli bir nokta da mastitis tedavisi için kullanılan antibiyotiklerin sütte kalıntı bırakmasıdır. Sütteki bu antibiyotik kalıntıları sütün kalitesini etkilediği gibi insan sağlığını da tehdit etmektedir. Bu antibiyotik kalıntıları insanlarda alerjik reaksiyonlara (penisiline duyarlı kişilerde mastitis tedavisinde penisilin kullanılmışsa alerji reaksiyonların görülmesi gibi) ve

antibiyotiklere dirençli suşların gelişimine yol açmaktadır (Demir, 2004; Özyurtlu ve ark., 2011). Ek olarak, bu antibiyotiklerin karaciğer, böbrek, pankreas ve dalak gibi hayati organlar üzerine ciddi zararlı etkileri ortaya çıkabilmektedir (Hadjazi ve ark., 2015; Hasan ve ark., 1989). Sağılan sütte bulunan antibiyotik kalıntısı varsa bunun minimuma inmesi için yasal arınma sürelerinin geçmesi beklendikten sonra tüketilmesi gerekmektedir.

2.4. Mastitis Hastalığının Etiyolojisi

Mastitis olgularında birçok etken izole ve identifiye edilmiştir (Watts ve ark., 1995; Pitkala ark., 2004). Bu etkenlerin çok önemli bir kısmını bakteriler oluşturmaktadır. Mastitis etkeni olarak 130'dan fazla mikroorganizma izole edilmesine rağmen mastitisli süt örneklerinden sıklıkla *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. ve Enterobacteriaceae familyasında yer alan bakteriler (*E. coli* vb.) izole edilmektedir (Quinn ark., 1994; Watts ark., 1995). Daha seyrek olarak da, *Corynebacterium bovis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus* spp., *Candida albicans*, *Cryptococcus* spp, *Nocardia* spp. gibi çeşitli mantar ve bakterilerin neden olduğu bildirilmiştir (Schalm ark., 1971; Arda ve ark., 1979). Türkiye'de farklı bölgelerde yapılan araştırmalarda da *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. ve Enterobacteriaceae familyasına ait bakteriler izole ve identifiye edilmiştir (Alaçam ve ark., 1986; Türütoğlu ve ark., 1995; Tel ve ark., 2009).

Koliform bakterilerin neden olduğu çevresel mastitisler birçok ülkede artış göstermektedir ve bu bakteriler arasında *Escherichia coli* ön sırada gelmektedir. *E. coli* ilk kez 1896 yılında mastitisli sütlerden izole edilmiştir ve 1960'lı yıllardan itibaren sığır mastitislerine neden olan etkenler arasında ikinci sırada yer aldığı bildirilmiştir (Sumathi ve ark., 2008). *E. coli*, özellikle yüksek verimli süt ineklerinde doğum dönemine yakın veya laktasyonun erken döneminde, lokal ve bazen de şiddetli sistemik semptomlarla seyreden mastitise yol açar. Bu durum yüksek verimli süt ineklerinde verim düzeyini ve kalitesini etkileyebildiği gibi enfeksiyonun şiddetli olduğu vakalarda ölüm de şekillenebilir (Burvenich ve ark., 2003; Dinç ve ark., 2012).

Dünyada küçük ruminant sürülerinde mastitis hastalığı, en ciddi ekonomik ve sağlık problemlerinin sebeplerinden biri olarak değerlendirilmektedir (Corrales ve ark., 2004; Osman ve ark., 2013). Küçük ruminant sürülerinde mastitise neden olan etkenler görülme oranlarına göre sınıflandırılmıştır. En yaygın görülen patojenlerin sırasıyla *S. aureus*, *S. agalactiae*, koliformlar ve *Enterococcus* spp. türleri olduğu rapor edilmiştir. Daha az sıklıkta ise *Streptococcus* spp., *P. aeruginosa*, *Mannheimia hemolytica*, *Corynebacteria* spp., CNS patojenlerinin görüldüğü bildirilmiştir (Hawari ve ark., 2014; Contreras ve ark., 2007).

Keçilerde mastitise neden olan mikrobiyolojik ajanların yaygınlığının bölgelere göre değişebileceği görülmüştür. En yaygın tanımlanan etkenin *S. aureus* olduğu ve daha az olarak sırasıyla *P. haemolytica*, *E. coli*, *C. perfringens*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* ve *Nocardia* cinsi bakterilerin belirlendiği rapor edilmiştir (Olechnowicz ve Jaśkowski, 2018).

Koyunlarda meme içi enfeksiyonlara neden olan gram negatif bakteri profili oldukça farklılık gösterebilir. Sütçü koyunlardan izole edilen gram negatif bakterilerin oranı tüm mastitis etkenleri içerisinde %3 oranına tekabül etmektedir. Bu bakterilerin sırasıyla *E.coli*, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Pasteurella multocida*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp. ve *Yersinia pseudotuberculosis* olabileceği bildirilmiştir (Gelasakis ve ark., 2015).

2.5. Mastitis Hastalığı ve Antibiyotik Direnç İlişkisi

Süt endüstrisinde en çok ekonomik kayıba neden olan mastitislerde koruma ve tedavi amacıyla antibiyotikler sıklıkla kullanılmaktadırlar (Srinivasan ve ark., 2007; Bengtsson ve ark., 2009). Mastitis tedavisinde antibiyotiklerin uygun olmayan kullanımı, dirençli suşların gelişmesine yol açmaktadır. Ayrıca, antimikrobiyal direncin ve virulens faktörlerinin konjugasyonla bir diğer bakteriye transferi, patojenik *E. coli* suşlarının ortaya çıkmasına ve yayılmasına katkıda bulunarak problemin büyümesine neden olmaktadır (Srinivasan ve ark., 2007; Sumathi ve ark., 2008).

Antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları içerisinde genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların (GSBL) üretimi en iyi bilinen direnç mekanizmalarından birisidir.

Bu enzimler beta-laktam antibiyotiklerin, betalaktam halkasındaki amid bağlarını parçalayarak antibakteriyel etkisini ortadan kaldıran enzimlerdir ve günümüze dek farklı özellikte en az 340 adet betalaktamaz tanımlanmıştır. *E. coli*, *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp gibi Enterobacteriaceae familyasına ait türler en sık beta-laktamaz üreten mikroorganizmalar arasında yer almaktadırlar (Bush ve ark., 2001; Güdücüoğlu ve ark., 2007). Fakat son yıllarda yeni antibiyotik direnç mekanizmalarının ortaya çıktığı ve çoklu antibiyotik direncinin görüldüğü suşların yayıldığı dikkat çekmektedir.

E. coli, ciddi sağlık endişelerinin oluşturan çoklu antibiyotik direnci(birbirinden bağımsız dört veya daha fazla antibiyotik gruplarına direnç durumu) fenotipine sahip suşlarının yaygınlık gösterdiği önemli bir bakteridir (Aleksun ve Levy, 1997; Ariza ve ark., 1994; Maynard ve ark., 2003). İntegronlarda gen kasetleri, transpozon ve plasmidleri içeren mobil elementler aracılığıyla direncin yayılması söz konusudur (Carattoli, 2001; Hall ve Collis, 1995). Yine *mar* bölgesi düzenleyicilerindeki değişikliklerde çoklu ilaç direnci gösteren suşların ortaya çıkmasına katkı sağlamaktadır (Aleksun ve Levy, 1997; Ariza ve ark., 1994; Oethinger ve ark., 1998).

