

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIĞIR MASTİTİSLERİNDEN STREPTOKOK TÜRLERİNİN
İZOLASYONU VE MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ**

Seyda ÇETİN

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. MEHMET AKAN

2010-ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIĞIR MASTİTİSLERİNDEN STREPTOKOK TÜRLERİNİN
İZOLASYONU VE MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ**

Seyda ÇETİN

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. MEHMET AKAN

2010-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Mikrobiyoloji Doktora **Programı**
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki juri tarafından
Doktora **Tezi** olarak Kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 06/01/2010

Prof. Dr. Müjgan İZGÜR
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof.Dr. Serdar DİKER
Ankara Üniversitesi

Prof.Dr. Mehmet AKAN
Ankara Üniversitesi
Raportör

Prof.Dr. Ayhan BAŞTAN
Ankara Üniversitesi

Doç.Dr. Murat YILDIRIM
Kırıkkale Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	vii
Çizelgeler	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Mastitis	1
1.2.Mastitisin Önemi	1
1.3..Bulaşıcı ve Çevresel Mastitis	2
1.4. Enfeksiyonun klinik ve subklinik formları	4
1.5.Streptokokkal Mastitisler	5
1.5.1. Streptokokların Taksonomisi	5
1.5.2. Streptokokların Mastitis Enfeksiyonlarındaki Durumu	6
1.5.3.. <i>Streptococcus agalactiae</i>	9
1.5.4 . <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	12
1.5.5. <i>Streptococcus uberis</i>	13
1.6.Streptokok Mastitislerinin Laboratuvar Tanısı	19
1.7. Koruma ve Kontrol	25
2.GEREÇ VE YÖNTEM	26
2.1.Gereç	26
2.1.1.Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar	26
2.1.2. PCR 'da Kullanılan Buffer, Solüsyon, Primer ve Enzimler	28
2.1.3. PCR 'da Kullanılan Alet ve Ekipmanlar	28
2.2.Yöntem	29
2.2.1.İzolasyon ve İdentifikasyon	29

2.2.1.1. Eskulin Testi	29
2.2.1.2.CAMP Testi	29
2.2.1.3.Na-Hippurat Testi	30
2.2.1.4. Hemaglütinasyon Testi	30
2.2.1.5. Hemoliz	30
2.2.1.6. Lancefield Gruplandırması	30
2.2.2.Moleküler Analiz	31
2.2.2.1.DNA Eldesi (Ekstraksiyon)	31
2.2.2.2.RFLP-PCR	32
2.2.2.3.RAPD-PCR	33
2.2.2.4. Elektroforez	33
3.BULGULAR	35
3.1.İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	35
3.2.Moleküler Analiz Bulguları	37
3.3.Konvansiyonel ve Moleküler Tekniklerin Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi	41
4.TARTIŞMA	43
5.SONUÇ VE ÖNERİLER	50
ÖZET	52
SUMMARY	54
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	63

ÖNSÖZ

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

Mastitise neden olan streptokok etkenlerinin laboratuvar da konvansiyonel olarak teşhisi hem uzun sürede sonuç vermekte hem de kullanılan biyokimyasal testlerin etkenlere bağlı farklı reaksiyonlar oluşturması nedeniyle hatalı sonuçlar alınmaktadır. Bu nedenle son zamanlarda geliştirilen pek çok moleküler metot hızlı ve güvenilir bir teşhis için tercih edilmektedir. Bu metodlar streptokok etkenlerinin cins ve tür düzeyinde teşhisi yanında, tür içerisindeki genetik yakınlıkları, moleküler epidemiyolojileri, direnç ve virulens mekanizmaları gibi pek çok özelliğın belirlenmesini sağlamaktadır.

Doktora tez çalışmam sırasında büyük desteklerini gördüğüm danışman hocam Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Mehmet AKAN başta olmak üzere, tez izleme komitemde bulunan Sayın Prof. Dr. Müjgan İZGÜR ve Prof. Dr. Ayhan BAŞTAN'a, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. K.Serdar DİKER'e, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Hakan YARDIMCI, Prof. Dr. Ömer ESENDAL, emekli öğretim üyeleri Prof. Dr. Jale PARACIKOĞLU ve Prof. Dr. Nejat AYDIN'a, moleküler çalışmalarımda desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU'na, laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını aldığım Veteriner Hekim Oya TEKİN'e, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anabilim Dalı araştırma görevlileri, doktora ve yüksek lisans öğrencilerine, tezimin her aşamasında sabrını ve desteğini esirgemeyen eşim Araş.Gör. Mehmet CENGİZ'e ve sevgili aileme teşekkür ederim.

SİMĞELER VE KISALTMALAR

CMT	California Mastitis Test
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed-Field Gel Elektroforezisi
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
TBE	Tris Borate EDTA

ŞEKİLLER

Şekil 3.2.1 RFLP Patternleri (16S rDNA kesim yapılmamış)	38
Şekil 3.2.2. RFLP Patternleri (<i>Hha1</i> ile kesilmiş 16S rDNA)	38
Şekil 3.2.3. RFLP Patternleri (<i>Rsa1</i> ile kesilmiş 16S rDNA)	38
Şekil 3.2.4. RFLP Patternleri (<i>Msp1</i> ile kesilmiş 16S rDNA)	39
Şekil 3.2.5. RFLP Patternleri (16-23S rDNA kesim yapılmamış)	39
Şekil 3.2.6. RFLP Patternleri (<i>Hae3-Rsa1</i> ile kesilmiş 16-23S rDNA)	40
Şekil 3.2.7. RAPD Patternleri (OPE-04 primeri)	40

ÇİZELGELER

Çizelge. 1.1.	<i>S. agalactiae</i> , <i>S. dysgalactiae</i> ve <i>S. uberis</i> etkenlerinin Konvansiyonel ayırımı	20
Çizelge. 2.1.	Örnek sağlanan işletmeler	27
Çizelge. 2.2.	Kullanılan primerlerin ilgili gen bölgeleri ve baz dizilimleri	28
Çizelge. 3.1.	İzole edilen Streptokokların identifikasyonunda kullanılan test bulguları	36
Çizelge. 3.2.	İzole edilen Streptokoklarda hemaglutinasyon, hemoliz ve Lancefield serogruplandırma bulguları	36
Çizelge. 3.3.	Konvansiyonel ve Moleküler tekniklerle elde edilen karşılaştırmalı identifikasyon bulguları	41
Çizelge. 3.4.	Streptokok türlerinin neden olduğu mastitislerin işletmelere göre dağılımı	42

I. GİRİŞ

1.1. Mastitis

Mastitis, meme dokusundaki patolojik değişiklikler ve sütteki somatik hücre sayısının artışı ile karakterize, meme bezlerinde oluşan yangısal değişiklikler olarak tanımlanır (Blowey ve Edmondson, 1995a; Khan, 2002; Akan, 2006). İnsan ve hayvan sağlığı, beslenmesi ve ulusal ekonomide çok önemli olan süt ve süt ürünleri, ancak sağlıklı hayvanlardan elde edilebilir (Arda ve İstanbulluoğlu, 1981). Meme bezinin yangısal durumuna bağlı olarak oluşan patolojik değişikliklerin sonucunda sütte bir takım fiziksel ve kimyasal değişimler de meydana gelir (Tmanova, 2003). Meydana gelen bu değişimler süt ve süt ürünlerinin kullanılabilirliğini sınırlar ve bu nedenle mastitis, üzerinde dikkatle durulması gereken önemli bir problemdir.

1.2. Mastitisin Önemi

İşletme düzeyinde etkin kontrol programlarının uygulanması ile mastitis nedenli kayıpların azaltılması mümkün olabilmektedir. Mastitis kontrol programlarının uygulanması ve bu programların devamlılığının sağlanması, özellikle kapasiteleri büyük olan süt işletmelerinde, ekonomik verimliliğin en önemli göstergesidir. Ancak ülkemizde özellikle süt yönlü yetiştiricilikte işletme kapasitelerinin küçük olması ve henüz verimlilik merkezli mastitis kontrol programlarının oluşturulamaması nedeniyle, süt üretiminde büyük ekonomik kayıplar ortaya çıkmaktadır (Atasever ve Erdem, 2008; Topçu, 2008). Sağlıklı süt, sağlıklı hayvanlardan elde edildiği için, hayvan sağlığını

korumak ve mastitis olgularını erken teşhis etmek temel hedeftir. Süt endüstrisinde mastitis nedenli ekonomik kayıplar, süt kalitesinin ve süt veriminin azalması, buna bağlı olarak da ilaç ve veteriner hizmet kullanımının artması ve yem giderlerinin artışı sonucunda ortaya çıkmaktadır (Taponen ve Myllys, 1995). Aynı zamanda, enfeksiyonun tedavisi için kullanılan antibiyotiklerin sütte kalıntı bırakması, bilinçsiz olarak ilaç kullanımına bağlı gelişen antibiyotik dirençli bakteriler, tedavi olanaklarının sınırlanması gibi olumsuz etkiler oluşmaktadır (Meiri-Bendek ve ark., 2002; Ferguson ve ark., 2007). Düzenli ve bilinçli kontrol programlarının uygulanması, klinik mastitis olgularının azaltılmasını ve subklinik enfeksiyonların da erken teşhis edilmesini sağlamaktadır (Cremonesi ve ark., 2006; Østerås ve ark., 2006).

1.3. Bulaşıcı ve Çevresel Mastitis

Mastitise neden olan etkenler arasında bakteriler önemli bir yere sahiptir (Phuektes ve ark., 2001a; Chotar ve ark., 2006; Unnerstad ve ark., 2009). Memelerdeki anatomik bozukluklar ve travmalar da enfeksiyonun yerleşimini ve oluşumunu hızlandırmaktadır (Blowey ve Edmondson,1995b).

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

Çevresel faktörler arasında, uygun olmayan çevre koşulları, ahır ve barınakların sağlık yönünden uygun olmaması, yetersiz havalandırma koşulları, altlıkların sert ve kirli olması sayılabilir (Zadoks, 2004; Bray ve Shearer, 2008; Janzekovic ve ark., 2009). Süt verimini arttırmak amacıyla protein yönünden zengin besleme mastitise yakalanma olasılığını arttırmaktadır (Botts ve ark. 1979). Sağımçıların temizlik ve dezenfeksiyona

dikkat etmemeleri de hayvanlar arasında infeksiyonun yayılmasını hızlandırmaktadır (Blowey ve Edmondson, 1995c).

Mikrobiyel nedenlere bakıldığında; pek çok bakteri, mantar ve viral etken mastitisin oluşumuna neden olmaktadır (Arda ve İstanbulluoğlu, 1981). Mastitis etkenleri, meme ve meme kanalıyla ilişkileri yanında, özellikleri de dikkate alınarak bulaşıcı ve çevresel patojenler olarak ayrılmıştır (Blowey ve Edmondson, 1995a; Akan, 2006). Mikrobiyel patojenler, sığır meme bezine yerleşerek çoğalır ve hayvandan hayvana sağım sırasında bulaşırlar (Tmanova, 2003; Oliver ve ark., 1997). Çevresel patojen olan *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* ve *Escherichia coli* çevresel mastitis infeksiyonlarına neden olmaktadır. Bulaşıcı patojenler olarak *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma* türleri ve *Corynebacterium bovis* bulunmaktadır. Ayrıca tüberküloz etkenleri, *Proteus*, *Leptospira*, *Listeria* ve *Brucella* türleri de mastitise neden olmaktadır (Ferguson ve ark., 2007; Hawari ve Al-Dabbas, 2008; Sampimon ve ark., 2009).

Çevresel patojenlerin infeksiyon oluşturmaları hayvanlar arasında sağım esnasında ya da sağım aralarında çevre teması ile meydana gelir (Oliver ve ark., 1997). Çoğunlukla kuru dönemde, laktasyonun erken evresinde ve hayvan sıklığının arttığı durumlarda, serbest hayvancılıktan ziyade ahır işletmelerinde, çevresel patojenlerin oluşturduğu infeksiyonlara daha sık rastlanır. Bakım ve beslemenin iyi yapıldığı durumlarda, koliform mastitisleri nadiren ortaya çıkar ve oranı %1-2'de kalırken, streptokokkal nedenli mastitis oranı %5'den daha az seyrederek, ancak sürüde mevcut herhangi bir problemde bu oran %10'u aşar. Çevresel streptokokların oluşturduğu mastitis infeksiyonlarının %49-50'sinde klinik semptomlar kendini gösterir. Klinik mastitislerin sonucuna bağlı olarak da süt üretiminde, reproduktif aktivitede azalma ve işletme giderlerinin artışı ile ekonomik kayıp şekillenir (Tmanova, 2003).

Bulaşıcı mastitis infeksiyonları ise, bir meme bezinin infeksiyon kaynağı olması ve bu enfekte meme bezine sahip hayvandan, sağlıklı başka bir hayvana etkenin taşınması ile gerçekleşir (Zadoks, 2004; Riekerink ve ark., 2006). Meme başı lezyonları, yetersiz

bakım koşulları etkenlerin yerleşimini kolaylaştırır (Blowey ve Edmondson, 1995b; Tmanova, 2003). Bulaşıcı mastitis olguları sıklıkla akut, kronik veya subklinik formlarda görülebilir. Mikroorganizmanın geçişi sağımçıların elleri, sağım makineleri gibi sağım esnasında yayılma gösterir. Bu şekilde infekte hayvanlardan sağlıklı hayvanlara mikroorganizmaların geçişi gerçekleşir (Tmanova, 2003).

1.4. İnfeksiyonun Klinik ve Subklinik Formları

İnfeksiyonun klinik formlarına bakıldığında; mikroorganizma meme bezini enfekte ettikten sonra buraya yerleşerek hızlı bir şekilde çoğalmaya başlar ve bunu konak-patojen ilişkisine bağlı olarak çeşitli klinik bulgular takip eder. Konak immun cevabının başarısız, antibiyotik tedavisinin yetersiz olduğu durumda etken meme bezine kolonize olur ve mastitis şekillenir (Vehmas ve Sandholm, 1995; Tmanova, 2003). Sonuç olarak da yangının klinik bulguları olan şişkinlik, renk değişimi, ısı artışı ve ağrı gelişir. Klinik semptomlar perakut, akut, subakut ve kronik formlar halinde karakterize edilir. Klinik mastitis durumlarında sütteki değişimler (pıhtı, renk değişimi, kan görülmesi vb.) açığa çıkar. Ateş, anormal sekresyon, iştah kaybı, süt üretiminin azalması akut mastitis durumlarında görülen ilave klinik bulgulardır (Sandholm, 1995; Tmanova, 2003).

Klinik mastitis bulgularının tersine subklinik infeksiyonlarda meme bezi ve sütteki değişimlere nadiren rastlanır ya da hiç rastlanmaz. Semptom göstermeyen hayvanlar sağlıklı kabul edilir, bu nedenle subklinik infekte hayvanların teşhisi zordur (Blowey ve Edmondson, 1995a). Klinik belirti göstermeyen infekte hayvanlar diğer sağlıklı hayvanlar için bir rezervuar görevi görür ve sağlıklı hayvanlar arasında infeksiyonun yayılımına neden olurlar (Zadoks, 2004).

Ekonomik yönden mastitis infeksiyonları, süt veriminin ve kalitesinin azalması, tedavi masraflarına ek olarak somatik hücre sayısının artışı ve sütün kullanılamaması, laboratuvar hizmet alımları, toksemiye bağlı şekillenen hayvan ölümleri ile üretim

maliyetlerini arttırmakta ve yetiştiricilik yönünden önemli problemlere neden olmaktadır (Taponen ve Myllys, 1995).

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

1.5. Streptokokkal Mastitisler

Streptokok mastitisleri başlangıçta gizli ve yavaş seyretmektedir. Klinik olarak saptanabilecek anormallikler memede hemen görülmez. Genellikle laktasyon döneminde infeksiyon şekillenir ve zaman geçtikçe sütün memede toplanmasına bağlı olarak klinik bulgular da şekillenmeye başlar (Jain, 1979; Blowey ve Edmondson, 1995a; Philpot ve Nickerson, 2000).

1.5.1. Streptokokların Taksonomisi

Streptokok cinsi bakteriler insan, hayvan ve bitkiler gibi geniş bir konakçı dağılımına sahiptirler. Bu cins ilk olarak 1884 yılında Rosenbach tarafından tanımlanmış ve 1975 tarihinde Wilson ve Miles tarafından, 1978 yılında ise Jones tarafından bildirimi yapılmıştır. Streptokokların sınıflandırılmasında en önemli değişimler 1906 yılında Andrewes-Horder, 1919 yılında Orla-Jensen, 1933 yılında Lancefield ve 1937 yılında ise Sherman tarafından ortaya konmuştur (Sherman, 1937; Khan, 2002; Facklam, 2002). Streptokoklar 1918 yılında Rebecca Lancefield tarafından hemolitik özellikleri göz önüne alınarak *Streptococcus haemolyticus* olarak isimlendirilmiştir. Araştırmacı etkenlerin karbonhidrat antijenlerini spesifik serum kullanarak tiplendirmiş ve streptokoklar gruplara ayrılmıştır (Lancefield, 1933).

Streptokoklar Gram pozitif, yuvarlak, zincir şeklinde diziler yapan, hareketsiz, sporsuz, kapsüllü, insan ve hayvanlarda lokal ve genel bir çok hastalığa neden olan ve onların mukoz membranlarında da normal olarak yaşayabilen bakterilerdir. Mikroskopik bakıda sıvı besiyerlerinde uzun zincirler halinde görülürken, katı besiyerlerinde diplokok şeklinde görülebilirler. Zenginleştirilmiş besiyerlerinde iyi üreme gösterirler (Akan, 2006). Streptokoklar Bergey's Manual (Garrity, 2001) tarafından Laktobasiller sınıfı altında ayrı bir aile olarak incelenmiştir.