İntegronlar, genleri yakalayan, kesen ve üretilmelerini sağlayan genetik yapılardır. Ayrıca bu oluşum sıklıkla bakteriler arasında yayılabilmeye izin veren plasmid gibi mobil yapıların içerisinde de bulunabilmektedir. Class 1, 2 ve 3 integronlar antimikrobiyal direncin yayılmasında önemli bir rol oynayabilmektedirler (Partridge ve ark., 2009). Class 1 integronlar 5' korunmuş segment (5'CS) bir integraz gen (*intI1*) ve 3' korunmuş segment (3'-CS) *qecE1+* *sul1* genlerini içerir. Bu bölge, dörtlü amonyum bileşiklere ve sülfonamid antibiyotiklere direncin görülmesini sağlamaktadır (Partridge ve ark., 2009). Ancak, 3'-CS bölgesi kaybına uğramış non- classic class 1 bölgelerine sahip olunabildiği de rapor edilmiştir (Liu ve ark., 2009; Saenz ve ark., 2004).

Sülfonamidler, ilk bulundukları günden itibaren sistemik hastalıklarda ilk kullanılan antibiyotikler içerisinde değerlendirilmektedir (Sköld, 2000). Danimarkada Sülfonamid ve trimetoprim kombinasyonu, hayvan (özellikle domuzlarda) infeksiyonlarını çözmek için en çok kullanılan ikinci antibiyotik olarak bildirilmiştir. Ayrıca insanlarda, dirençli üriner sistem infeksiyonlarının tedavisinde de en çok tercih edilen antibiyotik olmuştur. Hayvanlardan insanlara sülfonamid dirençli *E. coli* suşlarının geçişinin direkt kontakt veya hayvansal ürünlere elle temas sonucunda olduğu

rapor edilmiştir (Hammerum ve ark., 2006). Bulaşmada dikkat çeken diğer bir yolda, kommensal olarak insanların ve hayvanların bağırsak sistemlerinde yaşayan sülfonamid dirençli bakteriler (*E. coli* vb.) tarafından plasmid, transpozon ve integronlar aracılığıyla diğer bakterilere direnç aktarılmasıdır (Guerra ve ark., 2003).

E. coli suşları içerisinde sülfonamid direncinin yayılmasında görev alan üç farklı gen bölgesi bulunmaktadır. Bunlar sırasıyla *sul1*, *sul2* ve *sul3* gen bölgeleridir. *sul1* geni, tipik olarak Class 1 integron bölgesi ile ilişkilidir (Partridge ve ark., 2009). *sul2* geni, streptomisin direnci genlerine bitişik olarak keşfedilmiştir (Bean ve ark., 2009). *sul3* geni ise 3'-CS kaybı görülen class 1 integronlarla bağlantılı olarak tanımlanmıştır (Sunde ve ark., 2008; Antunes ve ark., 2007).

2.6. Mastitis Hastalığında Teşhis Yaklaşımları

Klinik ve subklinik mastitislerin teşhisi detaylı olarak ele alınmalıdır. Mastitisin teşhisinde klinik değerlendirme, bakteriyolojik testler, sütün sitolojik değerlendirilmesi, sütün elektrik iletkenliğinin ölçülmesi ve görüntüleme teknikleri kullanılmaktadır. Sitolojik değerlendirme teknikleri içerisinde direkt ve indirekt yöntemler vardır. Floro-optoelektronik sayaçları ve mikroskopik hücre sayımı yöntemleri ile direkt mastitis tanısı yapılabilmektedir. İndirekt yöntemler içerisinde ise California Mastitis test veya Whiteside testleri bulunmaktadır. Görüntüleme teknikleri içerisinde ultrasonografi, endoskopi ve infrared termografi yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır. Bu teknikleri uygulanması için meme veya meme başı deri sıvıpları, meme kanalı materyali, süt, meme dokusu ve kan gibi örnekler alınabilmektedir (Fragkou ve ark., 2014; Gelasakis ve ark., 2015).

Klinik mastitisin teşhisi genellikle basittir. Klinik bulgular, memede şişme ve ağrı, anormal süt, yüksek rektal sıcaklık ve etkilenen meme dokusunun olduğu bölgeye doğru şekillenen topallık ile kendini gösterir. Klinik bulguların görüldüğü hayvanlarda, bakterinin teşhisi ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması oldukça önemlidir (Mavrogianni ve ark., 2011).

Subklinik mastitisin teşhisi, güçtür ve spesifik testlerin kullanılmasını gerektirir. Subklinik mastitislerin teşhisinde süt örneklerinde bakteriyel izolasyon ile birlik

somatik hücre sayımının iki katına çıkmış olması “gold standart” olarak kabul edilmektedir. Somatik hücre sayımları sırasında eşik değerleri değişebilir. Subklinik mastitisin tahmin edilmesi için bazı araştırmacılar tarafından ilginç bir öneri ortaya atılmıştır. Buna göre başlangıçta somatik hücrelerin sayımının yapılması ve daha sonra bakteriyel teşhis metodlarının kullanılmasının uygun olacağı ortaya atılmıştır (Berthelot ve ark., 2005). Bu araştırmacılar subklinik mastitisin ön görülmesinde, $<0,5 \times 10^6$ veya $>1 \times 10^6$ hücre/ ML^{-1} somatik hücre sayım değerlerinin kullanılmasını ve daha sonra bakteriyel tanımlanmanın yapılarak teşhisin doğrulanması gerektiğini vurgulamışlardır.

Gelecekte, mastitis hastalığının teşhisinde biyokimyasal analizlerin kullanılması öngörülmektedir. Başlangıç çalışmaları içerisinde, koyun sütlerinin proteomları hakkındaki yayınlar dikkat çekmektedir (Pisanu ve ark., 2011; Anagnostopoulos ve ark., 2014). Yakı zamanda, koyunlarda S chromogenes kaynaklı gelişen meme içi infeksiyonların erken teşhisinde uygun potansiyel biomarkerlar rapor edilmiştir (Chiaradia ve ark., 2013). SPA, SPB, C3, Ig1 γ , Ig μ C, ALB ve TTR gibi protein yapıdaki biomarkerların, infekte meme dokusundan salgılanma oranlarının oldukça arttığı bildirilmiştir. Meme içi infeksiyonların hızlı ve doğru teşhisine yönelik uygun moleküllerin belirlenmesine yönelik gelecek araştırmaları için bereketli bir alan olabilecektir.

Süt örneklerinde, direkt olarak bakteriyel nükleik asidin tanımlanması için metodlar (real-time PCR) geliştirilmeye devam etmektedir. Bu çalışmalarda mastitise neden olan bakterilerin etiyolojik özellikleri ile birlikte daha az zaman harcanarak teşhise gidilmesi planlanmaktadır. Burada *S. aureus* için test denemeleri mevcut olmasına rağmen koyun örneklerinde kullanılan hızlı ve finansal olarak uygun rutin testlerin geliştirilmesine yönelik çabaların daha da artması gerektiği görülmektedir (Viguier ve ark., 2009). Örneğin koyun sürülerinde kullanılan test tekniklerinin, sığır mastitisinin teşhisine uygun yapılmış olması önemli bir problem yaratmaktadır. Sığır mastitisinde, *M. haemolytica* daha az önemli bir meme dokusu patojeni iken koyun sürülerinde teşhisi oldukça önem arz etmektedir (Galesakis ve ark., 2015).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Bakteri İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Antibiyogram Testi

Van ili köy işletmelerinden 100 koyun ve 100 keçi olmak üzere toplam 200 süt örneği toplandı. 200 süt örneği klinik veya subklinik mastitis'li hayvanlardan temin edildi. Sütlerin tamamına California Mastitis Testi (CMT) uygulandı (Pirzada ve ark., 2016). Pozitif olan sütlerin tamamından %5 koyun kanlı agara (Acumedia, USA), McConkey agara (MC, Oxoid, UK) ve Eosin Methylene Blue (EMB, Oxoid, UK) agara ekimler yapıldı. Kültürler, 24 saat 37°C'de inkubasyona bırakıldı. Kültürlerin koloni morfolojileri değerlendirildi. Katalaz testi, oksidaz testi ve gram boyama gibi biyokimyasal testleri yapıldı. Bakterilerin identifikasyonu ve antibiyogram testi değerlendirmesi için Vitek 2 Compact (Biomerieux, USA) cihazı kullanıldı. *E. coli* olarak tanımlanan bakteriler -20°C'de stoklandı.

3.2. Genomik Dna Ekstraksiyonu ve Amplifikasyonu

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik mikrobiyoloji Laboratuvarında bakterilerin DNA ekstraksiyonu yapıldı. -20°C'de stoklanmış bakteriler oda sıcaklığında çözündürüldü. Trypton Soy Agara (Acumedia, USA) bakterilerin ekimi yapıldı ve 37°C'de 24 saat inkube edildi. *E. coli* suşlarının DNA'ları, G-Spin™ Total DNAExtraction kit (IntronBio, Korea) protokolü kullanılarak elde edildi. DNA örnekleri -20°C'de stoklandı.

Sülfonamid direnci anlamlı bulunan *E. coli* suşlarının DNA amplifikasyonu gerçekleştirildi. *Sul* genlerine uygun primerler Tablo 1'de verildi. mPCR için 50 µl final solüsyonu olacak şekilde 5 µl kalıp DNA; 200 µM her bir deoksinekleotid trifosfat (Life Technologies); 1.5 U Taq DNA polymerase (abm, Canada); buffer (20 mMTris-HCL, 50 mM KCL) ve 3 mM MgCL₂(Biotools) ayarlandı. mPCR şartları; 94°C'de 2 dk, 94°C'de 20 sn, 54°C'de 45 sn, 72°C'de 60 sn, 72°C'de 5 dk, 40 siklus olacak şekilde ayarlandı. Amplikon ürünleri Thermo EC300XL2 elektroforez cihazında 100 Voltta 2 saat boyunca %1.5'luk agaroz jel üzerinde yürütüldü. Bio-Print- ST4 (VilberLourmant, France) cihazı kullanılarak amplikonlar görüntüledi.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan referans oligonükleotid dizileri

Gen Bölgesi	Primer Sekansı	Baz Büyüklüğü	Referans
<i>sul1</i>	F: 5'-CGGCGTGGGCTACCTGAACG -3' R: 5'-GCCGATCGCGTGAAGTTCCG -3'	433 bp	Urumova, 2016
<i>sul2</i>	F: 5'- CGGCATCGTCAACATAACCT -3' R: 5'- TGTGCGGATGAAGTCAGCTC -3'	721 bp	Urumova, 2016
<i>sul3</i>	F: 5'- CATTCTAGAAAACAGTCGTAGTTTCG -3' R: 5'- CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA -3'	990 bp	Saenz ve ark., 2004

4. BULGULAR

4.1. Bakteri İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Antibiyogram Testi Sonuçları

Van ili ve çevresindeki köy işletmelerinden toplam 100 koyun ve 100 keçi sütü analiz edildi. Klinik muayene ile CMT sonuçlarına göre 36 (%18; 26 koyun ve 10 keçi) klinik mastitis ve 164 (%82; 74 koyun ve 90 keçi) subklinik mastitis vakası tespit edildi. 200 mastitis vakasından alınan süt örneklerinden 36 (%18) *E. coli* izolasyonu yapıldı. *E. coli* suşlarının dağılımlarının 25 koyun (17 subklinik ve 8 klinik mastitis vakası) ve 11 keçiden (9 subklinik ve 2 klinik mastitis vakası) olduğu görüldü. Klinik ve Subklinik mastitis vakalarından izole edilen *E. coli* suşlarının Vitek 2 cihazına göre antibiyotik direnç dağılımları Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Klinik ve Subklinik mastitisli küçük ruminantlardan izole edilen *E. coli* suşlarının antibiyotik direnç oranları

Antibiyotikler	Klinik Mastitis (n=10, %)			Subklinik Mastitis (n=26, %)		
	R	I	S	R	I	S
Ampisilin	3 (30)	2 (20)	5 (50)	11 (42,3)	1 (3,8)	14 (53,9)
A/K*	2 (20)	-	8 (80)	6 (23,1)	3 (11,5)	17 (65,4)
P/T*	4 (40)	1 (10)	5 (50)	4 (15,4)	-	22 (84,6)
Sefazolin	6 (60)	1 (10)	3 (30)	16 (61,5)	1 (3,8)	9 (34,7)
Sefuroksim	6 (60)	-	4 (40)	17 (65,4)	2 (7,7)	7 (26,9)
Sefuroksim Aksetil	4 (40)	2 (20)	4 (40)	12 (46,2)	1 (3,8)	13 (50)
Sefoksitin	3 (30)	2 (20)	5 (50)	15 (57,7)	3 (11,5)	8 (30,8)
Seftazidim	4 (40)	-	6 (60)	14 (53,9)	1 (3,8)	11 (42,3)
Seftriakson	1 (10)	2 (20)	7 (70)	8 (30,8)	4 (15,4)	14 (53,9)
Sefepim	8 (80)	1 (10)	1 (10)	11 (42,3)	1 (3,8)	14 (53,9)
Ertapenem	7 (70)	1 (10)	2 (20)	8 (30,8)	-	18 (69,2)
İmipenem	7 (70)	-	3 (30)	9 (34,7)	1 (3,8)	16 (61,5)
Meropenem	6 (60)	-	4 (40)	9 (34,7)	2 (7,7)	15 (57,7)
Amikasin	4 (40)	-	6 (60)	13 (50)	-	13 (50)
Gentamisin	6 (60)	2 (20)	2 (20)	19 (73,1)	-	7 (26,9)
Siprofloksasin	5 (50)	1 (10)	4 (40)	14 (53,9)	-	12 (46,2)
Levofloksasin	4 (40)	2 (20)	4 (40)	9 (34,7)	-	17 (65,4)
Tigesiklin	3 (30)	1 (10)	6 (60)	4 (15,4)	-	22 (84,6)
Kolistin	-	-	10 (100)	-	-	26 (100)
SXT*	4 (40)	-	6 (60)	17 (65,4)	-	9 (34,7)

* A/K: Amoksisilin/ Klavulanik Asit; P/T: Piperasilin/ Tazobaktam; SXT: Trimetoprim/ Sülfametaksazol; R: Direçli; I: Orta Duyarlı; S: Duyarlı

Klinik mastitis vakalarından izole edilen 10 *E. coli* izolatının antibiyotik duyarlılık analizine göre en yüksek direnci %80 oranında sefepime gösterdiği belirlendi. *E. coli* suşlarının en yüksek duyarlılığı sırasıyla kolistin (%100) ve A/K (80) antibiyotiklerine gösterdiği ortaya konuldu. *E. coli* izolatlarının %40 (4) oranında SXT'e dirençli olduğu bulundu.

Subklinik mastitis vakalarından izole edilen 26 *E. coli* suşunun en yüksek direnci gentamisine (%73,1) gösterdiği belirlendi. *E. coli* izolatlarının en yüksek duyarlılığı sırasıyla kolisitin (%100), P/T (%84,6) ve tigesiklin (%84,6) antibiyotiklerine gösterdiği ortaya konuldu. SXT direncinin %65,4 (17) oranında olduğu tespit edildi.