1.5.2. Streptokokların Mastitis İnfeksiyonlarındaki Durumu

Süt sığırcılığında çok yaygın olarak rastlanan ve ekonomik kayıpların şekillendiği mastitis infeksiyonlarında, başlıca *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* ve *S. uberis* etkenleri izole edilmektedir (Phuektes ve ark., 2001a; Kawata ve ark., 2004). Mastitis kontrol programları, süt sağımındaki gelişmeler, sağım sonrası hijyen uygulamaları, yaygın olarak kullanılan antibiyotik tedavileriyle *S. agalactiae* ve *S. dysgalactiae*'nin neden olduğu mastitis infeksiyonlarında azalma görülmüş ancak *S. uberis*'in neden olduğu infeksiyonlarda belirgin düzeyde bir azalmaya rastlanmamıştır (Jayarao ve ark., 1991a; Baseggio ve ark., 1997; Wieliczko ve ark., 2002; Zschöck ve ark., 2005; Sampimon ve ark., 2009).

Mastitise neden olan etkenlerin bulaşıcı ve çevresel olarak gruplandırılmasıyla ayırım yapılarak etkenlerin patogenezi bu grupta ile izlenmiştir. Bulaşıcı mastitis etkenlerinin meme bezinde yaşayarak çoğalması ve sağım esnasında hayvandan hayvana geçişi şekillenmiştir. Çevresel patojenlerin ise özellikle işletmelerin fazla ve işletme içi hayvan popülasyonunun yoğun olduğu yerlerde infeksiyon oluşturduğu görülmüştür. İnfeksiyona neden olan streptokokkal etkenlerin durumuna bakıldığında *S. agalactiae* dışındaki streptokoklar çevresel patojenler olarak gruplandırılmış, *S. agalactiae* ise bulaşıcı bir patojen olarak nitelendirilmiştir (Todhunter ve ark.,1995; Oliver ve ark.,1997).

Mastitisi oluşturan çevresel streptokoklar arasında *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. equinus* (*S. bovis*), *S. parauberis*, *S. equi* ve *S. canis* bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda, çevresel patojen etkenler arasında *S. uberis* ve *S. dysgalactiae* sık olarak izole edilmektedir (Oliver, 1988; Todhunter ve ark., 1995). Bu etkenlerin yaygın olmasına karşın patogenezelelerinde, virulens faktörleri ile ilişkileri net olarak anlaşılamadığı ve etkenlerin heterojen özellikler göstermesi nedeniyle oluşturulmak istenen kontrol stratejileri de başarısız olmuştur (Oliver ve ark., 1997).

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

Dakman (2000) yaptığı çalışmada, %12,8 oranında *Streptococcus* spp. izolasyonu gerçekleştirmiş ve %4,5 oranında *S. agalactiae* etkeni tanımlamıştır. Karahan (2005) ise, %24,3 oranında streptokok izolasyonu gerçekleştirmiş ve bu streptokoklar içerisinde %10,4 oranında *S. agalactiae* tanımlamış ederken, %13,9 oranında diğer streptokok türlerini tanımlamıştır.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tenhagen ve ark. (2009) ilk laktasyonunda olan ineklerde streptokok izolasyon oranını %12,6 olarak tanımlamışlar, bu oran içinde *S. agalactiae* %0,1, *S. dysgalactiae* %3,4, *S. uberis*'i ise %2,3 oranında tanımlamışlardır. Geri kalan %7'lik kısmın diğer streptokoklar tarafından oluşturulduğunu belirtmişlerdir. Daha yaşlı hayvanlarda izole

edilen streptokoklar %31,8 bulunmuş olup bu oranın % 0,1'ni *S. agalactiae*, %13,6'sını *S. dysgalactiae* ve %8,5'ni ise *S. uberis* etkenleri oluşturmuş geri kalanı ise diğer streptokok türleri olarak bulunmuştur.

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

Norveç'te de Streptokok nedenli infeksiyonların doğum sayısı fazla olan yaşlı hayvanlarda gençlere oranla daha sık olduğu belirtilmiştir (Reksen ve ark., 2007).

Yeni Zelanda'da klinik mastitislerin %15,2'sinde *S. uberis*, %0,6'sında *S. dysgalactiae*, %0,3'ünde ise *S. agalactiae* izole edilmiştir (Petrovski ve ark.,2009), İngiltere'de yapılan bir çalışmada da sütlerdeki bakteriyolojik örnekleme sonucunda %23,5 oranında *S. uberis* etkeni izole edilirken *S. agalactiae* ve *S. dysgalactiae* etkenlerine rastlanmamıştır (Bradley ve ark.,2007).

1.5.3. *S. agalactiae*

S. agalactiae, kronik hale geçen, zamanla memelerin kör olması ile sonuçlanan çok bulaşıcı mastitise neden olmaktadır (Jain, 1979; Philpot ve Nickerson, 2000; Tmanova 2003). Sıvı kültürlerde zincir şeklinde üreme gösteren etken, *Streptococcocea* ailesine *Streptococcus* cinsine ait olan bir bakteridir. Bakteri, meme kanalları ve sistemlerinde yaşar. Beta hemolitik olan etkenler hemolitik olmayan etkenlere oranla daha patojenik suşlardır. CAMP testi pozitifdir. Serolojik gruplandırma da identifikasyon prosedüründe önemli bir özelliktir ve *S. agalactiae* Lancefield gruplandırmasında B grubunda yer alır (Facklam, 2002; Tmanova, 2003,; Winn ve ark., 2006; Quinn ve ark., 2004).

Bu patojen meme kanalına kolonize olarak, meme epitel hücrelerine tutunur (Blowey ve Edmondson, 1995a; Karahan, 2005). Bu özellik *S. aureus* ve *S. agalactiae* için karakteristiktir. *S. agalactiae* süt kanallarında ve alveollerinde çoğalarak yangısal cevabı tetikler. Damarların genişlemesiyle bol miktarda lökosit süte ve meme dokusuna geçer.

Sütün fiziksel ve kimyasal yapısında bozulmalar şekillenir. Sekretorik dokuda yangısal duruma karşı cevap, fibröz doku oluşumu ile şekillenir. Tedavi edilmezse süt kanalları yangısal duruma bağlı olarak kapanır ve süt üretimi azalır, somatik hücre sayısı artar ve involusyon şekillenir. *S. agalactiae* penisilin, ampisilin, sefalosporin, eritromisin, trimetoprim-sülfonomid gibi antibiyotiklere karşı duyarlıdır (Pyörola, 1995).

S. agalactiae mastitislerinin genel olarak subklinik seyir göstermesi nedeniyle, etkenin daha kolay ve hızlı bir şekilde teşhis edilmesi için sütün laboratuvar ortamında incelenmesi gerekmektedir (Meiri-Bendek ve ark., 2002). Teşhisin hızlı ve doğru bir şekilde gerçekleşmesi için PCR temelli teknikler, yarar sağlamaktadır. Meiri-Bendek ve ark. (2002) geliştirdikleri spesifik primerler ile PCR tekniklerinin *S. agalactiae*'nın teşhisinde daha güvenilir olduğunu bildirmişlerdir.

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

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

Abdulmawjood ve Lammer (1999), B grubu streptokokların 16S rRNA bölgesine yaptıkları PCR işlemi ile bu gen bölgesinde bulunan değişken V2 bölgesini amplifiye etmişler ve yaptıkları enzim kesimleri ile etkenler arasında benzer bantlar görüntülemişlerdir. Jayarao ve ark. (1992), B grubu streptokoklar da 16S rRNA gen yapısının türler arasında varyasyon göstermediğini ve mastitise neden olan streptokokların identifikasyonunda oldukça yararlı olduğunu belirtmişlerdir. Ancak PCR sonrası işlemlerin, özellikle, enzimle kesim işlemlerinin zaman alıcı ve ek manüplasyonlar gerektirmesinin dezavantaj olduğunu belirlemişlerdir. Forsman ve ark. (1997), B grubundaki streptokokların 16S-23S rRNA gen bölgesinde sekans

varyasyonunu kullanarak tür spesifik primerler oluşturmuşlardır. B grubu streptokoklara spesifik bir oligonükleotid primer dizaynı için 16S rRNA geninin V2 bölgesinin türe spesifik varyasyon yapısı karşılaştırma yapılarak kullanılmıştır.

Mastitislerden izole edilen *S. agalactiae* suşlarının moleküler tiplendirilmesinde RAPD-PCR tekniği kullanılmaktadır (Bert ve ark., 1996; Gillespie ve ark., 1997). Martinez ve ark. (2000) ve Sukhnanand ve ark. (2005) RAPD-PCR yöntemini insan ve sığır orjinli infeksiyonlarda teşhis amaçlı kullanmışlardır. RAPD-PCR yöntemi ile yapılan tiplendirme sonrasında insan infeksiyonlarından çok sık izole edilen *S. agalactiae* serotip 3 etkenlerinin ineklerdeki mastitis infeksiyonlarından henüz izole edilmediği görülmüştür (Wanger ve Dunny, 1985; Bohnsack ve ark., 2004; Sukhnanad ve ark., 2005). Bohnsack ve ark. (2004) *S. agalactiae* 'nın serotip 3 hattından yaptıkları RAPD-PCR tiplendirmesinde insan ve sığır *S. agalactiae* suşlarının birbirinden önemli ölçüde ayrıldığını bildirmişlerdir.

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

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

S. agalactiae nedenli mastitislerin tedavisinde uygun antibiyotiklerin kullanımı ile infeksiyon seyri iyileştirilebilir, ancak tedavi etkinliğinin iyi olması açısından sağım

sırasındaki hijyen kurallarına, sağım sonrası meme dezenfeksiyonuna, kuru dönem tedavisine, kronik enfekte hayvanların sürüden uzaklaştırılmasına ve sağım makinelerindeki optimum performansa dikkat edilmesi gereklidir (Pyörola, 1995; Blowey ve Edmondson, 1995a).

1.5.4. *S. dysgalactiae*

S. dysgalactiae, akut seyirli ve memelerin körleşmesine de neden olan mastitis etkenidir. Streptokokların genel özelliklerini taşımaktadır. *S. agalactiae*'ya çok benzer, ancak metilen mavisini koagüle edip, sodyum hippurati hidrolize etmemesiyle ayrılır. *S. dysgalactiae* bulaşıcı özelliğe sahip üçüncü büyük patojen olarak kabul edilir (Blowey ve Edmondson, 1995a). Çevresel bir etken olarak tanımlanmasına karşın yarı bulaşıcı yarı çevresel bir etken olarak bulunur (Oliver, 1997). En sık olarak meme derisinde, özellikle sağım aletlerinin hijyenik olarak kullanılmadığı durumlarda sağım aletleri yüzeylerinde, meme yaralarında, kesiklerde ve çiçek yaralarından izole edilmiştir. Meme bezleri infeksiyonun taşınmasında daha az öneme sahiptir. Etken aynı zamanda tonsillerde bulunduğu için memelerin yalanması esnasında da geçiş mümkün olabilmektedir (Colque ve ark., 1993; Quinn ve ark., 2004). Bu durum *S. dysgalactiae*'nın düve mastitislerinde ve kuru dönemdeki hayvanlarda görülme nedenini açıklamaktadır (Blowey ve Edmondson, 1995a). Meme irritasyonuna neden olan uçan haşere, soğuk hava etkisi gibi durumlarda memelerin yalanması klinik belirtiler oluşuncaya kadar etkenin özellikle meme kanalına kolonize olmasına neden olur (Blowey ve Edmondson, 1995a). Lancefield serogruplandırmasında C grubunda yer alan etken (Garvie ve ark. 1983; Facklam, 2002) taksonomik çalışmalarda grup L içerisinde *S. equisimilis*, insan infeksiyonlarında ise G grubu içerisinde *S. dysgalactiae* olarak isimlendirilmiştir. Biyokimyasal testler ve hücre duvarı yapısının değerlendirilmesi temel alınarak, hayvan infeksiyonlarında serogrup C ve L ye ait olduğu bulunarak *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* olarak tiplendirilmiştir. İnsan infeksiyonlarında C ve G serogruplarına ait olan etken *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* olarak tanımlanmıştır. L

grubu streptokokların, *S. equisimilis*'in ve G grubun da yer alan insan infeksiyonlarından sorumlu streptokok türlerinin sığır meme bezlerine yerleşerek infeksiyon yaptığına nadiren rastlanmıştır. Sığırlarda infeksiyona neden olan *S. dysgalactiae* etkenleri non hemolitik ya da alfa hemolitik grup streptokoklar olup homojen yapı gösterir ve bu özellikleri ile L grubunda yer alan beta hemolitik suşlardan, insan G grup streptokoklardan ve *S. equisimilis*'den ayrılmıştır (Watts 1988, Devriese 1991). *S. dysgalactiae*'nın sığırların tonsillerinde, ağız ve vagina mukozasında oldukça fazla miktarda bulunduğu ve kuru dönemde herhangi bir *S. dysgalactiae* infeksiyonu bulunmadığı halde laktasyon döneminde infeksiyonun görülmesinin, etkenin çevresel bulaşma yolunu daha çok kullandığını göstermiştir (Colque ve ark., 1993; Oliver ve ark., 1997).

Hassan ve ark. (2003) PCR yöntemi ile Lancefield serogruplandırmasında C, G ve L gruplarına ait *S. dysgalactiae* suşlarını 16S-23S rDNA ya göre tiplendirmiş ve serolojik olarak heterojenite gösteren farklı serogruplardaki *S. dysgalactiae* etkenlerini çapraz reaksiyon göstermeden PCR yöntemi ile tanımlamışlardır.

1.5.5. *S. uberis*

S. uberis'in mastitis infeksiyonu ile ilişkisi ilk olarak 1932 yılında Diernhofer tarafından ortaya konmuştur (Oliver ve ark.,1997). Bu çalışmalara göre enterokok ailesine ait olduğu düşünülen *S. uberis*'in *Enterococcus* ailesine ait olmadığı, piyogenik streptokok ailesine benzerlikler gösterdiği görülmüştür. Roguinsky 1972 yılında *S. uberis*'in bazı fizyolojik özelliklerini aynı habitatta bulunan diğer 7 tür ile karşılaştırmış ve *S. uberis*'in iyi tanımlanmış ayrı bir tür olduğunu bulmuştur (Roguinsky, 1977; Jayarao ve ark., 1991a). Facklam 1977 yılında Streptokok ailesini *S. pyogenes*, *S. viridans*, *S. lactis* ve enterokoklar ailesi olarak 4 büyük gruba ayırmıştır. *S. uberis* bu çalışma da viridans grup içerisine girmiştir. Her iki çalışmada da biyokimyasal testler ve serolojik yöntemler kullanılmıştır (Garvie ve Bramley, 1979).

S. uberis'in oluşturduğu mastitislerde ise kronik hafif seyirli, sütte hafif değişikliklere neden olan bir infeksiyon şekli gözlenmektedir (Philpot ve Nickerson, 2000; Akan, 2006). *S. uberis* çevresel bir patojen olarak klinik vakalardan yüksek oranda izole edilirken, subklinik mastitis vakalarında laktasyondaki hayvanlarda ve kuru dönem periyodunda predominant bir etken olarak izole edilir (Douglas ve ark., 2000; Odierno ve ark., 2006). *S. uberis* nedenli mastitislerde sürü içerisinde infeksiyon oranında artış görülür. *S. uberis*, streptokok nedenli düve mastitislerinde laktasyonun ilk 5 gününde görülen infeksiyonlarda sık olarak rastlanan bir etkindir. *S. uberis* nedenli mastitislerin diğer streptokok nedenli mastitislerden farkı, etkenin meme yüzeylerinde ve ineğin diğer vücut bölgelerinde bulunabilme özelliğidir (Colque ve ark., 1993; Phuektes ve ark., 2001b). Bu yüzden *S. uberis* nedenli mastitis olgularının büyük oranda nedeni, teat dipping ve kuru dönem antibiyotik tedavisinin yetersiz ve uygun olmayışı olarak bildirilmiştir (Jayarao ve ark., 1991b; Khan, 2002).

Kronik mastitise neden olan *S. uberis* etkenlerinin bulaşıcı etkenlerle de yakın ilişkide olabileceği tahmin edilmektedir. Etkenin sağım esnasında inekten ineğe geçişi de söz konusudur. Serbest yetiştiricilikte *S. uberis* suşlarının hayvanlar arasındaki geçişi, ineklerin memelerini yalaması ya da sinekler aracılığı ile söz konusu olmaktadır. Özellikle yaz aylarında, enfekte hayvanlarla sağlıklı hayvanların aynı yere yatma eğilimleri etkenin geçişini arttırmaktadır (Blowey ve Edmondson, 1995a). *S. uberis* etkenleri süt işletmesi, ahır, altlık ve su yalakları, meralar ve dışkı ile kontamine olan her yerde sık olarak bulunur. Meme bezlerinin buralarla teması sonucu etken alınmış olur (Zadoks, 2004; Khan, 2002). Etkenin aynı zamanda ineklerde sindirim sistemine, genital sisteme ve meme bezine kolonize olabildiği görülmektedir (Oliver ve ark., 1997; Khan ve ark., 2003, Quinn ve ark., 2004).