4.2. Genomik Dna Ekstraksiyon ve Amplifikasyon Sonuçları

Klinik ve Subklinik mastitisli vakalardan toplam 21 (%58,3) *E. coli* izolatının SXT dirençli olduğu belirlendi. Bu izolatların mPCR ile *sul1*, *sul2* ve *sul3* geni taşıyıcılıkları analiz edildi. 21 *E. coli* izolatının sırasıyla 17'sinin *sul1*, 3'ünün *sul2* ve 1'inin *sul3* geni taşıyıcılığının pozitif olduğu belirlendi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gıda elde etmeye yönelik yetiştirilen çiftlik hayvanlarında, bakteriyel infeksiyonlardan korunma ve tedavi amaçlı antimikrobiyal ilaçlaryaygın olarak kullanılmaktadır (McEwen ve Fedorka-Cray, 2002). Ancak, bu tür hayvanlarda kullanılan antimikrobiyal ilaçlara karşı gelişen flora ve patojen bakterilerindeki dirençten kaynaklı dikkatli olunması önem arz etmektedir (Landers ve ark., 2012). Mastitis tedavisinde antibiyotiklerin uygun olmayan kullanımı, dirençli suşların gelişmesine yol açmaktadır. *Esheria coli*, küçük ruminantlarda infeksiyonlardan en yaygın izole edilen patojen bakterilerden biri olarak bildirilmiştir (Sawant ve ark., 2007; Carballo ve ark., 2013). *E. coli* diğer patojen bakteri ve viruslarla karşılaştırıldığı zaman birincil enfeksiyon nedeni olarak tanımlanmışkommensal bir bakteri olarak sınıflandırılmaktadır (Tadesse ve ark., 2012). Ayrıca, antimikrobiyal direncin ve virulens faktörlerinin konjugasyonla bir diğer bakteriye transferi, patojenik *E. coli* suşlarının ortaya çıkmasına ve yayılmasına katkıda bulunarak problemin büyümesine neden olmaktadır (Srinivasan ve ark., 2007; Sumathi ve ark., 2008).

Dünya çapında *E. coli* nedenli oluşan mastitisler ile ilgili çeşitli raporlar paylaşılmıştır (Albenzio ve ark., 2002; Hawari ve ark., 2014). 2017 yılında Ürdün’de yapılan bir çalışmada İvesi koyunlarından alınan 220 süt örneğinin 122’sinin CMT pozitif olduğu bildirilmiştir. Yapılan identifikasyonda 20 *E. coli* izolatu izole edildiği rapor edilmiştir. *E. coli* izolatlarının %15’inin sulfanamid dirençli olduğu ortaya konulmuştur (Hawari ve ark., 2014). Portekiz de yapılan bir çalışmada 18 koyun sürüsünde belirlenen subklinik mastitisli hastalardan alınan sütlerden 2 *E. coli* izole ettiklerini bildirmişlerdir (Queiroga, 2017). Pirzada ve ark. (2016) Pakistanda yaptıkları bir çalışmada keçilerden 200 süt örneği topladıklarını ve bunların %38’nin subklinik mastitis’li olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan identifikasyonda sütlerden %5,26 oranında *E. coli* izolasyonu yapıldığı rapor edilmiştir. Norveç’de yapılan bir çalışmada klinik mastitis görülen koyunlarda 547 meme lobundan alınan süt örneklerinden 35 *E. coli* izole edildiği bildirilmiştir (Mork ve ark., 2007). İtalya’da yapılan bir çalışmada Comisana koyunlarından 60 *E. coli* izole edildiği rapor edilmiştir (Albenzio ve ark., 2002). Cezayir’de yapılan bir çalışmada 845 keçinin 30’unun klinik mastitisli olduğu görülmüştür. 815 keçinin CMT ile subklinik mastitis durumları değerlendirilerek 46

keçinin pozitif olduğu ortaya konulmuştur. Fakat bu vakaların hiçbirinden *E. coli* izolasyonu yapılmadığı rapor edilmiştir (Gabli ve ark., 2019). Hindistan'da Barbari (95) ve Jamunapari (86) keçilerinden 181 süt örneği toplanarak subkilinik mastitis varlığı CMT ile araştırılmıştır. Keçilerden toplanan sütlerin tamamının 36 tanesinin CMT testi sonuçlarının +2 ve daha fazla skora sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sütlerin yapılan mikrobiyolojik değerlendirmesinde her iki keçi türünden toplam 2 *E. coli* izole edildiği bildirilmiştir (Mishra ve ark., 2018). Mısır'ın üç farklı bölgesinden, 189 koyun ve 100 keçiden olmak üzere 289 süt örneği toplanarak CMT testi ile subkilinik mastitis oranı ve bakterilerin rolü araştırılmıştır. %5,88 koyun ve %7 keçinin klinik mastitisli olduğu belirlenmiştir. Koyunların ve keçilerin yapılan CMT testi sonuçlarına göre sırasıyla %13,23 (25) ve %10 (11)'unun subkilinik mastitis pozitif olduğu rapor edilmiştir (Abdalhamed ve ark., 2018). Bu çalışmada, klinik muayene ile CMT sonuçlarına göre 36 (%18; 26 koyun ve 10 keçi) klinik mastitis ve 164 (%82; 74 koyun ve 90 keçi) subkilinik mastitis vakası tespit edildi. 200 mastitis vakasından alınan süt örneklerinden 36 (%18) *E. coli* izolasyonu yapıldı. *E. coli* suşlarının dağılımlarının 25 koyun (17 subkilinik ve 8 klinik mastitis vakası) ve 11 keçiden (9 subkilinik ve 2 klinik mastitis vakası) olduğu belirlendi. Bölgemizde klinik ve subkilinik vakalardan izole edilen *E. coli* oranının önemli bir düzeyde olduğu görüldü. Sağım yapan kişilerin, küçük ruminant meme temizliği ve sanitasyon kurallarına uyma alışkanlıklarının geliştirilmesinin önemli olduğu düşünüldü. Coğrafyamızda, küçük ruminantlarda mastitis oranının önemli düzeyde olduğu ve koyunların daha yatkınlık gösterdiği belirlendi. Olumsuz hava ve ortam şartlarından keçilerin meme dokularının daha az etkilendiği görüldü.

Yapılan çalışmalarda hayvanlardan izole edilen *E. coli* suşlarının antibiyotik direçlilikleri farklılıklar göstermektedir. Kalmus ve ark., 2006 yılında yaptıkları çalışmada mastitisli ineklerden izole ettikleri *E. coli* suşlarının %24.3'ünün ampisiline, %15.6'sının streptomisine, %13.5'inin tetrasikline, %12'sinin trimetoprim-sülfometaksazol %2.2'sinin gentamisine, %1.6'sının enrofloksasine dirençli olduğunu tüm suşların ise sefaperazona duyarlı olduğunu saptamışlardır. Bengtsson ve ark., izole ettikleri mastitis orijinli *E.coli* suşlarının %11'inin streptomisine, %8.6'sının sülfometaksazol %7.4'ünün ampisiline, %4.9'unun tetrasikline, %3.1'inin enrofloksasine, %3.1'inin nalidiksik aside, %1.8'inin kloramfenikole, %6.1'inin tüm