Etkenin bu şekilde pek çok ortama adapte olması biyolojik olarak incelenmiş ve pek çok pseudogen yapısına sahip olduğu, yapısında bakteriyofaj adaları ve genomik adalar bulundurduğu görülmüştür. Bu durum da *S. uberis*'in farklı ekolojik ortamlara nasıl uyum sağladığını açıklamaktadır (Ward ve ark., 2009). Diğer streptokok türleri ile yapılan karşılaştırmalarda en fazla *S. agalactiae* ve *S. zooepidemicus* ile benzerlik

gösterdiği bulunmuştur (Hulbert ve ark.,2007). Phuektes ve ark. (2001b), *S. uberis* etkenlerinin bulundukları işletmelere göre farklılık gösterdiğini belirlemişler, predominant olan etkenlerin daha fazla virulens özelliğe sahip olduğunu belirtmişlerdir (Zadoks ve ark., 2003)

S. uberis mastitislerinde çoğunlukla infeksiyon aniden başlar ve memede şişme, sütte pıhtı oluşumu, genel durum bozukluğu ve ateş görülür. Meme bezinde bakterinin opsonizasyonu zayıf şekillenir ve buna bağlı olarak da fagositoz olayında lökositler tarafından yıkımlanma da zorlaşır. Antimikrobiyel tedavi oldukça önemlidir ve çoğu vakada seyir iyi görünürken bazı durumlarda infeksiyon tekrarlayabilir. Kuru dönemdeki hayvanlarda yaygın olarak infeksiyonu şekillendiren etkene karşı sağaltım kuru dönemin ilk 2 ve son 2 haftasında önemlidir ve özellikle son iki haftada uygulanan tedavi, başarıyı artırır (Blowey ve Edmondson, 1995a; Khan, 2002).

Bazı *S. uberis* suşları lökositler tarafından gerçekleştirilen fagositoza diğer suşlara oranla daha fazla direnç gösterir (Oliver ve ark., 1997). Bu durum, özellikle *S. uberis* etkenlerinin kazein varlığında gösterdikleri fagositoz direnci ile açıklanmaktadır. Yapılan deneysel çalışmalarda, *S. uberis* etkenlerinin kazeinli ve kazeinsiz ortamlarda fagositoza gösterdiği dirence bakılmış, kazein bulunduğu durumlarda fagositoza karşı direncin daha fazla olduğu görülmüştür (Blowey ve Edmondson, 1995a).

Yapılan bir çalışmada da, *S. uberis* etkenlerinin meme bezinde duktular dokuda ve sekretorik alveolün luminal bölgesinde üreme gösterdiği gözlenmiştir (Taylor ve ark., 2003). Almeida ve ark. (2007), *S. uberis* etkenlerinin uzun süre meme epitelyum hücrelerinde herhangi bir etki olmaksızın kalabildiğini ve hücre içi bu yerleşimi ile infeksiyonun meme dokusunun derinliklerine yayılarak persiste bir infeksiyon haline geldiğini belirtmişlerdir.

Mastitise neden olan Streptokokların cins ve tür düzeyinde tiplendirilmesi, virulens özelliklerinin belirlenmesi, antibiyotik dirençliliklerinin ortaya çıkarılması, etkenlerin birbirlerine epidemiyolojik ve genetik anlamda yakınlıklarının tayini için pek çok

çalışma yapılmış ve bu çalışmaların sonucunda da her geçen gün yeni veriler elde edilmiştir (Phuektes ve ark.,2001b; Zadoks ve ark., 2003; Pitkala ve ark., 2008).

Mastitis etkeni olan *S. uberis* ve *S. parauberis*'in serolojik ve biyokimyasal testlerle ayırımı yapmak neredeyse mümkün olmadığı için bu etkenlerin ayırımında da moleküler teşhis metotlarının kullanımı sağlanmış ve DNA hibridizasyon metotları, 16S rRNA sekans analizi gibi yöntemlerin geliştirilmesiyle 2 etken arasındaki ayırım yapılmıştır (Jayarao ve ark.,1993; Pitkala ve ark., 2008).

Williams ve Collins, (1991), *S. uberis*'in rRNA yapısını kodlayan DNA yapısının polimorfizmini temel alarak etkeni moleküler yöntemlerle incelemiş *S. uberis*'in ribozomal RNA yapısını kodlayan DNA'yı rastgele primerlerle çoğaltarak enzimlerle kesmiş ve *S. uberis* etkenlerinin tür içinde varyasyonlarını belirlemişlerdir. *S. uberis* tip 1 ve tip 2 olarak ayrılan etkenlerden *S. uberis* tip 2'nin *S. parauberis* olarak ayrılmasını sağlamışlardır. Taksonomik değerlendirmenin yanında epidemiyolojik değerlendirmede de bu gen profillerini kullanarak ayırım yapmışlardır (Williams ve Collins, 1990).

Garvie ve Bramley (1979), Williams ve Collins, (1990), *S. uberis*'in 16S rRNA nükleotid sekansını genotip 1 ve genotip 2 olarak ayırarak, *S. uberis* genotip 2'yi *S. parauberis* olarak isimlendirmiştir. *S. uberis* ve *S. parauberis*'in 2 yakın tür olması yanında kültürel, morfolojik, biokimyasal ve serolojik olarak ayırımı yapılamadığı için etkenlerin birbirinden sadece DNA hibridizasyon yöntemleri ile ayrılacaklarını bildirmişlerdir.

Khan (2002) ve Jayarao ve ark. (1991b) *S. uberis* ve *S. parauberis* etkenleri arasındaki moleküler farklılığı RFLP-PCR analizi ile ortaya koymuşlardır. Hassan ve ark. (2001) konvansiyonel olarak ayırımı yapılamayan *S. uberis* ve *S. parauberis* suşlarına 16S rRNA, 23S rRNA ve 16S-23S rRNA genlerine spesifik primerler ile yaptıkları PCR işlemi ile ayırımı sağlamışlardır.

Son yapılan moleküler çalışmalarda *S. uberis*'in tek tip bir organizma olmadığı ve moleküler olarak farklılık gösterdiği görülmüştür (Jayarao ve ark., 1991a; Jayarao ve

ark., 1993; Douglas ve ark., 2000; Phuektes ve ark., 2001b; Odierno ve ark.,2006). Baseggio ve ark. (1997), mastitise neden olan 3 streptokokkal etken arasında *S. uberis*'in en heterojen grup olduğunu göstermiş, 10 işletmede 21 alt tip bulmuş ve sadece bir işletmede benzer 2 bant profili gözlemlemişlerdir. Jayarao ve ark. (1992) *S. uberis*'in klinik mastitis durumları dışında bir sürüdeki suşların klonal olarak benzerlik oranını % 20-100 gibi değişen oranda bulmuşlardır. Gilbert ve ark. (2006) *S. uberis* nedenli mastitis infeksiyonlarının oluşumunda işletmeler arasında farklılık olduğunu belirlemişlerdir. McDonald ve ark. (2005) farklılık gösteren *S. uberis* suşlarını *S. uberis* varyantı olarak tanımlamışlardır.

Jayarao ve ark. (1991a) 42 adet *S. uberis* etkenini önce konvansiyonel metotlar ile tiplendirmeye çalışmışlar ve 27 adet *S. uberis* etkeninin spesifik biokimyasal özellikleri gösterdiğini saptarken 15 suşun farklı biyokimyasal karakterler gösterdiğini belirlemişlerdir. Restriksiyon kesimleri ile aynı hayvandan farklı laktasyon zamanlarında alınan sütlerde ise yakın ilişkili *S. uberis* suşlarını tamamen tanımlamışlardır. Ancak biokimyasal testlerin yakın ilişkili *S. uberis* etkenlerinin ayırımında yetersiz kaldığı belirtilmiş ve enzim kesimlerinin ise farklılaşmayı etkili bir şekilde sağladığı görülmüştür.

Buddle ve ark. (1988), *S. uberis* etkenlerinde aynı bölgeden ve aynı hayvanlardan yaptıkları örneklemelerde farklı profillerin görüldüğünü belirtmişlerdir. Tomita ve ark. (2008) *S. uberis* izolatları arasında genetik olarak geniş bir farklılık bulmuş, dominant bir *S. uberis* etkenine rastlayamamışlardır. Farklı hayvanlardan izole edilen birkaç benzer klon yapısını ise hayvanlar arasında geçiş sonucu şekillenen bakteri yapısına bağlamışlardır.

Etkenlerin heterojen bir yapı göstermesine rağmen bazen tek bir çiftlikteki hayvanlarda eş bantların görülmesi de infeksiyonun seyri esnasında hayvandan hayvana bulaşmanın olabileceğini göstermiştir (Khan ve ark.,2003; Zadoks ve ark., 2003). Zadoks ve ark. (2005) farklı ortamlardan izole edilen *S. uberis* etkenlerine yapılan tiplendirme sonucunda etkenlerin aynı yapıda olduklarını görmüşlerdir. Jayarao ve ark. (1992) bir

sürüde farklı hayvanlardan ve laktasyonun farklı zamanlarından toplanan meme sekresyonlarında benzer DNA izlerinin yaygın olduğunu da göstermişlerdir. *S. uberis*'in subklinik olgularında etkenler arasında heterojenite olduğu, klinik olgulardaki etkenlerde ise bu heterojenitenin daha az olduğunu belirlemişlerdir.

Rato ve ark. (2007), 30 *S. uberis* suşunda 18 farklı profil belirlemiş, 3 profil yapısını izolatların yarısında görmüş ve ortak profil yapısını hayvandan hayvana geçen veya aynı orijinli suş olarak belirtmişlerdir. Douglas ve ark. (2000), aynı çiftlik orijinli *S. uberis* etkenlerinde genetik olarak birbirinden bağımsız ve benzerlik göstermeyen bantlarla karşılaşmış, çok az benzerlik bulmuştur.

Mian ve ark. (2002), *S. uberis* etkenlerine OPA primerleri ile yaptıkları RAPD-PCR çalışmasında aynı ve farklı çiftliklerdeki farklı hayvanlardan sağlanan *S. uberis* etkenlerinde benzer profiller görmüşlerdir. Profiller incelendiğinde örneklerin orijinlerinin farklı olsa bile aynı RAPD-PCR profillerini oluşturduğu gözlenmiştir. Kullanılan OPA primerlerinden ikisi tüm *S. uberis* suşlarında aynı profilleri verirken, bir OPA primeri ise sadece bir *S. uberis* suşunda farklı bant profili oluşturmuştur. Araştırmacılar bakterinin DNA yapısındaki küçük bir mutasyonun bu etkiyi yaratabileceği görüşüne varmışlardır.

Zadoks ve ark. (2003), persiste infeksiyonların çoğunlukla tek bir suş tarafından, tekrarlı infeksiyonların ise farklı suşlar tarafından oluşturulduğunu belirtmişlerdir. Bir hayvanda birden fazla meme lobunun enfekte olduğu durumlarda ise tüm infeksiyonun tek bir suş tarafından oluşturulduğu ve dominant suşlardan ileri gelen infeksiyonlarda kronik bir karakterin oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Yaptıkları RAPD-PCR tiplendirmesinde 111 *S. uberis*'den 12 tanesini, 41 izolattan ise 7 adetini tiplendirmişlerdir. Etkenlerin yakınlıklarına baktıklarında ise 17 adet farklı profil görüntülemişler ve 17 adet farklı profilden sadece 2 profili dominant olarak belirlemişlerdir.

S. uberis etkenlerinde varyasyonun bu derece yüksek olması, *S. uberis*'in çevrede oportunistik bir etken olarak bulunmasına bağlanmıştır. Bu heterojenik yapının oluşmasında aynı zamanda coğrafi bölgelere bağlı farklılıklarında etkili olduğu

belirtilmiştir (Gilbert ve ark., 2006). Farklı profillerin olması etkenlerin farklı çevre orijinli olduğunu ve etkenlerin etkili bir şekilde kontrol edilebilmesi için de sürüler arası ve coğrafik alanlara bağlı farklılıkların göz önüne alınmasının gerekliliği üzerinde durulmuştur.

Zadoks ve ark. (2003) *S. uberis* etkenlerinin mastitis kontrol programları oluşturmada önemli bir bariyer olduğunu belirtmiş bunun nedenini de etkenlerin epidemiyolojisinin belirlenememiş olması ile açıklamışlardır. Araştırmacılar *S. uberis* infeksiyonlarının epidemiyolojilerinin anlaşılması için daha fazla çalışmaya gerek olduğunu, özellikle RAPD-PCR yönteminde kompleks bant profillerinin görülmesi nedeni ile bu yöntemi standart hale getirmenin zor olduğunu belirtmişlerdir (Wieliczko ve ark., 2002; Schukken, 2003; Zadoks ve ark., 2003).

1.6. Streptokok Mastitislerinin Laboratuvar Tanısı

Streptokoklara bağlı mastitis infeksiyonlarının belirlenmesi için laboratuvar teşhis metotları uygulanmalıdır. Bunun için süt örnekleri, kanlı agara (%5-7 koyun kanlı) ekilir ve 37°C'de 24-48 saat inkübasyondan sonra üreme meydana gelen besiyerlerindeki kolonilere Gram boyama, katalaz ve oksidaz testi uygulanarak Gram pozitif kok, katalaz ve oksidaz testi negatif özellik gösteren etkenler *Streptococcus* spp. olarak tanımlanır (Winn ve ark., 2006). Tür düzeyinde ayırım yapmak için, CAMP, eskulin, sodyum-hippurat ve karbonhidrat fermentasyon testleri uygulanır (Quinn ve ark., 2004).

S. agalactiae etkenleri mikroskopik bakıda uzun zincirler halinde görülür. Lancefield gruplandırmasında B grubunda yer alan etkenler, CAMP testi pozitif, eskulin negatif, sodyum-hippurat testi pozitifdir. *S. dysgalactiae* etkenleri Lancefield gruplandırmasında C grubunda bulunurlar ve sodyum hippuratu hidrolize etmezler, bu özellikleri ile *S. agalactiae*'dan ayrılırlar. *S. uberis* eskulin ve sodyum-hippurat testi pozitifdir ve bazı suşları CAMP pozitif özellik gösterir (Çizelge 1.1.). *S. uberis* etkenleri serolojik olarak heterojenite gösterir (NMC, 1990, Quinn ve ark. 2004).

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

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

Streptokokların hemaglutinasyon oluşturma özellikleri Wibawan ve ark. (1993) tarafından araştırılmış, yapılan çalışmada B grubu streptokoklarda %43,4 oranında hemaglutinasyon özelliğine rastlanmıştır. Bu özelliğin daha yaygın olarak G grubu streptokoklarda görüldüğü göze çarparken daha az oranda C ve D grubu streptokok türlerinde belirlenmiştir. Ekin ve Gürtürk, (2006) B grubu streptokokların %11,6'sında hemaglutinasyon pozitifliği saptamışlardır. Kurl ve ark. (1989) 130 adet B grubu streptokok etkeninde sadece bir izolatta hemaglutinasyon özelliğini pozitif bulurken, C grubuna ait 35 izolattan 5'inde bu özelliği pozitif olarak tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, hemaglutinasyon özelliğinin bakterinin mukozal yüzeylere tutunmasında etkili olduğu ancak test sonuçlarının bakterilerin in vitro ortamda üretildiği koşullar ve besiyerinden etkilendiğini saptamışlardır.

Henslera ve ark. (2008) CAMP faktör gen yapısının homolog bir şekilde A, C ve G grubu streptokoklarda da bulunduğunu göstermişlerdir. McDonald ve ark. (2005) CAMP pozitif özelliğinin *S. uberis* etkenlerinde %9 oranında görülebileceğini belirtmişlerdir. Jiang ve ark. (1996) *S. agalactiae* ve *S. uberis* etkenlerinde bulunan CAMP yapısını karşılaştırdıkları çalışmada, her iki etkende bulunan CAMP faktör yapısının ve CAMP faktör yapısına karşı oluşan antikorların benzer olduğunu göstermişlerdir. *S. uberis* etkenlerinin CAMP testinde %19'unun pozitif olduğu ve eskulin testinde ise %11 oranında negatif olduğu belirlenmiştir (Odierno ve ark., 2006). Hassan ve ark. (2002) CAMP özelliği negatif olan *S. agalactiae* suşlarını moleküler olarak incelemişler ve ilgili primer ile yaptıkları PCR sonucunda genotipik olarak CAMP pozitifliği saptamışlardır. Araştırmacılar bu farklılığı ekspresyon hatasına bağlamışlardır. *S. uberis*, *S.*

canis ve *S. pyogenes* etkenlerinde fenotipik olarak belirlenen CAMP pozitifliği moleküler olarak da doğrulanmış ve bu gen bölgesinin *S. agalactiae* ile yakın ilişkili olduğu gösterilmiştir (Hassan ve ark., 2000).

Akay ve ark. (1993) streptokoklara uyguladıkları serotiplendirmede % 11,52 oranında A grubu, %36,27 oranında B grubu, %20,67 oranında C grubu yönünde pozitiflik elde etmiş, %14,23 oranında etkeni D grubu pozitif olarak tiplendirirken %12,20 oranında etken herhangi bir grup yönünden tiplendirilememiştir.

Zschöck ve ark. (2005), streptokokların ayırımında Lancefield serogruplandırmasının tüm streptokok türlerini doğru sınıflandıramadığını, çünkü grup spesifik antijenlerin her zaman bulunmadığını, farklı türler arasında benzer antijenlerin olduğunu ya da tek bir tür içerisinde birden fazla antijenin bulunabileceğini belirtmişlerdir. Kawata ve ark. (2004) Lancefield serogruplandırmasının daima türe spesifik sonuçlar vermediğini, bazı durumlarda atipik reaksiyonlarla karşılaşıldığını bildirmişlerdir. Fortin ve ark.(2003), izole ettikleri streptokoklara uyguladıkları Lancefield gruplandırmasında hatalı identifikasyon sonuçları almışlardır.

Devriese (1991), Lancefield serogruplandırmasını genellikle beta hemolitik özellik gösteren streptokok türleri için tanımlamış, hemoliz özelliği bulunmayan ya da alfa hemoliz gösteren streptokok türlerinin serogruplandırması için kullanımda grup spesifik antijenlerin bulunmaması gibi durumlarda kullanımının hatalı sonuçlar vereceğini belirtmiştir. Araştırmacı bu serotiplendirme yönteminde aynı grup spesifik antijenlerin farklı streptokok türleri üzerinde olabileceği gibi farklı antijenik yapılarında aynı streptokok türleri üzerinde bulunabileceğini belirtmiştir.

Kawata ve ark. (2004), streptokokların identifikasyonunda kullanılan Lancefield gruplandırmasının daima türe spesifik sonuçlar vermediğini bazı durumlarda atipik reaksiyonlarla karşılaşıldığını belirlemiş, PCR temeline dayalı teşhis metotlarının laboratuvarlarda uygulanması ile her türün kısa zamanda daha az maliyetle daha doğru identifiye edilebileceğini bildirmişlerdir.

Oliver ve ark. (1998), PCR temelli teşhis metotlarının kullanımı ile bir laktasyonda infeksiyon oluşturan etkenlerin gelecek laktasyondaki durumlarının veya oluşabilecek yeni infeksiyonların belirlenebileceğini bildirmişlerdir. Aynı zamanda PCR temelli yöntemler ile etkenlerin alttiplerinin, infeksiyon epidemiyolojisinin, aşı ve ilaç uygulamalarının belirlenebileceğini bildirmişlerdir.

Mastitis infeksiyonlarında moleküler metotların kullanımı ile araştırmalar bir veya birkaç etken yönünde olurken bazı çalışmalarda mastitise neden olan streptokokların yanı sıra *E. coli*, *S. aureus* gibi bakterilerde teşhis edilebilmektedir. Aynı zamanda süttten yapılan ekstraksiyon metodları da geliştirilerek PCR etkinliğinin artışı amaçlanmıştır (Riffon ve ark., 2001).

Moleküler temelli teşhis metotlarının farklı uygulama şekilleri ile mastitis infeksiyonlarında streptokokların teşhisi daha hızlı ve uygulanabilir hale gelmiştir. Rastgele primerlerin kullanımı ile yapılan RAPD-PCR testi ile etken identifikasyonu ve etkenin epidemiyolojik durumu belirlenebilmiştir. Etkenlerin süttten direkt identifikasyonunda bu yöntem başarılı sonuçlar vermiştir (Gillespie ve ark. 1997).

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

Duarte ve ark. (2004), B grubu streptokoklar için uyguladıkları RAPD-PCR prosedüründe mikroorganizmaların tiplendirilmesinde bu yöntemin kullanılabileceğini, ancak sonuçların yorumlanmasında ek tiplendirme metotlarının kullanılmasının güvenilirliği arttırdığını göstermişlerdir. Genel olarak farklı serotipler arasındaki ayrımı yüksek oranda bulmuşlardır. Araştırmacılar moleküler yöntemlerin kullanımının fenotipik metotlara oranla daha iyi sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. McDonald ve ark. (2005), Jayarao ve ark. (1992) farklı enzim kesimleri ile streptokokların tür düzeyinde ayrımını yapmışlardır. Tek reaksiyonda daha kısa sürede uygulanan RFLP-PCR metodunu konvansiyonel metotlara göre daha etkin bulmuşlardır.

Forsman ve ark. (1997), stafilokok ve streptokoklar için geliştirdikleri spesifik primerler ile etkene yönelik teşhis yapmışlardır. Phuektes ve ark. (2003) mastitis infeksiyonlarının teşhisinde multiplex PCR testini bir tarama testi olarak kullandıklarında *S. agalactiae*, *S. uberis* ve *S. dysgalactiae* etkenleri yanında *S. aureus*'u da bu test ile hızlı bir şekilde teşhis etmişlerdir. Aynı zamanda somatik hücre sayıları ile etken izolasyonu karşılaştırması yapmış ve somatik hücre sayısının yüksek olduğu durumlarda *S. agalactiae* etkenlerinin paralel olarak daha fazla izole edildiği daha sonra da *S. dysgalactiae* ve *S. uberis* etkenlerinin gözlemlendiğini bildirmişlerdir.

Martinez ve ark. (2001), *S. agalactiae* etkenlerinin teşhisi için 16S rRNA bölgesine yaptıkları PCR ve enzim kesimleri ile hedef bantların sekans analizlerini yaparak spesifik primerler geliştirmişlerdir. Bu spesifik primerler ile süttten direkt streptokok teşhisini yapmışlardır.

Estuningsih ve ark. (2002), farklı bölgelerden izole ettikleri mastitis orijinli *S. agalactiae* suşlarına 16S rRNA ve 16S-23S rDNA bölgeleri için yaptıkları PCR testleri sonucunda etkenler arasında bu gen bölgeleri bakımından üniformite ve genetik yakınlık bulmuşlar, bu sonucu yaptıkları RFLP-PCR analizi ile de doğrulamışlardır. Ancak Zschöck ve ark. (2005), tarafından yapılan çalışmada farklı bölgelerdeki *S. agalactiae* etkenlerini genetik olarak birbirinden bağımsız bulmuşlar, Martinez ve ark. (2000) *S. agalactiae* etkenleri arasında yüksek oranda genetik farklılık olduğunu belirtmişlerdir.

Baseggio ve ark. (1997), PFGE ile yaptıkları streptokok tiplendirmesinde farklı işletmelerden izole edilen etkenlere bakıldığında *S. agalactiae* izolatları arasında birbirine eş ve benzer bantlar bulurken, *S. dysgalactiae* suşlarının restriksiyon örneklerinin *S. agalactiae*'dan daha kompleks ve farklı olduğunu, en büyük farklılığa ise *S. uberis* etkenlerinin sahip olduğu ve etken izolatlarının restriksiyon kesimlerinin de büyük farklılık gösterdiğini görmüşlerdir. Ayrıca PFGE sonuçlarına göre *S. agalactiae* ve *S. dysgalactiae* etkenlerinin farklı işletmelerde sürü bazında benzer profillere sahip olduğu görülürken *S. uberis* etkenlerinin işletmeler arası ve işletme için de en fazla varyasyon gösteren etken olduğunu belirtmişlerdir.

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

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

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

Wieliczko ve ark. (2002) *S. uberis* etkenlerine OPE4 primeri ile yaptıkları RAPD-PCR sonucunda etkenler arasındaki profil farklılıklarını belirlemişler ve bazı bantları görüntüleyememişlerdir. Bu durumu da kullanılan DNA miktarındaki ve termal cykler programındaki farklılığa dayandırmışlar ve aynı zamanda bulguların tekrar edilebilirliğinin düşük olduğunu bu nedenle RAPD-PCR yönteminde optimizasyon şartının olduğunu vurgulamışlardır.

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

Jayarao ve Oliver, (1994) yaptıkları RAPD-PCR değerlendirmesinde sonuçları klasik biyokimyasal sonuçlarla karşılaştırmışlar ve konvansiyonel yöntem ile ayıramayan yakın genotipli etkenleri bu yöntem ile ayırabilmişlerdir. Araştırmacılar bu RAPD-PCR yönteminin kültürel ve biokimyasal testlere bağlı atipik reaksiyonlardan etkilenmediğini de ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar 1996 yılında yaptıkları çalışmada ise, 40 adet farklı primerden OPE4 ve OPA20 primerlerini seçerek bu primerleri streptokok türlerinin

identifikasyonunda kullanmışlardır. RAPD-PCR sonucuna göre oluşan birden fazla bant profili içerisinde ortak bantlar bulunarak etkenlerin tür düzeyinde identifikasyonu yapılmıştır.

1.7. Koruma ve Kontrol

Mastitisli bir ineği tedavi etmek yerine o ineği mastitise karşı korumak çok daha ekonomiktir. Bu nedenle işletmelerdeki inekleri koruma altına alan bir program uygulanmalıdır. Bu programlar ile daha az mastitis olgusu, daha az süt kaybı, daha az iş gücü olmakta ve tedavi masrafları asgariye inmektedir (Baştan, 2009). Streptokok infeksiyonlarının kontrol edilmesi içinde belirli kritik kontrol noktaları oluşturulmuştur. Sağım sırasındaki hijyen kuralları, kuru dönem tedavisi, sağım öncesi ve sonrası meme dezenfeksiyonu, kronik infekte hayvanların sürüden uzaklaştırılması, sağım makinelerinin optimum şartlarda kullanımı bu kontrol noktalarını oluşturur (Blowey ve Edmondson, 1995a).

Streptokokkal infeksiyonların tedavisi için etkenlerin duyarlı olduğu penisilin grubu antibiyotikler kullanılabilir. Hem laktasyon döneminde hem de kuru dönemde bu şekilde sağaltım ile %60- 90 oranında başarı sağlanır. Alınacak diğer koruyucu önlemler etkenin çevresel veya kontagiyöz yapısına bağlı olarak seçilir. Çevresel streptokok infeksiyonlarında çevresel şartlar iyileştirilmelidir (Pyörola, 1995).

Bu çalışmada, mastitisli sütlerden etken izolasyonu yapılarak, Streptokokların mastitis etiyolojisindeki rolleri klasik kültür yöntemi ile belirlenecektir. Ayrıca izole edilen Streptokok suşlarının moleküler tekniklerle (polimeraz zincir reaksiyonu; PCR) tiplendirilmesi ve moleküler epidemiyolojileri ile ilgili temel bilgilerin sağlanması amaçlanmıştır. Bu çalışma Türkiye’de, mastitislerden izole edilen Streptokoklar ile ilgili detaylı moleküler analizler içermesi nedeniyle orijinal bir nitelik taşımaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.Gereç

Bu çalışmada Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na getirilen mastitis problemi gösteren hayvanlara ait sütler ile çeşitli işletmelerden steril koşullarda, uygun örnekleme ile alınan, toplam 1135 adet süt örneği konvansiyonel metotlarla streptokoklar yönünden incelendi. Örneklerin sağlandığı işletmeler Çizelge 2.1.'de verilmiştir. İşletme 1'de 1-10 inekten oluşan 11 aile işletmesinden sağlanan örnekler yer almıştır. İşletme 5 ise, el ile sağım yapılan düşük kapasiteli bir süt işletmesidir. İşletme 2, 3, 4 ve 6 olarak kodlanan işletmeler ise, büyük kapasiteli modern süt işletmeleridir.

2.1.1. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar

Süt örneklerinden streptokokların izolasyon ve identifikasyonunda kanlı agar (Oxoid), Edwards medium (Oxoid CM27), Todd-Hewitt Broth, Hippurat solüsyonu (Merck 820648), Ninhidrin ayracı (Merck 7484659662) kullanıldı. İzole edilen suşların Lancefield serogruplandırılması spesifik ticari antiserumlar (BBL) ile gerçekleştirildi. Todd-Hewitt Broth içeriği aşağıda verilmiştir.

Çizelge.2.1. Örnek sağlanan işletmeler

İŞLETME ADI	YER	ADET
İşletme 1	Ankara	125
İşletme 2	Balıkesir	194
İşletme 3	Ankara	284
İşletme 4	Çorum	100
İşletme 5	Yozgat	16
İşletme 6	Balıkesir	416
TOPLAM		1135

Todd- Hewitt Broth

Meat extract	10 g	(Atabay kimya sanayi-tic.İstanbul)
Tryptone	20 g	(Merck 1158219)
Glucose	2 g	(Merck 1187206)
NaHCO ₃	2 g	(Merck 2481381)
NaCl	2 g	(Merck K23313400 639)
Na ₂ HPO ₄	0,4 g	(Merck 1183996)

Kimyasallar tartılıp, 1 L distile su içerisinde hazırlandıktan sonra 5'er ml olacak şekilde cam tüplere bölündü ve 121°C'de 15-20 dak. otoklavlandı.

İzole edilen Streptokok suşlarını saklamak amacıyla Todd-Hewitt Broth kimyasalları yukarıdaki formüle göre hazırlandı. Bunlara %30 oranında gliserin eklendi. Brothlar 500 µl olacak şekilde ependorflara bölünerek, 121 °C de 15-20 dk. otoklavlandı.

2.1.2. PCR’da Kullanılan Buffer, Solüsyon, Primer ve Enzimler

İzole edilen streptokokların PCR temelli tekniklerle identifikasyonu ve tiplendirilmesi amacıyla, Taq Polimeraz (Fermentas 4835, Litvanya), 10X PCR buffer (Fermentas 8303, Litvanya), 25 mM MgCl₂ (Fermentas 6703, Litvanya), 10 mM dNTP set (Fermentas 00018519, Litvanya), DNA marker (Fermentas 00028313, Litvanya), Agaroz (Prono agaroz 091629PR), 6X Loading dye (Fermentas 00032454, Litvanya), Ethidium Bromide, DNA Ekstraksiyon Kiti (MoBio Ultra clean Microbial DNA isolation kit), Dietilpirokarbonatlı su (Fermentas, Litvanya), TBE solüsyonu, primerler (Çizelge 2.2), restriksiyon enzimleri [*Hha*1 (00034240), *Msp*1 (00042007), *Rsa*1 (00028695), *Alu*1 (00042825) ve *Hae*III (00022508); Fermentas, Litvanya] kullanıldı.

Çizelge. 2.2. Kullanılan primerlerin ilgili gen bölgeleri ve baz dizilimleri.

Primer	Spesifite	Gen bölgesi	Sekans	Kaynak
5’ primer 3’ primer	<i>Streptococcus</i> spp	16S rDNA	5’-CCAAGCTTGCTCAGGACGAACGCT-3’ 5’-CGGGATCCCCGCCCGGGAACGTATTAC-3’	(Jayarao ve ark. 1992)
OPE-04		Random	5’-GTGACATGCC-3’	(Gillespie ve ark. 1997)
F primer 16SL R primer 23SR	<i>Streptococcus</i> spp	16S-23S rDNA	5’ACGATGAGTGCTAGGTGTTAGG-3’ 5’-CTCACGGTACTGGTTCACAT-3’	(McDonald ve ark. 2005)

2.1.3. PCR’da Kullanılan Alet ve Ekipmanlar

DNA Thermal Cycler (Biometra, Germany), elektroforez tankı ve güç kaynağı (Wealtec elite 3000 plus ABD), UV transillüminatörlü bilgisayarlı jel dokümantasyon sistemi (Gene Genius, Bio Imaging System, England), ısıtma bloğu (Bio TDB 100, Letonya), soğutmalı santrifüj (Hettich), steril kabin (Bioair Instruments, Aura 2000, Mac, İtalya), vorteks (Fine vortex), hassas terazi (Scaltec sbc41, Almanya) kullanıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. İzolasyon ve İdentifikasyon

Laboratuara getirilen süt örneklerinden kanlı agarlara ekimler yapılarak 37°C’de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda besiyerlerinde yapılan değerlendirmelerde 1-3 mm çapında, S tipli koloniler seçilerek Gram boyama yöntemi ile boyandı. Mikroskopik olarak Gram pozitif kok şeklinde olan kolonilere katalaz testi yapıldı ve katalaz negatif koloniler *Streptococcus* spp. olarak kabul edildi (Akan, 2006, Winn ve ark.,2006). Tür düzeyinde identifikasyon amacıyla CAMP, eskulin, sodyum-hippurat testleri kullanıldı (Quinn ve ark. 2004). İzole edilen streptokokların saklanması amacıyla gliserinli Todd-Hewitt Broth kültürleri -20 °C’ ye kaldırıldı (Fortin ve ark. 2003; McDonald ve ark. 2005).

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

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

2.2.1.3. Na-Hippurat Testi: Bu test için %1 oranındaki Na-hippurat solüsyonu 0,5 ml'lik tüplere bölündü. Hazırlanan Na-hippurat solüsyonuna streptokok kolonilerinden ekimler yapıldı. Negatif kontrol için bir adet Na-hippurat solüsyonuna herhangi bir şey eklenmedi. Tüm tüpler 37°C'lik su banyosunda 2 saat inkübe edildi. Süre sonunda her tüp üzerine 0,2 ml ninhidrin ayırıcı eklendi ve 37°C'lik su banyosunda 10 dk. daha inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda mor menekşe renk oluşması testin pozitif, açık leylak rengi testin sonucunun negatif olduğunu gösterdi. Negatif sonuç veren suşlar, *S. dysgalactiae* olarak ayrıldı (Quinn ve ark.; 2004; Winn ve ark., 2006)

2.2.1.4. Hemagglütinasyon Testi: Hemagglütinasyon testi Wibawan ve ark. (1993)'nın bildirdikleri yöntemine göre yapıldı. Test için sitratlı enjektöre tavşan kanı alındı. Kan 1500 rpm de 10 dk. santrifüj edildi ve %0,9'luk fizyolojik tuzlu su ile 2 defa yıkanarak %2'lik eritrosit süspansiyonu hazırlandı. Test edilecek streptokok suşları 2 ml'lik Todd Hewitt Broth içinde 24 saat inkübe edildi. Temiz bir lam üzerine eşit miktarlarda buyyon kültürü ile yıkanmış tavşan eritrositi eklenerek karıştırıldı. Lamdaki karışımda 30 sn. içinde kümeleşme olup olmadığına bakılarak değerlendirme yapıldı. Kümeleşmenin olması testin pozitif olduğunu, kümeleşme olmaması testin negatif olduğunu gösterdi.