antibiyotiklere karşı dirençli olduğunu, seftiofur ile gentamisine ise tüm suşların duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Avrupa ve kuzey Amerika’da, mastitise neden olan enterik kökenli *E. coli* türlerinde en yüksek direncin oksitetrasiklin ve streptomisin antibiyotiklerine gösterdiği rapor edilmiştir (Guerra, 2003; Checkley ve ark., 2010; Tadesse ve ark., 2012). Amerika’da yapılan bazı çalışmalarda, çoklu ilaç dirençli *E. coli* suşlarında seftiofur ve florfenikol direncinin oldukça düşük olduğu bildirilmiştir (Tadesse ve ark., 2012; Cummings ve ark., 2013). 1993 ile 2013 yılları arasında mastitisli küçük ruminantlardan elde edilmiş respiratorik ve enterik örneklerden izole edilen *E. coli* izolatlarının en yüksek direnci neomisin ve oksitetrasiklin antibiyotiklerine gösterdikleri ortaya konulmuştur. *E. coli* suşlarında SXT duyarlılığının ise %95,9 gibi oldukça düşük bir oranda olduğu bildirilmiştir (Awosile ve ark., 2018). Hindistan’da subklinik mastitisli 30 keçiden toplam 2 *E. coli* izole edildiği ve SXT direncinin belirlenmediği rapor edilmiştir (Mishra ve ark., 2018). Bizim çalışmamızda, klinik mastitis vakalarından izole edilen 10 *E. coli* izolatının antibiyotik duyarlılık analizine göre en yüksek direnci %80 oranında sefepime gösterdiği belirlendi. *E. coli* suşlarının en yüksek duyarlılığı sırasıyla kolistin (%100) ve A/K (80) antibiyotiklerine gösterdiği ortaya konuldu. *E. coli* izolatlarının %40 (4) oranında SXT’e dirençli olduğu bulundu. Subklinik mastitis vakalarında ise, izole edilen 26 *E. coli* suşunun en yüksek direnci gentamisine (%73,1) gösterdiği belirlendi. *E. coli* izolatlarının en yüksek duyarlılığı sırasıyla kolisitin (%100), P/T (%84,6) ve tigesiklin (%84,6) antibiyotiklerine gösterdiği ortaya konuldu. SXT direncinin %65,4 (17) oranında olduğu tespit edildi. Mastitisli koyun ve keçilerden izole ettiğimiz *E. coli* izolatlarının antibiyotik direncinin birbirinden farklı olduğu ortaya konuldu. Bu farklılığın maruz kalınan ortamadaki kolonize *E. coli* bakterisinin özelliklerinin birbirinden farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

1932 yılında ilk olarak sülfonamid keşfedilmiştir ve 1935 yılında bir yayımla dünyaya bildirilmiştir (Domagk, 1935). 1962 yılında ise, İngiltere’de trimetoprim keşfedilmiştir (Huovinen, 1987). Sülfonamidler, bulundukları günden itibaren sistemik infeksiyonların tedavisine yönelik tercih edilen antibiyotiklerin başında gelmektedir. 2000’li yılların başında, sülfonamid direnç genleri olarak *sul1* ve *sul2* genleri bilinmekteydi. Bu genlerin plazmidler aracılığıyla aktarıldığı ve dihydropteroate sentez enzimlerini sitümile ederek sülfonamid direncini ortaya çıkardığı belirlenmiştir (Skold,

2000). 2003 yılında, domuzdan izole edilen *E. coli* suşunda üçüncü bir sülfonamid direnç geninin (*sul3*) varlığı ortaya konulmuştur (Perreten ve Boerlin, 2003). *sul3* geninin ortaya çıkması ile birlikte birçok ülkede sülfonamid antibiyotiklerin kullanımının sınırlandırılmasına rağmen yayılımın pozitif yönde ilerlediği görülmüştür. Bu durumun ortaya çıkmasında, Veteriner hekimlikte trimetoprim/sulfametoksazol ilacının kullanımının oldukça fazla olmasının etkili olabileceği düşünülmüştür (Liu ve ark., 2009). Yapılan araştırmalar sonucunda mastitisli koyun ve keçilerden izole edilen *E. coli* izolatlarında *sul* direnç genleri ile ilgili herhangi detaylı bir bilgiye ulaşılamamıştır. Bu genlerin varlığı ve yaygınlığı ile ilgili farklı literatür bilgilerin paylaşılması sonucunda konunun önemi aktarılacaktır. *sul* genlerinin varlığı ve yaygınlığı ile ilgili insan ve hayvanlarda yapılan farklı çalışmalar bildirilmiştir (Vinue ve ark., 2010; Yin ve ark., 2017). İspanyada insanlardan alınan kan kültür örneklerinden 135 *E. coli* izole edilmiştir. Bunların 71 tanesinin fenotipik olarak sulfanamid direnci gösterdiği ve 63 tanesinin ise en az bir *sul* geni taşıdığı bildirilmiştir (Vinue ve ark., 2010). Poeta ve ark.'nın (2010) yaptıkları çalışmada 52 *E. coli* suşu izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bunların 22 tanesinin enteropatojenik *E. coli* olduğunu tespit etmişlerdir. 22 izolattan 9 tanesinin trimetoprim- suphametoksazole (%40,1) dirençli olduğunu bildirmişlerdir. 4 izolatın *sul1*, 2 izolatın *sul2* ve 3 izolatın ise *sul1/sul2/sul3* genlerinden en az iki tanesini aynı anda taşıdığı bildirilmiştir. Antibiyotiklerin 1930'dan itibaren kullanılması ile birlikte gelişen direnç genleri toplum üzerinde endişe verici düzeylere ulaşmıştır. Son yıllarda bu endişelerin artmasındaki en büyük faktörlerden bir tanesinde aquatik çevrede yapılan çalışmalar olmuştur (Yang ve ark., 2017; Yang ve ark., 2018). Fabrikalar, hastaneler, bitki ilaçları ve çiftliklerden ortama salınan atık suların önemli bir antibiyotik direnç geni taşıyıcısı olduğu bildirilmiştir (Zhu ve ark., 2013). Çinde, 15 farklı gölde yapılan analizde *sul1* ve *sul2* genlerinin önemli ölçüde yaygınlık gösterdiği bildirilmiştir. *sul3* genlerinin ise daha az oranda görüldüğünü rapor etmişlerdir (Yang ve ark., 2017). İnsanlardan, hayvanlardan ve çevreden toplanan materyallerden yapılan bir çalışmada *E. coli* izolatlarının *sul* geni taşıyıcılığı analiz edilmiştir. 11 izolatın *sul1* geni ve 12 izolatın *sul2* geni taşıdığı bildirilmiştir. 8 izolatın ise her iki geni aynı anda taşıdığı rapor edilmiştir. *sul3* geni analizinde 6 izolatın taşıyıcı olduğu görülmüştür (Saenz ve ark., 2004). Bulgaristan'da yapılan bir çalışmada domuzlardan elde edilen 540 *E. coli* izolatının sulfametoksazole direncinin %57,7 (312)

olduğu bildirilmiştir. *sul1* ve *sul2* gen analizlerinde sırasıyla %20,3 ve %21,2 olduğu ortaya konulmuştur. Çalışmamızda, Klinik ve Subklinik mastitisli vakalardan toplam 21 (%58,3) *E. coli* izolatının SXT dirençli olduğu belirlendi. Bu izolatların mPCR ile *sul1*, *sul2* ve *sul3* geni taşıyıcılıkları analiz edildi. 21 *E. coli* izolatının sırasıyla 17'sinin *sul1*, 3'ünün *sul2* ve 1'inin *sul3* geni taşıyıcılığının pozitif olduğu belirlendi. Bölgemizde, *E. coli* izolatlarında *sul1* geni aktivitesinin diğer genlere göre daha yüksek oranda yayılabildiği görüldü. Bu durumun ortaya çıkmasında, bölgemizde insan ve hayvanlarda *sul1* geni pozitif *E. coli* kolonizasyon oranının ve çevre kontaminasyonunun yüksek olmasının bir sonucu olduğu düşünüldü.

Sonuç olarak, Van ili ve çevresinde köy işletmelerinde yetiştirilen koyun ile keçilerde subklinik mastitis oranının yüksek olduğu tespit edildi. Subklinik mastitis olgularından en etkili antibiyotiklerin kolisitin, P/T ve tigesiklin olduğu ortaya konuldu. Klinik mastitis vakalarında ise kolistin ve A/K tedavide en etkili antibiyotikler olduğu belirlendi. Subklinik mastitisin ekonomik kaybın azaltılması için daha fazla bilimsel çalışma yapılması, yetiştiricilerin sağım hijyeni ve kuru dönem tedavisindeki bilgi eksiklerinin giderilmesi ve kuru dönem tedavisinin nasıl sağlanacağı konularında eğitilmesi gerektiği kanısına varıldı. İnsanlarda ise birçok enfeksiyona neden olan *E.coli* bakterisinin doğru tanımlanmasının ve buna göre tedavi planlanmasının yapılmasının oluşacak riskli kolonizasyonunun önlenmesinde etkili olacağı kanaatine varıldı.