2.2.1.5. Hemoliz: Streptokok suşlarının oluşturduğu hemoliz özellikleri koloniler etrafında bulunan hemoliz yapılarına göre kaydedildi. Buna göre koloni etrafında şeffaf ve tam bir hemolizin olması beta hemoliz, yeşil renkli bir hemoliz görülmesi alfa hemoliz, hiç hemoliz olmaması gama hemoliz olarak tanımlanarak kaydedildi (NMC, 1990).

2.2.1.6. Lancefield Serogruplandırması: Gruplandırma için liyofilize haldeki ekstraksiyon enzimi, 12 ml steril distile su ile sulandırıldı. Sulandırılan enzim solüsyonu 100 µl lik hacimlerde steril ependorflara bölündü. İzole edilen her suşdan birkaç koloni

öze yardımıyla alınarak enzim solüsyonu ile süspanse edildi. Süspansiyon 37°C’de 10 dk. bekledikten sonra identifikasyon kartlarının her bir gözüne birer damla damlatıldı. 6 farklı (A, B, C, D, F, G) gruptaki spesifik serumlar ilgili gözlere dağıtılarak her bir göz ayrı karıştırma çubukları ile karıştırıldı. Bir kaç dk. bekletildikten sonra hangi gözde aglütinasyon görülüyorsa o göze ait grup ilgili bakteri suşu için pozitif olarak değerlendirildi (Lancefield, 1938; Ruoff, 1995).

2.2.2. Moleküler Analiz

Konvansiyonel yöntemlerle cins ve tür düzeyinde identifiye edilen streptokokların moleküler yöntemlerle de identifikasyonu ve tiplendirilmesi için RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism) ve RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic Deoxyribonucleic Acid) işlemleri gerçekleştirildi. Her iki PCR yönteminin DNA ekstraksiyon işlemi aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

2.2.2.1. DNA Eldesi (Ekstraksiyon)

PCR testinde kullanılacak DNA için kit ekstraksiyon yöntemi kullanıldı. Kit ekstraksiyon yönteminde üretici firmanın prosedürüne uyuldu (MO BIO Ultraclean Microbial DNA Isolation Kit-Carlsbad, Kalifornia, USA). Bu prosedüre göre 2 ml’lik koleksiyon tüpüne 1,8 ml kadar bakteri sıvı kültürü alındı. 10000 rpm’de 30 sn. santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak santrifüj işlemi tekrarlandı ve sıvı kısım tamamen uzaklaştırıldı. Tüp dibinde kalan tortu üzerine 300 µl microbead solüsyonu eklenerek vortekslendi. Karışım microbead tüplerine aktarıldı. Tüp içerisine 50 µl MD1 solüsyonu eklendi. DNA eldesinin fazla olması için bu karışım 65°C’de 10 dk. inkübe edilerek 2 dk. vortekslendi. Ardından 10000 rpm’de 30 sn. santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir ependorfa alındı. Süpernatant üzerine 100 µl MD2 solüsyonu eklendi ve 5 sn. vortekslendi. Sonra 4°C’de 5 dk. inkübe edildi ve 10000 rpm de 1 dk. santrifüj edildi.

Pelete dokunmadan süpernatant tekrar yeni bir ependorfa alındı ve 900 µl MD3 solüsyonu eklendi, 5 sn. vortekslendi. 700 µl'lik kısım spin filtre bulunan santrifüj tüpüne alındı ve 10000 rpm'de 30 sn. santrifüj edildi (bu işlem ependorftaki tüm sıvı kısım bitene kadar tekrarlandı). Filtrenin altında kalan sıvı kısım her defasında atıldı ve filtre üzerine 300 µl MD4 solüsyonu eklendi ve tekrar santrifüj işlemi tekrarlandı. Spin filtre yeni bir ependorfa takıldı ve üzerine 50 µl MD5 solüsyonu eklendi. 30 sn. 10000 rpm de tekrar santrifüj edildikten sonra ependorf dibinde kalan sıvıda DNA toplandı. PCR aşamasında kullanmak için -20 °C'de saklandı (Beare ve ark., 2009)

2.2.2.2. RFLP-PCR: Ekstraksiyonu gerçekleştirilen streptokok suşlarının cins ve tür düzeyinde identifikasyonlarının yapılması için 2 farklı RFLP-PCR uygulaması kullanıldı. Jayarao ve ark. (1992) tarafından kullanılan prosedürde, streptokokların cins düzeyinde identifikasyonları yapılarak, etkenlerin tek enzim kesimleri ile tür düzeyinde ayrımları yapıldı. McDonald ve ark. (2005) kullandıkları RFLP-PCR prosedüründe ise çift enzim kombinasyonları ile cins ve tür düzeyinde identifikasyon yapıldı.

Jayarao ve ark. (1992)'nin kullandığı prosedüre göre 100 µl lik toplam hacim için primerlerden 0,5 µl, Taq DNA polimeraz 0,5 µl, dNTP mix 1µl, PCR buffer 10 µl, MgCl₂ 8 µl, DNA 5µl ve DEPC 74,5 µl olarak kullanıldı. PCR siklusları 93 °C de 90 sn., 56 °C'de 90 sn. ve 75 °C'de 90 sn. toplam 35 siklus şeklinde programlandı. Amplikonlar *HhaI*, *RsaI* ve *MspI* enzimleri ile kesildi. Enzim kesiminde 5 µl amplikon 20 µl enzim ile 2 saat 37°C'de tutularak kesim sağlandı.

McDonald ve ark. (2005)'nin kullandığı protokolde 10xPCR buffer 5 µl, MgCl₂ 4 µl, dNTP 1µl, F primer 16SL 0,25 µl, R primer 23SR 0,25 µl, taq polimeraz 0,5 µl, DEPC 34 µl ve DNA 5 µl miktarında toplam hacim 50 µl olacak şekilde kullanıldı. PCR siklusları 95 °C'de 3 dk. ardından 35 siklus olacak şekilde 94 °C'de 1 dk., 50 °C'de 1 dk., 72 °C'de 2 dk. ve final ekstensiyon 72 °C'de 10 dk. olarak programlandı.

Amplifikasyon aşamasından sonra her ampikonun *HaeIII-RsaI*, *HaeIII-AluI* enzim çiftleriyle kesimi gerçekleştirildi. Kesim esnasında 10xTaq buffer 2 µl, enzim (1 U/µl) 1 µl, ampikon 7 µl, DEPC 10 µl miktarlarında kullanıldı. 37 °C’de 3 saat kesime bırakıldı. Enzim kesimleri gerçekleştirildikten sonra elektroforez aşamalarına geçildi ve ilgili bantlar yönünden incelendi.

2.2.2.3. RAPD-PCR: İzole edilen Streptokokların moleküler tiplendirilmesi için Gillespie ve ark.(1997) tarafından bildirilen RAPD-PCR yöntemi uygulandı. Bu PCR prosedürüne göre; 10XPCR buffer 2,5 µl, 25 mM MgCl₂ 2 µl, dNTP 1 µl, TE buffer 11,8 µl, OPE-04 primer 2 µl, DNA 5 µl total hacim 25 µl olacak şekilde hazırlandı. PCR siklusları 94,5 °C’de 120 sn., 35 siklus olacak şekilde 94,5 °C’de 70 sn., 33 °C’de 60 sn. ve 72°C’de 130 sn. olacak şekilde programlandı. Ampikonlar elektroforez işlemine tabi tutuldu.

2.2.2.4. Elektroforez

RFLP-PCR ve RAPD-PCR sonucunda örneklerin elektroforezinde %2’lik agaroz jel kullanıldı. Bu işlem için 4 g agaroz (Basica Le Agarose, Prona, İspanya) tartılarak steril bir erlene konuldu. Üzerine tris borate EDTA (TBE) buffer (x0,5 konsantrasyonda)’dan 200 ml eklenerek karıştırıldı. Mikrodalga fırında 1 dk. 45 sn. tutularak eritildi. Eriyen agaroz soğutulduktan sonra içerisine ethidium bromide (0,5 µg/ml) eklenerek karıştırıldı ve yatay DNA elektroforez cihazının kalıbına döküldü. Hemen tarak yerleştirilerek örneklerin ekleneceği gözler agar üzerinde açıldı. Agar iyice katılaştıktan sonra tarak çıkartıldı. Agaroz jel elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankına jelin yüzeyini kaplayacak şekilde 0,5 x TBE buffer konuldu. Her bir ampikondan 10µl alınarak 3µl 6X loading dye ile karıştırıldı ve jel gözlerine yükleme yapıldı. Elektroforez cihazı güç kaynağına bağlanarak sabit akımda 150 voltta 2 saat elektroforez edildi.

Sonuçlar UV-transilluminator da incelenerek Genius marka (Syngene,ABD) görüntüleme ünitesinde fotoğraflandı (Gillespie ve ark., 1997).

3. BULGULAR

Bu çalışmada, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na getirilen mastitis problemi gösteren hayvanlara ait sütler ile çeşitli işletmelerden sağlanan toplam 1135 adet süt örneği streptokoklar yönünden incelendi. İzole edilen etkenlerin tür düzeyinde identifikasyonları fenotipik ve moleküler özellikleri incelenerek gerçekleştirildi. Ayrıca izole edilen Streptokokların moleküler benzerlikleri de değerlendirildi.

3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

İncelenen 1135 süt örneğinin 68 (%6)'inden *Streptococcus* spp. izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen suşların 13 (%19,1)'ü *S. agalactiae*, 14 (%20,6)'ü *S. dysgalactiae* ve 41 (%60,3)'i *S. uberis* olarak identifiye edildi. Fenotipik özelliklerine göre, en yüksek düzeyde *S. uberis* izole edilirken, *S. agalactiae* ve *S. dysgalactiae* izolasyon oranlarının birbirine yakın olduğu belirlendi. İzole edilen Streptokokların 9 (%13,2)'unda CAMP pozitifliği bulundu. Tür düzeyinde identifikasyonda kullanılan fenotipik özelliklerine göre özellikle *S. agalactiae* suşlarında CAMP pozitifliğinin (%30,8) değişken olduğu görüldü ve Na-hippurat pozitif sonuç veren suşlar *S. agalactiae* olarak değerlendirildi (Çizelge 3.1.). Ayrıca *S. uberis* suşlarında da CAMP pozitifliği (%12,2) saptandı.

İzole edilen etkenlerin hemagglütinasyon özelliğinin düşük düzeyde (%7,3) olduğu belirlendi (Çizelge 3.2.). Bu özellik *S. agalactiae*'da %15,4, *S. dysgalactiae*'de %7,1 ve *S. uberis*'te %4,8 olarak tespit edildi.

Streptokok suşlarında hemoliz özellikleri incelendiğinde; *S. agalactiae*'de alfa hemoliz % 23,1, beta hemoliz % 61,5, gama hemoliz % 15,4, *S. dysgalactiae*'de alfa hemoliz % 64,3, beta hemoliz % 14,3, gama hemoliz % 21,4 ve *S. uberis*'te alfa hemoliz % 75,6, gama hemoliz % 24,4 bulunurken beta hemoliz görülmedi (Çizelge 3.2.). *S.*

agalactiae'de en yüksek düzeyde (% 6,5) beta hemoliz, *S. dysgalactiae*'de alfa hemoliz (% 64,3) ve *S. uberis*'te de alfa hemoliz (% 75,6) gözlemlendi. *S. uberis* suşlarının hiçbirinde beta hemoliz saptanmadı.

Lancefield serogruplandırmasında, identifiye edilen 13 *S. agalactiae* suşunun 12 (% 92,3)'sinin B grubunda yer aldığı belirlenirken bir suş tiplendirilemedi. *S. dysgalactiae* suşlarının tamamının C serogrubunda olduğu belirlendi. İncelenen 41 adet *S. uberis* suşunun 16 (% 39)'sı C serogrubunda, 7 (% 17,1)'si B serogrubunda ve 6 (% 14,6)'sı D grubunda yer alırken 12 (% 29,3) *S. uberis* suşu serogruplandırılmadı. Bu bulgular, *S. uberis* suşlarının Lancefield serogruplandırmasının heterojenite gösterdiğini ortaya koydu.

Çizelge.3.1. İzole edilen Streptokokların identifikasyonunda kullanılan test bulguları

Türler	CAMP	Eskulin Hidrolizi	Na-Hippurat Hidrolizi
<i>S. agalactiae</i> (n:13)	4 (% 30,8)	-	13 (% 100)
<i>S. dysgalactiae</i> (n:14)	-	-	-
<i>S. uberis</i> (n:41)	5 (% 12,2)	41(%100)	41 (% 100)

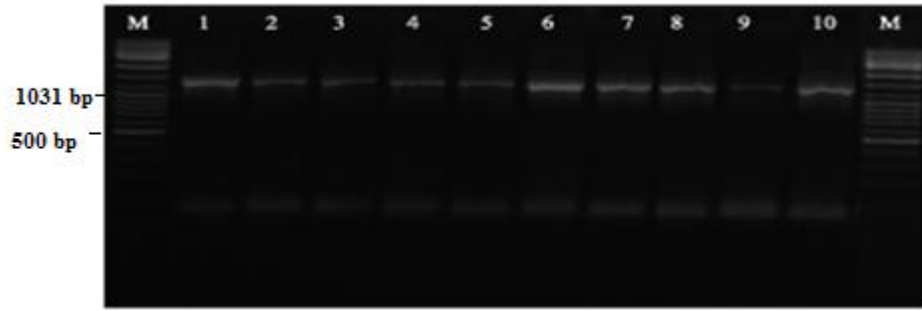
Çizelge.3.2. İzole edilen Streptokoklarda hemagglütinasyon, hemoliz ve Lancefield serogruplandırma bulguları

Türler	Hemagglütinasyon	Hemoliz			Lancefield			
		Alfa	Beta	Gama	B	C	D	TG
<i>S. agalactiae</i> (n:13)	2	3	8	2	12	-	-	1
<i>S. dysgalactiae</i> (n:14)	1	9	2	3	-	14	-	-
<i>S. uberis</i> (n:41)	2	31	-	10	7	16	6	12
Toplam (n:68)	5	43	10	15	19	30	6	13

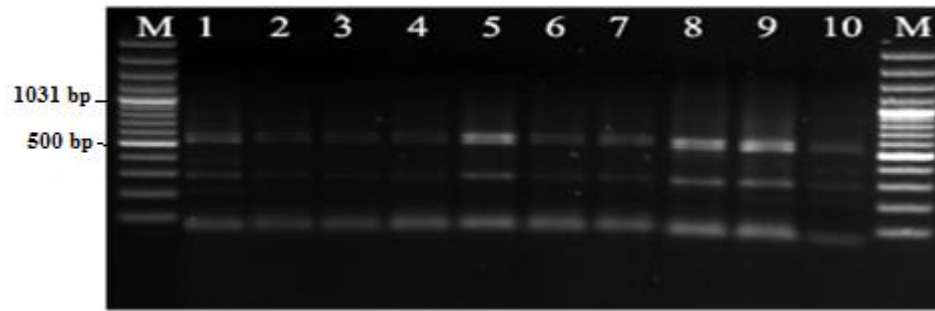
TG: Tiplendirilemeyen streptokoklar.

3.2. Moleküler Analiz Bulguları

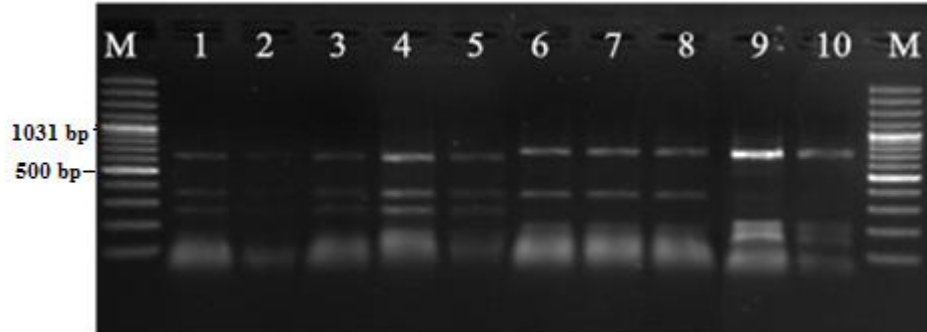
RFLP-PCR Bulguları: Farklı işletmelerden izole edilen 68 adet Streptokok etkeninin 16S rDNA bölgesinin amplifikasyonu sonucunda tüm suşlarda 1400-1500 bp'lik spesifik bantlar gözlemlendi (Şekil 3.2.1). Bu suşların *HhaI* enzimi ile yapılan RFLP-PCR analizinde; tüm streptokok suşların da ortak olan 280, 550 ve 600 bp büyüklüğündeki bantlar görüntülendi (Şekil 3.2.2). Moleküler düzeyde tür düzeyinde identifikasyon amacıyla *RsaI* enzimi ile yapılan RFLP-PCR analizinde; incelenen suşlarda 200 bp büyüklüğünde bantların görülmesi, bu suşların *S. uberis* ve *S. parauberis*; 270 bp'lik bantların görülmesi *S. agalactiae* ve *S. dysgalactiae* olarak ayrılmasını sağladı. Ayrıca bu analizde; *S. uberis* ve *S. parauberis* etkenlerinin ayırımına ilave olarak 240 bp'lik bantın *S. uberis*, 370 bp'lik bantın *S. parauberis*'de saptanması ile *S. uberis*'in *S. parauberis*'ten ayrılmasını sağladı (Şekil 3.2.3). *S. agalactiae* ve *S. dysgalactiae* etkenlerinin tür düzeyinde identifikasyonu için *MspI* enzimi ile gerçekleştirilen RFLP-PCR'de 570 bp'lik bant *S. agalactiae* ve 490 bp'lik bant *S. dysgalactiae* için spesifik kabul edildi ve bu iki tür arasında ayırım gerçekleştirildi (Şekil 3.2.4). 16S rDNA bölgesinin RFLP-PCR analiz sonuçlarına göre, konvansiyonel tekniklerle *Streptococcus* spp. olarak identifiye edilen 68 adet suşun tamamı *Streptococcus* spp. olarak tanımlandı. Tür düzeyinde identifikasyonda ise, 68 adet suşun 9 (%13,2)'u *S. uberis*, 13 (%19,1)'ü *S. agalactiae*, 14 (%20,6)'ü *S. dysgalactiae* ve 32 (%47,1)'si *S. parauberis* olarak identifiye edildi. Bu sonuç, konvansiyonel yöntemlerle *S. agalactiae* ve *S. dysgalactiae* identifikasyonu ile tamamen uyumlu olmasına karşın; *S. uberis* olarak identifiye edilen suşlardan *S. parauberis*'in ayrılmasını sağladı.