KAYNAKLAR

- Abdalhamed AM, Zeedan GSG, Zeina HAAA. Isolation and identification of bacteria causing mastitis in small ruminants and their susceptibility to antibiotics, honey, essential oils, and plant extracts. *Vet World*. 2018; 11(3): 355.
- Ağca H. *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üretimleri ve antibiyotik duyarlılık oranları. *Deü Tıp Fak Derg*. 2011; 25(3): 169-173.
- Alaçam E, Tekeli T, Erganifl O, Ezgi AN. İnek ve Mandalarda Subklinik Mastitislerin Tanısı, Etkenlerin izolasyonu ve Bunlara Karşı Etkili Antibiyotiklerin Belirlenmesi. *Selçuk Üniv Vet Fak Derg*. 1989; 5: 91-101.
- Albenzio M, Taibi L, Muscio A, Sevi A. Prevalence and etiology of subclinical mastitis in intensively managed flocks and related changes in the yield and quality of ewe milk. *S Rum Res*. 2002; 43(3): 219-226.
- Alekshun MN ve Levy SB. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the mar regulon. *Antimicrob Agent Chemother*. 1997; 41(10): 2067.
- Anagnostopoulos AK, Katsafadou AI, Tsangari M, Arsenos G, Skoufos I, Tzora A. Proteomic analysis of milk of Greek indigenous breed *Capra prisca*. In *Proceedings of the 3rd Greek Farm Animal Veterinary Conference, Ioannina, Greece, 2014*, 138-139.
- Antunes P, Machado J, Peixe L. Dissemination of sul3-containing elements linked to class 1 integrons with an unusual 3' conserved sequence region among *Salmonella* isolates. *Antimicrob Agent Chemother*. 2007; 51(4): 1545-1548.
- Arda M ve Istanbuluoglu E. Mastitislere neden olan aerob, anaerob ve mantarların izolasyonu, identifikasyonu, bunlara karşı etkili olan antibiyotik ve fungusitlerin saptanması. *Ankara Üni Vet Fak Derg*. 1979; 26: 14-29.
- Ariza RR, Cohen SP, Bachhawat N, Levy SB, Demple B. Repressor mutations in the marRAB operon that activate oxidative stress genes and multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1994; 176(1): 143-148.
- Awosile BB, Heider LC, Saab ME, McClure JT. Antimicrobial resistance in mastitis, respiratory and enteric bacteria isolated from ruminant animals from the Atlantic Provinces of Canada from 1994-2013. *Can Vet J*. 2018; 59: 1099-1104.
- Bean DC, Livermore DM, Hall LM. Plasmids imparting sulfonamide resistance in *Escherichia coli*: implications for persistence. *Antimicrob Agent Chemother*. 2009; 53(3): 1088-1093.
- Benavides J, González L, Dagleish M, Pérez V. Diagnostic pathology in microbial diseases of sheep or goats. *Vet Microbiol*. 2015; 181(1-2): 15-26.
- Bengtsson B, Greko C. Antibiotic resistance Consequences for animal health, welfare, and food production. *Ups J Med Sci*. 2014;119:96-102.
- Bengtsson B, Unnerstad HE, Ekman T, Artursson K, Nilsson-Öst M, Waller KP. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. *Vet Microbiol*. 2009; 136(1-2): 142-149.

- Bergonier D ve Berthelot X. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livest Prod Sci.* 2003; 79: 1–16.
- Blondeau JM ve Tillotson GS. Formula to help select rational antimicrobial therapy (FRAT): Its application to community- and hospital-acquired urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agent.* 1999;12:145–150.
- Burvenich C, van Merris, V, Mehrzad J, Diez-Fraile A, Duchateau L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet Res.* 2003; 34(5): 521-564.
- Bush K. New β -lactamases in Gram negative bacteria:diversity and impact on selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis.* 2001; 3: 1085-1089.
- Carattoli A. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet Res.* 2001; 32(3-4): 243-259.
- Carballo M, Esperón F, Sacristán C. Occurrence of tetracycline residues and antimicrobial resistance in gram negative bacteria isolates from cattle farms in Spain. *Adv Biosci Biotechnol.* 2013;4:295–303.
- Castro-Alonso A, De la Fe C, de Los Monteros AE, Rodríguez F, Andrada M, Poveda J. Chronological and immunohistochemical characterization of the mammary immunoinflammatory response in experimental caprine contagious agalactia. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010; 136(1-2): 43-54.
- Checkley SL, Campbell JR, Waldner CL, Dowling PM, Chirino-Trejo M. A retrospective diagnostic laboratory survey of antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolated from spring calves in western Canada. *Can Vet J.* 2010;51:1283.
- Chiaradia E, Valiani A, Tartaglia M, Scoppetta F, Renzone G, Arena S. Ovine subclinical mastitis: Proteomic analysis of whey and milk fat globules unveils putative diagnostic biomarkers in milk. *J Proteom.* 2013; 83: 144-159.
- Cohen SP, McMurry LM, Hooper DC, Wolfson JS, Levy SB. Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to *OmpF* reduction. *Antimicrob Agent Chemother.* 1989; 33(8): 1318-1325.
- Contreras A, Sierra D, Sánchez A, Corrales JC, Marco JC, Paape MJ ve ark. Mastitis in small ruminants. *S Rum Res.* 2007; 68(1-2): 145-153.
- Contreras A, Sierra D, Corrales JC, Sanchez A, Marco J. Physiological threshold of somatic cell count and California Mastitis Test for diagnosis of caprine subclinical mastitis. *Small Rumin Res.* 1996; 21(3): 259-264.
- Cummings KJ, Aprea VA, Altier C. Antimicrobial resistance trends among *Escherichia coli* isolates obtained from dairy cattle in the Northeastern United States, 2004–2011. *Foodborne Pathog Dis.* 2013;11:61–67.
- Dinc G, Ata Z, Temelli S Investigation of extended-spectrum beta-laktamase activity and antibiotic resistance profile of *Escherichia coli* strains isolated from bovine mastitis. *Ankara Üni Vet Fak Derg.* 2012; 59(2): 85-88.

Domagk G., Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen, Dtsch. Med. Wochenschr. 1935; 7: 250-253.

Fragkou IA, Boscus CM, Fthenakis GC. Diagnosis of clinical or subclinical mastitis in ewes. Small Rumin Res. 2014; 118(1-3): 86-92.

Fthenakis GC. Prevalence and aetiology of subclinical mastitis in ewes of Southern Greece. S Ruminant Res. 1994;13(3): 293-300.

Fthenakis GC ve Jones JET. The effect of experimentally induced subclinical mastitis on milk yield of ewes and on the growth of lambs. British Vet J. 1990; 146(1): 43-49.

Gabli Z, Djerrou Z, Gabli AE, Bensalem M. Prevalence of mastitis in dairy goat farms in Eastern Algeria. Vet World. 2019; 12(10): 1563.

Gelasakis AI, Mavrogianni VS, Petridis IG, Vasileiou NGC, Fthenakis GC. Mastitis in sheep—The last 10 years and the future of research. Vet Microbiol. 2015; 181(1-2): 136-146.

Gillespie IA, Adak GK, Brien SJO, Bolton FJ. Milkborne general outbreaks of infectious intestinal disease, England and Wales, 1992–2000. Epidemiol Infect. 2003; 130: 461–468.

Guerra B. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German Escherichia coli isolates from cattle, swine and poultry. J Antimicrob Chemother. 2003;52:489–492.

Güdücüoğlu H, Baykal S, İzci H, Berktaş M. Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üreten Escherichia coli ve Klebsiella pneumoniae suşlarının antibiyotiklere direnci. ANKEM Derg. 2007; 21: 155-160.