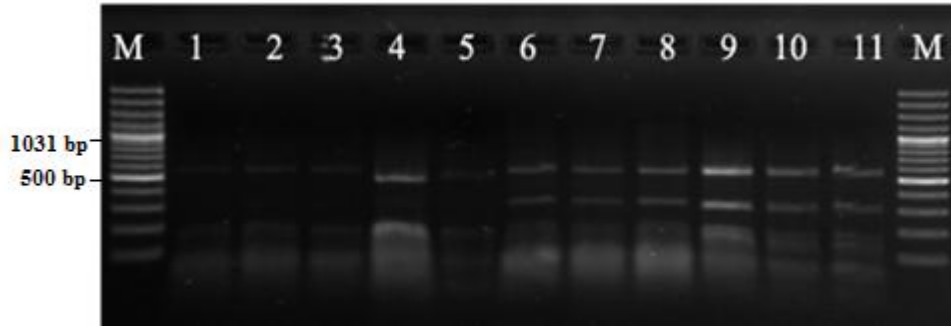
Şekil 3.2.1.RFLP-PCR bulguları (16S rDNA kesim yapılmamış). M: Moleküler ağırlık marker (Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas, Litvanya) 1-10: *Streptococcaceae* ailesi.



Şekil 3.2.2.RFLP-PCR bulguları (*HhaI* ile kesilmiş 16S rDNA). M: Moleküler ağırlık marker (Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas, Litvanya) 1-10: *Streptococcus* spp. 1-3: *S. agalactiae*, 4-5: *S. dysgalactiae*, 6-10: *S. uberis*.

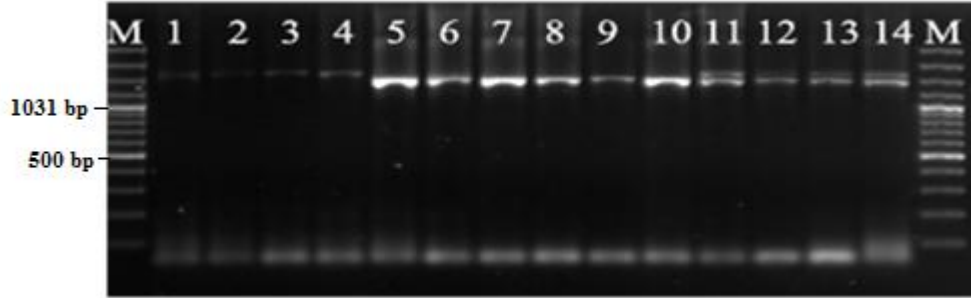


Şekil 3.2.3. RFLP-PCR bulguları (*RsaI* ile kesilmiş 16S rDNA). M: Moleküler ağırlık marker (GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas, Litvanya) 1-5: *S. agalactiae* ve *S. dysgalactiae*, 6-8: *S. parauberis*, 9-10: *S. uberis*

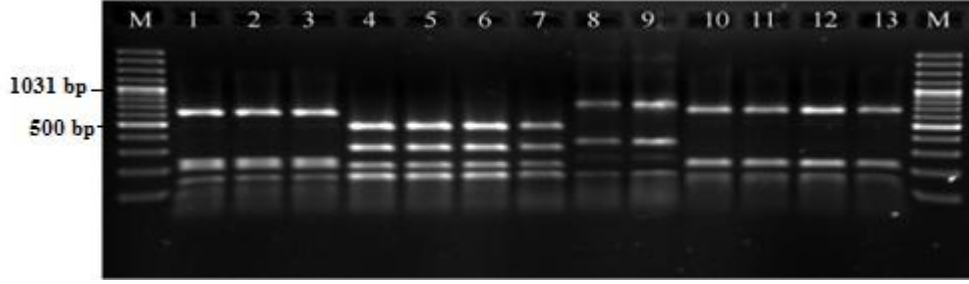


Şekil 3.2.4. RFLP-PCR bulguları (*MspI* ile kesilmiş 16S rDNA). M: Moleküler ağırlık marker (Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas, Litvanya) 1-3: *S. agalactiae*, 4-5: *S. dysgalactiae*, 6-8: *S. parauberis*, 9-11: *S. uberis*

Streptokoklarda 16S-23S rDNA'nın RFLP-PCR analizinde tüm suşlarda 1460-1590 bp'lık bantlar gözlemlendi (Şekil 3.2.5). *Hae3-Rsa1*, *Hae3-Alu1* enzim kombinasyonları ile yapılan RFLP-PCR analizinde; *Hae3-Rsa1* kesiminden sonra elde edilen bant profillerinin farklılık gösterdiği saptandı (Şekil 3.2.6). Bu sonuçlar, 16S rDNA ile yapılan RFLP-PCR bulguları ile birlikte değerlendirildi.

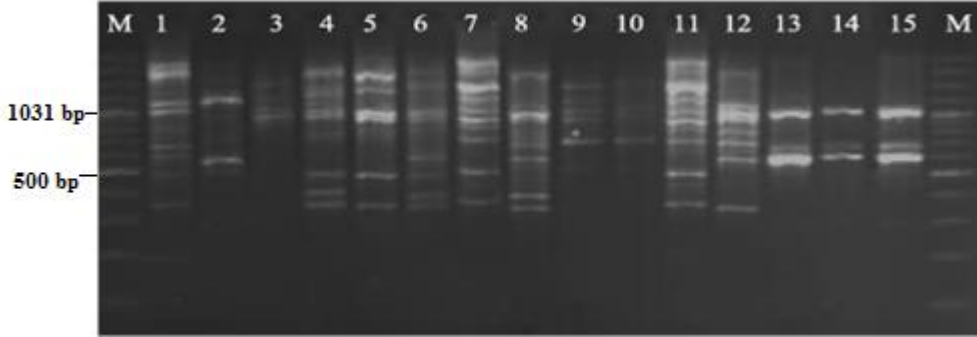


Şekil 3.2.5. RFLP-PCR bulguları (16S-23S rDNA kesim yapılmamış) M: Moleküler ağırlık marker (Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas, Litvanya) 1-14: *Streptococcaceae* ailesi.



Şekil 3.2.6. RFLP-PCR bulguları (*Hae3-Rsa1* ile kesilmiş 16S-23S rDNA) M:Moleküler ağırlık marker (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus, Fermentas, Litvanya) 1-3: *S. agalactiae*, 4-7: *S. dysgalactiae*, 8-9: *S. parauberis*, 10-13: *S. uberis*

RAPD-PCR Bulguları: OPE-04 primeri ile yapılan RAPD-PCR analizinde; *S. agalactiae*'da 3; *S. dysgalactiae*'da 2; *S. uberis*'te 5 ve *S. parauberis*'te 9 farklı bant patterni saptandı (Şekil 3.2.7). RAPD-PCR bant patternlerinin işletme düzeyinde değerlendirilmesi sonucunda, işletmelere spesifik ortak bir bant patterninin olmadığı ve suşların değişkenlik gösterdiği belirlendi. Bu bulgu, Streptokok türlerinin tür düzeyinde identifikasyonu için OPE-04 primerinin kullanıldığı RAPD-PCR yönteminin uygun olmadığını ve sadece aynı işletmeden izole edilen suşlar arasında farklı patternleri saptamak için kullanılabileceğini gösterdi.



Şekil 3.2.7. OPE-04 RAPD-PCR bulguları (RFLP-PCR'a göre tiplendirilmiş Streptokokların RAPD-PCR analizi) M:Moleküler ağırlık marker (Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas, Litvanya) 1-2-4-5-6-8: *S. parauberis*, 3-7-9-10: *S. agalactiae*, 11-12: *S. uberis*, 13-14-15: *S. dysgalactiae*

3.3. Konvansiyonel ve Moleküler Tekniklerin Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi

Süt örneklerinden Streptokokların izolasyon ve identifikasyonu için kullanılan konvansiyonel ve moleküler tekniklerle elde edilen bulgular birlikte değerlendirildiğinde, tür düzeyinde identifikasyonda farklılıklar belirlendi (Çizelge 3.3.). Konvansiyonel yöntemlerle *S. uberis* olarak identifiye edilen 41 suşun 9 (%22)'u *S. uberis* olarak identifiye edilirken 32 (%78)'sinin *S. parauberis* olduğu belirlendi. Bu sonuç, moleküler yöntemlerin Streptokokların tür düzeyinde identifikasyonu için oldukça yararlı olduğunu ortaya koydu.

Konvansiyonel ve moleküler tekniklerin birlikte kullanılması sonrasında, sütlerden izole edilen Streptokokların türlere dağılımının işletmelere göre dağılımları Çizelge 3.4.'de verilmiştir. İşletmelere göre Streptokok izolasyonunun farklılık gösterdiği ve %2 ile %22,4 arasında değiştiği saptandı. En yüksek izolasyon oranı, aile tipi işletmelerden oluşan grupta (İşletme 1; 1-10 inek arası) ve kapasitesi düşük İşletme 5'te görülmesi, yetiştirme ve sağım şekli ile ilişkili problemlerin streptokok mastitislerinde rol oynadığını ortaya koydu. İzolasyon oranlarının işletmelere göre değerlendirilmesi sonrasında, bir işletme dışında *S. parauberis*'in tamamında izole edildiği ve üç işletmede dominant tür olduğu belirlendi. Diğer işletmelerin ikisinde *S. dysgalactiae* ve birinde *S. uberis* diğer etkenlere göre daha yüksek oranda izole edildi. Bu sonuç, mastitis etiyojisinde *S. parauberis*'in de önemli rol oynayabileceğini ortaya koydu.

Çizelge 3.3.. Konvansiyonel ve moleküler tekniklerle elde edilen karşılaştırmalı identifikasyon bulguları

<i>Streptococcus</i> spp. (n:68)	Konvansiyonel test sonuçları	RFLP-PCR sonuçları
<i>S. agalactiae</i>	13	13
<i>S. dysgalactiae</i>	14	14
<i>S. uberis</i>	41	9
<i>S. parauberis</i>	-	32

Çizelge 3.4. Streptokok türlerinin neden olduğu mastitislerin işletmelere göre dağılımı

İşletme	Örnek sayısı	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. uberis</i>	<i>S. parauberis</i>
İşletme 1	125	28 (%22,4)	7 (%25)	4 (%14)	4 (%14)	13 (%47)
İşletme 2	194	8 (%4,1)	-	1 (%13)	-	7 (%87)
İşletme 3	284	10 (%3,5)	3 (%30)	5 (% 50)	-	2 (%20)
İşletme 4	100	2 (%2)	-	-	2 (%100)	-
İşletme 5	16	3 (18,7)	-	2 (%67)	-	1 (% 33)
İşletme 6	416	17 (%4)	3 (%18)	2 (%12)	3 (%18)	9 (%52)
TOPLAM	1135	68 (%6)	13 (%19,1)	14 (%20,6)	9 (%13,2)	32 (%47,1)

4.TARTIŞMA

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

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

Bentley ve ark. (1993) mastitisli sütlerden izole edilen 206 Gram pozitif kokun sadece üçünün *S. parauberis* olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, *S. parauberis* etkenlerinin

S. uberis'den ayrımının zor olduğunu ve buna bağlı olarak epidemiyolojileri hakkında sınırlı bilgi bulunduğunu belirtmişlerdir. Pitkala ve ark. (2008) Finlandiya'da yaptıkları çalışmada 137 adet *S. uberis* izolatının ikisini *S. parauberis* olarak tanımlamışlar ve *S. parauberis* suşlarının antibiyotik dirençliliklerinin *S. uberis* ile benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir. Devriese ve ark. (1999) klinik ve subklinik mastitislerden izole edilen katalaz negatif ve eskulin pozitif Gram pozitif kokların, çoğunlukla *S. uberis* olarak tanımladığını ve yeterince doğru tanımlamaya gidilmediğini bildirmişlerdir.

Türkiye'de yapılan çalışmalarda, Dakman (2000) inek mastitis olgularından %12,8 oranında *Streptococcus* spp. izolasyonu gerçekleştirmiş ve bu streptokokların %4,5'inin *S. agalactiae* olduğunu bildirmiştir. Karahan (2005) incelediği mastitisli süt örneklerinden % 24,3 oranında *Streptococcus* spp. izole etmiş ve izole edilen etkenlerin %10,4'ü *S. agalactiae* ve %13,9'unu diğer streptokoklar olarak tanımlamıştır. Arda ve İstanbulluoğlu, (1981) ise mastitisli sütlerde %8,7 *S. agalactiae* ve % 4,6 *S. uberis* izolasyonu gerçekleştirmiştir. Şahin ve ark. (1997) ise, sütlerden streptokok izolasyon oranını %29,82 olarak bulmuş, ve bunların %14,03 *S. agalactiae*, %8,77 *S. dysgalactiae* ve %7,02 *S. uberis* olarak tanımlanmıştır.

Bu tez çalışmasında incelenen 1135 adet süt örneğinin 68 (%6)'inden *Streptococcus* spp. izole edildi. İzole edilen suşların konvansiyonel testler ve PCR sonuçlarına göre 13 (%19,1)'ü *S. agalactiae*, 14 (%20,6)'ü *S. dysgalactiae*, 9 (%13,2)'u *S. uberis* ve 32 (%47,1)'si *S. parauberis* olarak tanımlanmıştır.

Bu çalışmadaki elde edilen ortalama izolasyon oranı, daha önce Türkiye'de yapılan çalışmalardan elde edilen bulgulara göre düşük düzeyde bulunmuştur. Bu bulgu, ortalama streptokok izolasyon oranı üzerinden değerlendirildiğinde süt inekçiliği yapan işletmelerde mastitis kontrol programlarının uygulanmasından kaynaklanabilir. Diğer çalışmalarda elde edilen izolasyon oranları oldukça farklı düzeylerde. Mastitisin oluşmasında bakteriyolojik nedenler dışında çok sayıda parametrenin rol oynamasının, direkt olarak streptokok izolasyon oranları üzerinde etki yaptığı bildirilmektedir (Tenhagen ve ark., 2009). Bu durum bu çalışmada, işletme düzeyinde elde edilen

bulgularla desteklenmiştir. Bu çalışmada işletmelerde streptokok izolasyon oranları %2 ile %22,4 oranları arasında bulunmuştur ve en yüksek streptokok izolasyon oranına sahip sütlerin aile tipi işletme olan çiftliklerden sağlandığı ortaya konmuştur. Bu bulgu, işletmelerde sağım şekilleri başta olmak üzere uygulanan mastitis kontrol programlarının streptokok nedenli mastitis olgularının azaltılmasında etkili olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada diğer çalışmalardan farklı olarak PCR ile *S. uberis* ile *S. parauberis* ayrımı yapılarak mastitisli süt örneklerinde *S. parauberis* prevalansı da belirlendi. Mastitisli sütlerde *S. parauberis* izolasyon oranının %47,1 düzeyinde olması ve üç işletmede en yüksek düzeyde izole edilmesi, bu türün mastitisin oluşumunda önemini gösterdi.

Streptokok türlerinde, CAMP özelliği B grubu streptokoklar tarafından oluşturulan ve bu etkenlerin ayırımında kullanılan testlerden biri olarak tanımlanmıştır. Ancak son zamanlarda bu özelliği kodlayan *cfb* gen yapısının farklı bakterilere klonlanarak geçiş yaptığı ve bu *cfb* gen yapısının homolog bir şekilde A, C ve G grubu streptokoklar yanında *S. uberis*, *Actinomyces pleuropneumonia* ve *Propionibacterium acnes*'de de identifiye edildiği belirlenmiştir. Ayrıca bu özelliği deneysel olarak kaybeden suşlarda plazmid aracılığı ile tekrar geri kazanılabildiği gözlenmiştir (Henslera ve ark., 2008). Jiang ve ark. (1996) *S. agalactiae* ve *S. uberis* etkenlerinde bulunan CAMP yapısını karşılaştırmışlar, her iki etkende bulunan CAMP faktör yapısında benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir. Odierno ve ark. (2006) CAMP testinde *S. uberis* etkenleri için %19 oranında CAMP pozitifliğe rastlamışlardır. Khan ve ark. (2003) 130 adet *S. uberis* etkeninde 5 adet CAMP pozitif suş bulmuşlardır. Hassan ve ark. (2002) CAMP özelliğini moleküler olarak incelemişler ve bu özelliği, CAMP testi negatif olan *S. agalactiae* yanında *S. uberis*, *S. canis* ve *S. pyogenes*'de de saptamışlardır. McDonald ve ark. (2005) CAMP pozitif özelliğinin *S. uberis* etkenlerinde %9 oranında görülebileceğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada, izole edilen 68 adet Streptokok suşunun CAMP özelliği konvansiyonel olarak incelendi. İncelenen 68 adet suşun 9 (%13,2)'unda CAMP testi pozitif sonuç verdi ve bunlardan 4'ü *S. agalactiae* ve 5'i *S. uberis* suşlarında saptandı.