Hadjazi D, Larbi DK, Reffas FZI, Benine ML, Abbouni B. Antibacterial activity of the essential oils of Nigella sativa L. against pathogens bacteria. Glob J Biotechnol Biochem Res. 2015; 10: 100-105.

Hall RM ve Collis CM. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site- specific recombination. Molecul Microbiol. 1995; 15(4): 593-600.

Hammerum AM, Sandvang D, Andersen SR, Seyfarth AM, Porsbo LJ, Frimodt-Møller N. Detection of sul1, sul2 and sul3 in sulphonamide resistant Escherichia coli isolates obtained from healthy humans, pork and pigs in Denmark. Int J Food Microbiol. 2006; 106(2): 235-237.

Hasan CM, Ahsan M Islam SN. In-vitro antimicrobial screening of the oils of Nigella sativa seeds. Bangladesh J. Bot. 1989; 18: 172-174.

Hawari AD, Obeidat M, Awaisheh SS, Al-Daghistani HI, Al-Abbadi AA, Omar SS ve ark. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in Awassi sheep in Al-Balqa province of Jordan. American J An Vet Sci. 2014; 9(2); 116-121.

Huovinen P. Trimethoprim resistance, Antimicrob. Agents Chemother. 1987; 31: 1451-1456.

Kalmus P, Viltrop A, Aasmäe B, Kask K. Occurrence of clinical mastitis in primiparous Estonian dairy cows in different housing conditions. Acta Vet Scan. 2006; 48(1): 21.

- Landers TF, Cohen B, Wittum TE, Larson EL. A review of antibiotic use in food animals: Perspective, policy, and potential. *Public Health Rep.* 2012;127:4–22.
- Leitner G, Merin U, Silanikove N. Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goats. *J Dairy Sci.* 2004; 87(6): 1719-1726.
- Liu J, Keelan P, Bennett PM, Enne VI. Characterization of a novel macrolide efflux gene, *mef* (B), found linked to *sul3* in porcine *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63(3): 423-426.
- Lubbers BV ve Hanzlicek GA. Antimicrobial multidrug resistance and coresistance patterns of *Mannheimia haemolytica* isolated from bovine respiratory disease cases: A three-year (2009–2011) retrospective analysis. *J Vet Diagn Invest.* 2013;25:413–417.
- Mavrogianni VS, Menzies PI, Fragkou IA, Fthenakis GC. Principles of mastitis treatment in sheep and goats. *The Veterinary clinics of North America. F Anim Pract.* 2011; 27(1): 115-120.
- Maynard C, Fairbrother JM, Bekal S, Sanschagrin F, Levesque RC, Brousseau R, Harel J. Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149: K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrob Agent Chemother.* 2003; 47(10): 3214-3221.
- McEwen SA ve Fedorka-Cray PJ. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin Infect Dis.* 2002;34:93–106.
- Mishra AK, Sharma N, Singh DD, Gururaj K. Prevalence and bacterial etiology of subclinical mastitis in goats reared in organized farms. *Vet World.* 2018; 11(1): 20.
- Mørk T, Waage S, Tollersrud T, Kvitle B, Sviland S. Clinical mastitis in ewes; bacteriology, epidemiology and clinical features. *Acta Vet Scan.* 2007; 49(1): 23.
- Muehlherr JE, Zweifel C, Corti S, Blanco JE, Stephan R. Microbiological quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland. *J. Dairy Sci.* 2003; 86: 3849–3856.
- Murphy M, Buckley JF, Whyte P, O'mahony M, Anderson W, Wall PG. Surveillance of dairy production holdings supplying raw milk to the farmhouse cheese sector for *Escherichia coli* O157, O26 and O111. *Zoon Pub Health.* 2007; 54(9- 10): 358-365.
- Oethinger M, Podglajen I, Kern WV, Levy SB. Overexpression of the *marA* or *soxS* Regulatory Gene in Clinical Topoisomerase Mutants of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agent Chemother.* 1998; 42(8): 2089-2094.
- Olechnowicz J and Jaśkowski JM. Mastitis in small ruminants. *Med. Weter.* 2014; 70(2): 67-72.
- Oliver SP, Jayarao BM, Almeida RA. 2005: Foodborne pathogens, mastitis, milk quality, and dairy food safety. NMC Annual Meeting Proceedings 3–27 http://www.agr.wa.gov/FoodAnimal/Dairy/docs/FoodBorne_Pathogens.pdf [last accessed on 3rd of August, 2007].
- Omar S and Mat-Kamir NF. Isolation and identification of common bacteria causing subclinical mastitis in dairy goats. *Int. Food Res. J.* 2018; 25(4): 1668-1674.
- Osman KM, Zolinkov TR, Samir A, Orabi A. Prevalence, pathogenic capability, virulence genes, biofilm formation and antibiotic resistance of *Listeria* in goat and sheep milk confirms need of hygienic milking conditions. *Path Glob Health.* 2013; 108; 21-29.

- Öztürk CE, Albayrak HT, Altınöz A, Ankaralı H *Pseudomonas Aeruginosa* Suşlarında Antibiyotiklere Direnç ve Beta-Laktamaz Oranları. *Ankem Derg.* 2010; 24(3): 117-123.
- Özyurtlu N. İneklerde mastitisin ekonomik ve sağlık açısından önemi. *Dicle Üni Vet Fak Derg.* 2011; (1): 36-38.
- Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev.* 2009; 33(4): 757-784.
- Perreten V ve Boerlin P. A new sulfonamide resistance gene (sul3) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 1169-72.
- Pirzada M, Malhi KK, Kamboh AA, Rind R, Abro SH, Lakho SA ve ark. Prevalence of subclinical mastitis in dairy goats caused by bacterial species. *J. Anim. Health Prod.* 2016; 4(2): 55-59.
- Pisanu S, Ghisaura S, Pagnozzi D, Biossa G, Tanca A, Roggio T. The sheep milk fat globule membrane proteome. *J Proteomic.* 2011; 4(3): 350-358.
- Pitkala A, Haveri M, Pyorala S, Myllys V, HonkanenBuzalski T. Bovine mastitis in Finland 2001 Prevalence, distribution of bacteria and antimicrobial resistance. *J Dairy Sci.* 2004; 87: 2433-2441.
- Poeta P, Radhouani H, Goncalves A, Figueiredo N, Carvalho C, Rodrigues J. Genetic Characterization of Antibiotic Resistance in Enteropathogenic *Escherichia coli* Carrying Extended- Spectrum β - Lactamases Recovered from Diarrhoeic Rabbits. *Z Pub Health.* 2010; 57(3): 162-170.
- Queiroga MC. Prevalence and aetiology of sheep mastitis in Alentejo region of Portugal. *S Rumin Res.* 2017; 153: 123-130.
- Quinn PJ, Carter ME, Mc Key B, Carter GR. *Clinical Veterinary Microbiology*, Spain: Wolfe Pub, 1994.
- Quintana AMV, Martín MIR. Influence of somatic cell count on hard ewe's milk cheese. In *Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference*; 2005; The Netherlands; 918.
- Radostitis OM, Leslie KE, Fetrow, J. Mastitis control in dairy herds. *H Health F An Product Med.* 1994: 229-273.
- Rovai M, Caja G, Quevedo JM, Manuelian CL, Saldo J, Salama AA ve ark. Effect of subclinical intramammary infection on milk quality in dairy sheep: II. Matured-pressed cheese (Manchego) produced from milk of uninfected and infected glands and from their blends. *S Rumin Res.* 2015; 126: 59-67.
- Sáenz Y, Brinas L, Domínguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J ve ark. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Ant Agent Chemoth.* 2004; 48(10): 3996-4001.
- Sawant AA, Hegde NV, Straley BA. Antimicrobial-resistant enteric bacteria from dairy cattle. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73: 156-163.
- Schalm OW, Carroll EJ, Jain NC *Bovine mastitis*. Philadelphia, Lea & Febiger, USA. 1971.

- Silanikove N, Shapiro F, Leitner G, Merin U. Subclinical mastitis affects the plasmin system, milk composition and curd yield in sheep and goats: comparative aspects. In: Hogeveen, H. (Ed.), *Mastitis in Dairy Production*. Wageningen Academic Press Publishers; The Netherlands; 2005: 511–516.
- Skold O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist Update*. 2000; 3: 155–60.
- Sköld O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Res Updates*. 2000; 3(3): 155-160.
- Srinivasan V, Gillespie BE, Lewis MJ, Nguyen LT, Headrick SI, Schukken YH. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with mastitis. *Vet Microbiol*. 2007; 124(3-4): 319-328.
- Su Y, Yu CY, Tsai Y, Wang SH, Lee C, Chu C. Fluoroquinolone-resistant and extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from the milk of cows with clinical mastitis in Southern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*. 2016; 49(6): 892-901.
- Sumathi BR, Veeregowda BM, Amitha RG. Prevalence and antibiogram profile of bacterial isolates from clinical bovine mastitis. *Vet World*. 2008; 1(8): 237-8.
- Sunde M, Solheim H, Slettemeås JS. Genetic linkage between class 1 integrons with the *dfpA12-orfF-aadA2* cassette array and *sul3* in *Escherichia coli*. *Vet Microbiol*. 2008; 130(3-4): 422.
- Tadesse DA, Zhao S, Tong E. Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950–2002. *Emerg Infect Dis*. 2012; 18: 741–749.
- Tel OY, Keskin O, Zonturlu AK, Arserim K. Subclinical mastitis prevalence and determination of the antibiotics susceptibility in Şanlıurfa region. *Sağ Bil Vet Derg Fırat Üni*. 2009; 23(2): 101-106.
- Thompson-Crispi K, Atalla, H., Miglior, F. and Mallard, B.A. Bovine mastitis: Frontiers in immunogenetics. *Front. Immunol.*, 5: 1-10.
- Mishra, A.K., Shalini, Sharma, N., Kumar, A. and Shivasharanappa, N. (2014) Prevalence of subclinical mastitis in different breeds of goats. *Vet. Pract*. 2014; 15(1): 140-141.
- Türütoğlu H, Ateşoğlu A, Salihoğlu H, Öztürk M Marmara bölgesi süt ineklerinde mastitise neden olan aerobik etkenler. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg*. 1995; 26 (2): 125-137.
- van der Molen EJ ve Houwers DJ. Indurative lymphocytic mastitis in sheep after experimental infection with maedivisna virus. *Vet Q*. 1987; 9(3): 193-202.
- Vasileiou NGC, Giannakopoulos A, Cripps PJ, Ioannidi KS, Chatzopoulos DC, Gougoulis DA. Study of potential environmental factors predisposing ewes to subclinical mastitis in Greece. *C Immunol Microbiol Infect Dis*. 2019; 62: 40-45.
- Viguiet C, Arora S, Gilmartin N, Welbeck K, O’Kennedy R. Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trend Biotechnol*. 2009; 27(8): 486-493.
- Vinué L, Sáenz Y, Rojo-Bezales B, Olarte I, Undabeitia E, Somalo S ve ark. Genetic environment of *sul* genes and characterisation of integrons in *Escherichia coli* isolates of blood origin in a Spanish hospital. *Int J Ant Agent*. 2010; 35(5): 492-496.

- Watkins GH ve Jones JET. Mastitis and contagious agalactia. *Dis Sheep*. 2007; 120: 99.
- Watts JL, Salmon SA, Yancey R J, Nickerson SC, Weaver LJ, Holmberg C, Fox LK. Antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from the mammary glands of dairy heifers. *J Dairy Sci*. 1995; 78(7): 1637-1648.
- Winter A. Mastitis in ewes. *Pract*. 2001; 23(3): 160-163.
- Yang Y, Liu W, Xu C, Wei B, Wang J. Antibiotic resistance genes in lakes from middle and lower reaches of the Yangtze River, China: effect of land use and sediment characteristics. *Chemosph*. 2017; 178: 19-25.
- Yang Y, Song W, Lin H, Wang W, Du L, Xing W. Antibiotics and antibiotic resistance genes in global lakes: A review and meta-analysis. *Environ Int*. 2018; 116: 60-73.
- Yaylak E. Siyah Alaca ineklerde sürüden çıkarılma nedenleri, sürü ömrü ve damızlıkta yararlanma süresi. *Mediterranean Agricult Sci*. 2003; 16(2): 179-185.
- Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z ve ark. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-3 in *Escherichia coli*. *mBio*. 2017; 8(3): 543-17.
- Zhu YG, Johnson TA, Su JQ, Qiao M, Guo GX, Stedtfeld RD. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proc Nat A Sci*. 2013; 110(9): 3435-3440.

EK 1. Etik Kurul Raporu

Evrak Tarih ve Sayısı: 14/03/2019-21543



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



Sayı : 27552122-604.01.02-E.21543
Konu : Dr. Öğr. Üyesi Ömer AKGÜL'e ait
Onay Gerektirmeyen Belge

14/03/2019

Sayın Dr. Öğr. Ü. Ömer AKGÜL

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 07.03.2019 tarih ve 02 sayılı karar gereğince; Yürütücülüğünü yapmış olduğumuz, "Koyun ve keçi sütlerinden izole edilen *E. coli*'de sul genlerinin araştırılması" adlı çalışma ile ilgili, 15 Şubat 2014 tarih ve 28914 sayı ile yayınladığı yönetmeliğin 2. Maddesi 2. Fıkrasının b bendinde yer alan "Bu Yönetmelik; Deneyisel olmayan klinik veteriner hekimliği uygulamalarını kapsamaz." hükmü gereğince VAN YUHADYER'ten Çalışma ve Araştırma Kesin Sonuç Onay Belgeleri alınmasına gerek olmadığına karar verilmiştir.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Semiha DEDE
Etik Kurulu Başkanı

Ek: Dr. Öğr. Üyesi Ömer AKGÜL (1 sayfa)

Adres: Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Zevce
Kampüsü 65080 Tuşba / Van
Telefon: +90 432 2251701-04 / +90 4445065 Faks: +90 432 4865413
e-Posta: yuhadyer@yyu.edu.tr Elektronik Ad: http://www.yyu.edu.tr

Ayrıntılı bilgi için lütfen: Mehmet Şah ÖZÜZ
Ünvan: Bilgiye İşleri
Dahili No: 22007

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-2: Tez Orjinallik Raporu

	T.C. VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ Sağlık Bilimleri Enstitüsü	
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU		

Tarih: 16/01/2020
Tez Başlığı / Konusu: Koyun ve Keçi Sütlerinden İzole Edilen <i>E.coli</i> 'de Sul Genlerinin Araştırılması
Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 32 sayfalık kısmına ilişkin, 16/01/2020 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %13 (on üç)'dür. <u>Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:</u> - Kabul ve onay sayfası hariç, - Teşekkür hariç, - İçindekiler hariç, - Simge ve kısaltmalar hariç, - Gereç ve yöntemler hariç, - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, -Tezden çıkan yayınlar hariç, - 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words) Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim. Gereğini bilgilerinize arz ederim. Mehmet KORKMAZ İmza

Öğrencinin Adı Soyadı	Mehmet KORKMAZ
Anabilim Dalı	: Eczacılık Temel Bilimleri
Öğrenci No	16930006007
Programı	: ☒ Yüksek Lisans ☐ Doktora

DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR Dr. Öğr. Üyesi Ömer AKGÜL	ENSTİTÜ ONAYI UYGUNDUR Dr. Öğr. Üyesi Alperen DEĞİRMENCİ
---	--