Bu bulgu streptokok suşlarında identifikasyonda kullanılan ve *S. agalactiae*'nin identifikasyonunda önemli bir test olan CAMP pozitifliği hakkında klasik bilgilerden farklı bir bulgu olarak değerlendirildi. *S. agalactiae* ve *S. uberis* suşlarında CAMP test sonuçları, Henslera ve ark. (2008), Jiang ve ark. (1996), McDonald ve ark. (2005), Odierno ve ark. (2006) ve Hassan ve ark. (2002)'nin bulgularını destekler niteliktedir.

Streptokokların hemagglütinasyon oluşturma özellikleri farklı araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Wibawan ve ark. (1993), B grubu streptokoklarda %43,4 hemagglütinasyon pozitifliği saptamıştır. Araştırmacılar, bu özelliğin G grubu streptokoklar ile C ve D grubu streptokoklarda da belirlemiş ve hemagglütinasyon pozitifliği ile bakterinin üretildiği laboratuvar koşulları ve besiyeri bileşeninin etkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Kurl ve ark. (1989) 130 adet B grubu streptokok etkeninde sadece bir izolatta hemagglütinasyon özelliğini pozitif bulurken, C grubuna ait 35 suşun beşinde bu özelliği pozitif tespit etmişlerdir. Türkiye'de yapılan çalışmalarda; Ekin ve Gürtürk, (2006), B grubu streptokokların %11,6'sında ve Dakman (2000) 119 adet *S. agalactiae* suşunun 18 (%15,1)'inde hemagglütinasyon pozitifliği saptamışlardır.

Bu tez çalışmasında yapılan hemagglütinasyon testinde incelenen 68 Streptokok suşunun 5 (%7,3)'inde pozitif sonuç alınırken *S. agalactiae* suşlarında %15,4 düzeyinde pozitiflik bulunmuştur. Ayrıca *S. dysgalactiae* ve *S. uberis* etkenlerinde de hemagglütinasyon pozitifliği belirlenmiştir.

Çalışmada izole edilen streptokok suşlarında ortalama olarak elde edilen %7,3 pozitiflik oranı, diğer çalışmalarda elde edilen bulgulara benzer düzeydedir. *S. agalactiae* suşlarında belirlenen %15,4 pozitiflik oranı, Ekin ve Gürtürk, (2006) ve Dakman (2000) tarafından bildirilen oranlara benzerlik göstermektedir. Ancak Wibawan ve ark. (1993) bildirdiği orandan düşük; Kurl ve ark. (1989) tarafından bildirilen değerden ise yüksek bulunmuştur. Bu farklılık, izole edilen suşların orijinlerinin farklı olması ile açıklanmıştır. *S. dysgalactiae*, *S. uberis* ve *S. parauberis* etkenlerinde de hemagglütinasyon pozitiflik görülmesi, Wibawan ve ark.(1993) ile Kurl ve ark. (1989)'nin bulgularını destekler niteliktedir.

Akay ve ark. (1993) mastitislerden izole ettikleri streptokok suşlarını, laboratuarda hazırlanan koaglutinasyon testi ile Lancefield serogruplandırmasında, %11,52 oranında A grubu, %36,27 oranında B grubu, %20,67 oranında C grubu, % 14,23 oranında D grubunda olduğunu ve suşların %12,2'sini serogruplandıramadıklarını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada yapılan Lancefield serogruplandırılmasında, izole edilen 68 adet streptokok suşunun 19 (%27,9)'u B grubu, 30 (%44,1)'u C grubu, 6 (%8,8)'sı D grubunda belirlenirken 13 (%19,2)'ü gruplandırılmadı. Lancefield serogruplandırılmasında, 13 *S. agalactiae* suşunun 12 (%92,3)'sinin B grubunda yer aldığı belirlenirken bir suş tiplendirilemedi. *S. dysgalactiae* suşlarının tamamının C serogrubunda olduğu belirlendi. İncelenen 41 adet *S. uberis* suşunun 16 (%39)'sı C serogrubunda, 7 (%17,1)'si B serogrubunda ve 6 (%14,6)'sı D grubunda yer alırken 12 (%29,3) *S. uberis* suşu serogruplandırılmadı. Bu bulgular, Akay ve ark. (1993) tarafından bildirilen serogruplandırma bulgularından farklılıklar göstermektedir. Bu farklılık ve elde edilen serogruplandırma bulguları; Zschöck ve ark. (2005) streptokokların ayırımında Lancefield serogruplandırılmasının tüm streptokokları doğru sınıflandırmadığını, farklı türler arasında benzer antijenlerin olduğunu ya da tek bir tür içerisinde birden fazla antijenin bulunabileceğini; Kawata ve ark. (2004) Lancefield serogruplandırılmasının daima türe spesifik sonuçlar vermediğini, bazı durumlarda atipik reaksiyonlarla karşılaşıldığını bildiren değerlendirmelerini destekler niteliktedir.

Streptokokların tür düzeyinde identifikasyonları için farklı moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler özellikle *S. uberis*'in tiplendirilmesinde kullanılmaktadır ve restriksiyon enzimlerini kullanarak yapılan moleküler çalışmalarda konvansiyonel tekniklerle *S. uberis* olarak identifiye edilen suşlardan *S. parauberis*'in ayrılmasını sağlamaktadır (Jayarao ve ark.,1991b; Williams ve Collins,1991; Hassan ve ark.,2001; Khan ve ark., 2003).

Duarte ve ark. (2005), RFLP-PCR yöntemini konvansiyonel metotlara göre tek reaksiyonda daha kısa sürede teşhis sağlaması bakımından etkin bir metot olarak belirlemişlerdir. Odierno ve ark. (2006) RFLP-PCR metodu ile konvansiyonel testlerin

uygulanması sonrasında RFLP-PCR yönteminin %100 doğru identifikasyon yaptığını, ancak konvansiyonel test sonuçlarının RFLP-PCR yöntemini tam olarak desteklemediğini bildirmişlerdir.

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

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

Bu çalışmada RFLP-PCR analizinde, konvansiyonel tekniklerle *Streptococcus* spp. olarak identifiye edilen 68 adet suşun tamamı *Streptococcus* spp. olarak tanımlandı. Tür düzeyinde identifikasyonda ise, 68 adet suşun 9 (%13,2)'u *S. uberis*, 13 (%19,1)'ü *S. agalactiae*, 14 (%20,6)'ü *S. dysgalactiae* ve 32 (%47,1)'si *S. parauberis* olarak identifiye edildi. Bu sonuç, konvansiyonel yöntemlerle *S. agalactiae* ve *S. dysgalactiae* identifikasyonu ile tamamen uyumlu olmasına karşın; *S. uberis* olarak identifiye edilen suşlardan *S. parauberis*'in ayrılmasını sağladı.

Bu çalışmada elde edilen bulgular, streptokokların tür düzeyinde identifikasyonu ile ilgili olarak Jayarao ve ark. (1992), Odierno ve ark. (2006) ve Duarte ve ark. (2005) tarafından bildirilen sonuçları destekler niteliktedir. Bu çalışma ile özellikle *S. uberis* suşlarından *S. parauberis*'in ayrılmasında RFLP-PCR analizinin oldukça etkin olarak kullanılabilirliği ortaya konmuştur.

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

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

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

Bu çalışmada RAPD-PCR analizinde *S. agalactiae* suşlarında 3, *S. dysgalactiae* 'da 2, *S. uberis* 'te 5 ve *S. parauberis* 'de 9 farklı bant patterni elde edildi. Bu bulgular, RAPD-PCR'nin streptokokların tiplendirilmesi için uygun bir yöntem olmadığını ortaya koydu.

Bu çalışmada RAPD-PCR analiz bulguları Jayarao ve ark. (1994), Chatellier ve ark. (1997) ve Duarte ve ark. (2004) ile uyumlu bulundu. RAPD-PCR analiz bulguları, bu yöntemin tekrarlanabilirliği ve standart hale getirilmesi için ilave moleküler yöntemlere ihtiyaç duyulduğunu bildiren Duarte ve ark. (2004) görüşlerini destekler niteliktedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mastitis şüpheli sütlerden streptokokların izolasyonu, identifikasyonu ve moleküler tiplendirilmesi amacıyla yapılan bu tez çalışmasında aşağıdaki sonuçlara varılmıştır.

- İncelenen sütlerin %6'sından *Streptococcus* spp. izole edildi. Bu sonuç, genel olarak streptokokların mastitis etiyojisinde düşük düzeyde rol oynadığını gösterdi.
- Bu çalışmada, *S. uberis* ile *S. parauberis* ayrımı yapılarak mastitisli süt örneklerinde *S. parauberis* prevalansı da belirlendi. Mastitisli sütlerde *S. parauberis* izolasyon oranının %47,1 düzeyinde olması ve üç işletmede en yüksek düzeyde izole edilmesi, bu türün mastitiste rolünü ortaya koyması bakımından önemli bulundu.
- Bu çalışmada işletmelerde streptokok izolasyon oranlarının %2 ile %22,4 düzeyleri arasında olduğu belirlendi. Bu bulgu, özellikle yüksek oranda streptokok nedenli mastitislerin görüldüğü işletmelerde yetiştirme ve sağım şeklinin değerlendirilmesinin yararlı olduğunu düşündürdü.
- Bu çalışmada, *S. agalactiae*'nin identifikasyonunda önemli olan CAMP testinde, bazı *S. uberis* suşlarında da pozitif sonuç alınması, streptokokların konvansiyonel identifikasyonunda ilave testlerin de yapılması gerektiğini ortaya koydu.
- Bu çalışmada yapılan Lancefield serogruplandırılmasında, gruplandırılmayan suşların çoğunluğunun (%29,3) *S. uberis* olması, Lancefield serogruplandırılmasının özellikle *S. uberis* suşlarında yeterince bir ayrım yapamadığını ortaya koydu.
- Bu çalışmada RFLP-PCR analizinde, konvansiyonel tekniklerle *Streptococcus* spp. olarak tanımlanan 68 adet suşun tamamı *Streptococcus* spp. olarak tanımlandı. Bu çalışma RFLP-PCR analizinin streptokokların hem cins hem de

tür düzeyinde ve özellikle *S. uberis* suşlarından *S. parauberis*'in ayrılmasında oldukça etkin olduğunu gösterdi.

- Bu çalışmada RAPD-PCR analizinde *S. agalactiae* suşlarında 3, *S. dysgalactiae* 'da 2, *S. uberis*'te 5 ve *S. parauberis*'de 9 farklı bant patterni elde edilmesi, RAPD-PCR analizinin streptokokların tiplendirilmesi için uygun bir yöntem olmadığını ortaya koydu.
- Bu çalışmada elde edilen bulgular çerçevesinde, mastitis etiyolojinin iyi belirlenmesi ve işletme yapısına bağlı olarak düzenlenecek mastitis kontrol programları, hem streptokok hem de diğer nedenlere bağlı mastitis probleminin çözümüne önemli katkılar sağlayacaktır.

ÖZET

Sığır Mastitislerinden Streptokok Türlerinin İzolasyonu ve Moleküler Tiplendirilmesi

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

Bu çalışmada incelenen 1135 süt örneğinin 68 (%6)'sinden *Streptococcus* spp. izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen suşların 13 (%19,1)'ü *S. agalactiae*, 14 (%20,6)'ü *S. dysgalactiae* ve 41 (%60,3)'i *S. uberis* olarak tanımlanmıştır. İzole edilen Streptokokların 9 (%13,2)'unda CAMP pozitiflik belirlendi. Tür düzeyinde tanımlamada kullanılan fenotipik özelliklerine göre özellikle *S. agalactiae* suşlarında CAMP pozitifliğinin (%30,8) değişken olduğu belirlendi ve Na-hippurat pozitif sonuç veren suşlar *S. agalactiae* olarak değerlendirildi. Ayrıca *S. uberis* suşlarında da CAMP pozitifliği (%12,2) saptandı.

İzole edilen etkenlerin hemagglütinasyon özellikleri %7,3 oranında bulunurken, *S. agalactiae*'de %15,4, *S. dysgalactiae*'de %7,1 ve *S. uberis*'te %4,8 olarak tespit edildi. Streptokok suşlarında hemoliz özellikleri incelendiğinde; *S. agalactiae*'de alfa hemoliz %23,1, beta hemoliz %61,5, gama hemoliz %15,4, *S. dysgalactiae*'de alfa hemoliz %64,3, beta hemoliz %14,3, gama hemoliz %21,4 ve *S. uberis*'te alfa hemoliz %75,6, gama hemoliz %24,4 bulunurken beta hemoliz görülmedi.

Lancefield serogruplandırmasında, tanımlanmış 13 *S. agalactiae* suşunun 12 (%92,3)'ünün B grubunda yer aldığı belirlenirken bir suş tanımlanamadı. *S. dysgalactiae* suşlarının tamamının C serogrubunda olduğu belirlendi. İncelenen 41 adet *S. uberis* suşunun 16 (%39)'sı C serogrubunda, 7 (%17,1)'si B serogrubunda ve 6 (%14,6)'sı D grubunda yer alırken 12 (%9,3) *S. uberis* suşu serogruplandırılmadı.

İzole edilen streptokokların RFLP-PCR analizinde, 68 suşun 9 (%13,2)'u *S. uberis*, 13 (%19,1)'ü *S. agalactiae*, 14 (%20,6)'ü *S. dysgalactiae* ve 32 (%47,1)'si *S. parauberis* olarak tanımlanmıştır. OPE-04 primeri ile yapılan RAPD-PCR analizinde; *S. agalactiae*'de 3, *S. dysgalactiae*'de 2, *S. uberis*'te 5 ve *S. parauberis*'te 9 farklı bant patterni saptandı.

Sonuç olarak, süt örneklerinden Streptokokların izolasyon ve tanımlaması için kullanılan konvansiyonel ve moleküler tekniklerle elde edilen bulgular birlikte değerlendirildiğinde, tür düzeyinde tanımlamada farklılıklar belirlendi. Konvansiyonel yöntemlerle *S. uberis* olarak tanımlanmış 41 suşun 9 (%22)'u *S. uberis* olarak tanımlanırken 32 (%78)'sinin *S. parauberis* olduğu belirlendi. Bu

sonuç, moleküler yöntemlerin Streptokokların tür düzeyinde identifikasyonu için oldukça yararlı olduğunu ortaya koydu.

Anahtar sözcükler: Mastitis, PCR, Sığır, Streptokok

SUMMARY

Molecular Typing of Streptococcus Species Isolated From Cow's Mastitis

The aim of study, isolation *Streptococcus* spp. from milk samples according to conventional and then evaluate of these samples according to molecular test and detecting of *Streptococcus* spp. strains. Additionally detection of molecular epidemiology in mastitis cases.

In this study, *Streptococcus* spp. were isolated from 68 of 1135 (6%) milk samples thirteen (19,1%), 14 (20,6%) and 41 (60,3%) strains were identified as *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, respectively. CAMP test was positive for 9 of all *Streptococcus* spp. (13,2%). The CAMP positive property that used for differentiation of strains was *S. agalactiae* variable (30,8%) especially for *S. agalactiae* strains. Additionally, the strains were named as *S. agalactiae* if they had Na-Hippurate positive results. On the other hand CAMP positive property was found in *S. uberis* strains (12,2%).

Haemagglutination properties were detected 7,3%, 15,4%, 7,1% and 4,8% for isolated strains, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* and *S. uberis*, respectively. According to haemolysis properties, 23,1% alpha, 61,5% beta, 15,4% gamma haemolysis were observed for *S. agalactiae*. In *S. dysgalactiae* strains 64,3% alpha, 14,3% beta, 21,4% gamma haemolysis were detected. Although, 75,6% alpha and 24,4% gamma haemolysis were seen, beta haemolysis was not found for *S. uberis*.

Twelve of 13 strains of were placed into Lancefield serogroup B. One strain of *S. agalactiae* could not be classified. All strains of *S. dysgalactiae* were placed into group C. Sixteen (39%) , 7 (17,1%) and 6 (14,6%) of 41 strains of *S. uberis* were placed into serogroup C, B and D respectively. But 12 strains (9,3%) couldn't be classified.

Nine (13,2%), 13 (19,1%), 14 (20,6%) and 32 (47,1%) of 68 strains were identified as *S. uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* and *S. parauberis* by using RFLP-PCR analysis method respectively.

According to the RAPD-PCR method with OPE-04 primer, different 3, 2, 5 and 9 patterns were identified for *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis* and *S. parauberis*, respectively.

Nine of 41 strains were detected as *S. uberis* and 32 strains were *S. parauberis* by molecular methods although all strains were evaluated as *S. uberis* by the conventional methods. This result showed that the molecular methods were beneficial for identification of Streptococcus species.

Key Words: Cow, Mastitis, PCR, Streptococcus

KAYNAKLAR

- ABDULMAWJOOD, A., LAMMLER, C. (1999) Amplification of 16S ribosomal RNA gene sequences for the identification of streptococci of Lancefield group B. *Res.Vet.Sci.* **67**: 159-162
- AKAN, M. (2006) Streptococcus İnfeksiyonları. In: *Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar)* Ed: Aydın N, Paracıkoğlu J. İlke-Emek Yayınevi. Ankara. s.: 15-29
- AKAY, Ö., İZGÜR, M., ESENDAL, Ö., CETİN, C. (1993) İnek sütlerinden izole edilen streptokok suşlarının sero-gruplandırılması. *Doğa-Tr. J.Vet.Anim.Sci.* **17**: 89-95
- ALMEIDA, R. A., BATCHA, T., OLIVER. S. P. (2007) Persistence of *Streptococcus uberis* in Bovine Mammary Epithelial Cells. In: *Mastitis in Dairy Production Current knowledge and Future Solutions*. Ed: Hogeveen H. Wageningen Academic Publishers, Netherlands. p.: 137-142
- ARDA, M., İSTANBULLUOĞLU, E. (1981) Mastitislere sebep olan aerobik-mikroaerofilik anaerobik bakterilerin izolasyon ve identifikasyonları üzerinde çalışmalar. *Doğa Bilim Dergisi, Vet.Hay.Tar.Orm.* **5**: 125-130
- ATASEVER, S., ERDEM, H. (2008) Süt sığırlarında mastitis ile sütün elektriksel iletkenliği arasındaki ilişkiler. *OMÜ.Zir.Fak.Dergisi.* **23**: 131-136
- AYDIN, N., BAYSAL, T. (1995) Mastitis mücadele programının uygulanması üzerinde çalışmalar. veteriner ve hayvancılık araştırma grubu. TÜBİTAK.Proje no:989
- BASEGGIO, N., MANSELL, P. D., BROWNING, J. W., BROWNING, G. F. (1997) Strain differentiation of isolates of streptococci from bovine mastitis by pulsed field gel electrophoresis. *Mol Cell Probes.* **11**: 349-54
- BAŞTAN, A. (2009) Mastitisten Korunmada Temel İlkeler. In: *İneklerde Meme Hastalıkları*. Hatipoğlu Basım ve Yayıncılık Tic.Ltd.Şti. s.:84-105
- BEARE, P. A., UNSWORTH, N., ANDOH, M., VOTH, D. E., OMSLAND, A., GILK, S. D., WILLIAMS, K. P., SOBRAL, B.W., KUPKO, J. J., PORCELLA, S. F., SAMUEL, J. E., HEINZEN, R. A. (2009) Comparative genomics reveal extensive transposon-mediated genomic plasticity and diversity among potential effector proteins within the genus *Coxiella*. *Infect. Immun.* **77**: 642–656
- BENTLEY, R.W., LEIGH, J. A., COLLINS, M.(1993) Development and use of species-specific oligonucleotide probes for differentiation of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis*. *J. Clin.Microbiol.* **31**: 57-60
- BERT, F., PICARD, B., BRANGER, C., LAMBERT-ZECHOVSKY, N. (1996) Analysis of genetic relationships among strains of groups A, C and G streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis. *J. Med. Microbiol.* **45**: 278-284
- BLOWEY, R., EDMONDSON, P. (1995a) Mastitis-Causes, Epidemiology and Control. In: *Mastitis Control in Dairy Herds*. Publish.Farming Press. Books. NY. USA. p.:27-35
- BLOWEY, R., EDMONDSON, P. (1995b) Diseases of the Udder and Teat. In: *Mastitis Control in Dairy Herds*. Publish.Farming Press. Books. NY. USA. p:176-181
- BLOWEY, R., EDMONDSON, P. (1995c) Diseases of the Udder and Teat. In: *Mastitis Control in Dairy Herds*. Publish.Farming Press. Books. NY. USA. p.:77-92
- BOHNSACK, J. F., WHITING, A. A., MARTINEZ, G., JONES, N., ADDERSON, E. E., DETRICK, S., BONKOWSKY, A. N., BISHARAT, N., GOTTSCHALK, M. (2004) Serotype III *Streptococcus agalactiae* from bovine milk and human neonatal infections. *Emer.Infect.Dis.* **10**:1412-1418

- BOTTS, R. L., HEMKEN, R. W., BULL, L. S. (1979) Protein reserves in the lactating dairy cow. *J. Dairy Sci.* **62**: 433-440
- BRADLEY, A. J., LEACH, K. A., GREEN, L. E., GREN, M. J. (2007) Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in and Wales. *The Vet. Rec.* **160**: 253-258
- BRAY, D. R., SHEARER J. K. (2008) Mastitis control. The Institute of Food and Agricultural Sciences (IFAS) University of Florida, Gainesville FL 32611. Erişim: [http://edis.ifas.ufl.edu/ds128] Erişim tarihi: 01.12.09
- BUDDLE, B. M., TAGG J. R., RALSTON M. J. (1988) Use of an inhibitor typing scheme to study the epidemiology of *Streptococcus uberis* mastitis. *N.Z. Vet. J.* **36**: 115-119
- CHATELLIER, S., RAMANATSOA, C., HARRIAU, P., ROLLAND, K., ROSENAU, A., QUENTIN, R. (1997) Characterization of *Streptococcus agalactiae* strains by randomly amplified polymorphic dna analysis. *J.Clin.Microbiol* **35**: 2573-2579
- CHOTAR, M., VODOVA, B., GODANY, A. (2006) Development of specific and rapid detection of bacterial pathogens in dairy products by pcr. *Folia Microbiol.* **51**: 639-646
- COLQUE, J. I., DEVRIESE, L. A., HAESBROUCK F. (1993) Streptococci and enterococci associated with tonsils of cattle. *Lett.Appl.Microbiol.* **16**: 72-74
- CREMONESI, P., CASTIGLIONI, B., Malferrari, G., BIUNNO, I., VIMERCATI, C., MORONI, P., MORANDI, S., LUZZANA, M. (2006) Technical Note: improved method for rapid dna extraction of mastitis pathogens directly from milk. *J.Dairy Sci.* **89**: 163-169
- DAKMAN, A. (2000) Mastitise neden olan B grubu streptokokların teşhisinde konvansiyonel testler ile hemaglutinasyon testinin karşılaştırılması. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
- DEVRIESE, L.A. (1991) Streptococcal ecovars associated with different animal species: epidemiological significance of serogroups and biotypes. *J.Appl.Bacterio.* **71**:478-483
- DEVRIESE, L. A., HOMMEZ, J., LAEVEENS, H., POT, B., VANDAMME, P., HAESBROUCK, F. (1999) Identification of aesculin-hydrolyzing streptococci, lactococci, aerococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. *Vet. Microbiol.* **70**: 87-94
- DMITRIEV, A., SUVOROV, A., SHEN, A. D. (2004) Clinical diagnosis of group B streptococci by scpB gene based PCR. *Indian J. Med. Res.* **119** (Suppl): 233-236
- DOGAN, B., SCHUKKEN, Y. H., SANTISTEBAN, C., BOOR, K. J. (2005) Distribution of serotypes and antimicrobial resistance genes among *Streptococcus agalactiae* isolates from bovine and human hosts. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 5899-5906
- DOUGLAS, V. L., FENWICK, S. G., PFEIFFER, D. U., WILLIAMSON, N. B., HOLMES, C. W. (2000) Genomic typing of *S. uberis* isolates from cases of mastitis ,in New Zealand dairy cows using pulsed field gel electrophoresis. *Vet.Microbiol.* **75**: 27-41
- DUARTE, R. S., BELLEI, B. C., MIRANDA, O. P., BRITO, M. A. V. P., TEIXEIRA, L. M. (2005) Distribution of antimicrobial resistance and virulence-related genes among brazilian group B streptococci recovered from bovine and human sources. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**: 97-103
- DUARTE, R. S., MIRANDA, O. P., BELLEI, B. C., BRITO, M. A. V. P., TEIXEIRA, L. M. (2004) Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* Isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. *J.Clin. Microbiol.* **42**: 4214-4222
- EKİN, İ. H., GÜRTÜRK, K. (2006) Characterization of bovine and human group B streptococci Isolated in Turkey. *J. Medical Microbiol.* **55**: 517-521

- ESTUNINGSIH, S., SODERMANTO, I., FINK, K., LAMMLER, C., WIBAWAN, I. W. T. (2002) Studies on *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis in Indonesia. *J. Vet. Med. B.* **49**: 185-187
- FACKLAM, R. (2002) What happened to the Streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**: 613-620
- FERGUSON, J. D., AZZARO, G., GAMBINA, M., LICITRA, G. (2007) Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily from 2000 to 2006. *J. Dairy Sci.* **90**: 5798-5813
- FORSMAN, P., TILSALA-TIMISJÄRVI, A., ALATOSSAVA, T. (1997) Identification of staphylococcus and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiol.* **143**: 3491-500
- FORTIN, M., MESSIER, S., PARÉ, J., HIGGINS, R. (2003) Identification of catalase-negative, non-beta-hemolytic, gram-positive cocci isolated from milk samples. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 106-109
- GARRITY, G. M. (2001) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.5 Springer-Verlag, New York. Erişim: [<http://cme.msu.edu/Bergeys>]
- GARVIE E. I., FARROW J. A. E., BRAMLEY A. J. (1983) *Streptococcus dysgalactiae* (Diernhofer) norn. rev. *Int. J. System. Bacterial.* **33**: 404-405
- GARVIE, E. I., BRAMLEY, A. J. (1979) *Streptococcus uberis*: an approach to its classification. *J. Appl. Bacteriol.* **46**: 295-304
- GILBERT, F. B., FROMAGEAU, A., LAMOUREUX, J., POUTREL, B. (2006) Evaluation of tandem repeats for MLVA typing of *Streptococcus uberis* Isolated from bovine mastitis. *BMC Vet. Res.* **2**: 33-42
- GILLESPIE, B. E., JAYARAO, B. M., OLIVER, S. P. (1997) Identification of streptococcus species by randomly amplified polymorphic deoxyribonucleic acid fingerprinting. *J. Dairy Sci.* **80**: 471-476
- GILLESPIE, B. E., OLIVER, S. P. (2003) Comparison of an automated ribotyping system, pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic dna fingerprinting for genotyping *Streptococcus uberis*. *NMC Annual Meeting.* p.:350-351
- HASSAN, A. A., ABDULMAWJOOD, A., YILDIRIM, A. Ö., FINK, K., LAMMLER, C., SCHLENSTEDT, R. (2000) Identification of streptococci isolated from various sources by determination of cfb gene and other CAMP-factor genes. *Can. J. Microbiol.* **46**: 946-951
- HASSAN, A. A., AKINEDEN, Ö., LÄMMLER, C., HUBER-SCHLENSTEDT, R. (2002) Molecular characterization of phenotypically CAMP-negative *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. *J. Vet. Med. B.* **49**: 257-259
- HASSAN, A. A., KHAN, I. U., ABDULMAWJOOD, A., LÄMMLER, C. (2001) Evaluation of pcr methods for rapid identification and differentiation of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis*. *J. Clin Microbiol.* **39**: 1618-1621
- HASSAN, A. A., KHAN, I. U., LÄMMLER, C. (2003). Identification of *Streptococcus dysgalactiae* strains of Lancefield's group C, G and L by polymerase chain reaction. *J. Vet. Med.* **50**: 161 - 165
- HAWARI, A. D., AL-DABBAS, F. (2008) Prevalence and distribution of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Jordan prevalence and distribution of mastitis. *Am. J. Anim. Vet. Sci.* **3**: 36-39
- HENSLERA, M. E., QUACHAC, D., HSIEHA, C., DORAN, K. S., NIZET, V. (2008) CAMP factor is not essential for systemic virulence of Group B Streptococcus. *Microbial Pathogenesis* **44**: 84-88
- HULBERT, S. J., CURSONS, R. T., BENAVIDES, M. G., WILLIAMSON, J. H., SUMMERS, E. L., PRYOR, S. M., WOOLFORD, M. W. (2007) Isolation Of

- Streptococcus Uberis* from Different Sites of The Dairy Cow. In: *Mastitis In Dairy Production Current knowledge and future solutions*. Edit: Hogeveen, H. Wageningen Academic Publishers. Netherlands. p.: 635-641
- JAIN, N.C. (1979) Common mammary pathogens and factors in infection and mastitis. *J. Dairy Sci.* **62**: 128-134
- JANZEKOVIC, M., BRUS, M., MURSEC, B., VINIS, P., STAJNKO, D., CUS, F. (2009) Mastitis detection based on electric conductivity of milk. *J.A.M.M.E.* **34**: 39-46
- JAYARAO, B. M., DORÉ, J. J., BAUMBACH, G. A., MATTHEWS, K. R., OLIVER, S. P. (1991b) Differentiation of *Streptococcus uberis* from *Streptococcus parauberis* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA. *J Clin Microbiol.* **29**: 2774-2778
- JAYARAO, B. M., DORÉ, J. J., OLIVER, S. P. (1992) Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA of *Streptococcus* and *Enterococcus* species of bovine origin. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 2235-2240
- JAYARAO, B. M., GILLESPIE, B. E., OLIVER, S. P. (1996) Application of randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting for species identification of bacteria isolated from bovine milk. *J.Food Protect.* **59**: 615-620
- JAYARAO, B. M., OLIVER, S. P. (1994) Polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting for identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* Species isolated from bovine milk. *J.Food Protect.* **57**: 240-245
- JAYARAO, B. M., OLIVER, S. P., TAGG, J. R., MATTHEWS, K. R. (1991a) Genotypic and phenotypic analysis of *Streptococcus uberis* Isolated from bovine mammary secretions. *Epidemiol Infect.* **107**: 543-55
- JAYARAO, B. M., SCHILLING, E. E., OLIVER, S. P. (1993) Genomic deoxyribonucleic acid restriction fragment length polymorphisim of *S. uberis*: evidence of clonal diversity. *J.Dairy Sci.* **76**: 468-474
- JIANG, M., BABIUK, L. A., POTTER, A. A. (1996) Cloning, sequencing and expression of the CAMP factor gene of *Streptococcus uberis*. *Microbial Pathogenesis* **20**: 297-307
- KARAHAN M. (2005) Mastitisli inek sütlerinden izole edilen streptokok ve stafilokok etkenlerinde genetik polimorfizmin araştırılması. Doktora tezi. Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Elazığ.
- KAWATA, K., ANZAI, T., SENNA, K., KIKUCHI, N., EZAWA, A., TAKAHASHI, T. (2004) Simple and rapid PCR method for Identification of streptococcal species relevant to animal infections based on 23S rDNA sequence. *FEMS Microbiol.Lett.* **237**: 57-64
- KHAN, I. (2002) Identification and Further Characterization of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* Isolated from Bovine Milk Samples. Doctorate thesis. From the Department of Milk Sciences Institute of Veterinary Food Sciences Justus-Liebig-University, Giessen Germany p.:56-69
- KHAN, I. U., HASSAN, A. A., ABDULMAWJOOD, A., LÄMMLER, C., WOLTER, W., ZSCHÖCK, M. (2003) Identification and epidemiological characterization of *S. uberis* isolated from bovine mastitis using conventional and molecular methods. *J.Vet. Sci.* **4**: 213-24
- KURL, D. N., HAATAJA, S., FINNE, J. (1989) Hemagglutination activities of group B, C, D, and G Streptococci:demonstration of novel sugar-specific cell-binding activities in *Streptococcus suis*. *Infect. Immun.* **57**: 384-389
- LANCEFIELD R. C. (1933) A Serological Differentiation of Human and Other Groups of Hemolytic Streptococci. From the Hospital of The Rockefeller Institute for Medical Research. p.: 571-595
- LANCEFIELD R.C. (1938) Proc. Soc. Exp. Bio. Med. **38**: 473-478.

- MARTINEZ, G., HAREL, J., GOTTSCHALK, M. (2001). Specific detection by PCR of *S. agalactiae* in milk. *Can. J. Vet. Res.* **65**: 68–72.
- MARTINEZ, G., HAREL, J., HIGGINS, R., LACOUTURE, S., DAIGNAULT, D., GOTTSCHALK, N. (2000) Characterization of *S. agalactiae* isolates of bovine and human origin by random amplified polymorphic dna analysis. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 71-78
- MCDONALD, W., FRY, B., DEIGHTON, M. (2005) Identification of *Streptococcus* spp. causing bovine mastitis by RFLP-PCR of 16S-23S ribosomal dna. *Vet.Microbiol.* **111**: 241-246.
- MEIRI-BENDEK, I., LIPKIN, E., FRIEDMANN, A., LEITNER, G., SARAN, A., FRIEDMAN, S., KASHI, Y. (2002) A PCR-Based method for the detection of *Streptococcus agalactiae* in milk. *J. Dairy Sci.* **85**: 1717–1723
- MIAN F, MUTALIB A.R, LILA M.A.M., SAHAREE A.A., SALIM N. (2002). Genetic diversity *Streptococcus uberis* strains isolated from clinical and subclinical cases of bovine intramammary infections in Malaysia. *Pakistan J.Bio.Sci.* **5**: 57-60
- NMC (1990) Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection. National Mastitis Council. p.: 7-10 Arlington, VA
- ODIERNO, L., CALVINO, L., TRAVERSSA, P., LASAGNO, M., BOGNI, C., REINOSO, E. (2006) Conventional Identification of *Streptococcus uberis* Isolated from Bovine Mastitis in Argentinian Dairy Herd. *J.Dairy.Sci.* **89**:3886-3890
- OLIVER, S. P. (1988) Frequency of isolation of environmental mastitis-causing pathogens and incidence of new intramammary infections during the nonlactating period. *Am. J. Vet. Res.* **49**: 1789-1793
- OLIVER, S. P., CALVINHO, L. F., ALMEIDA, R. A. (1997) Characteristics of Environmental *Streptococcus* species Involved in Mastitis. Proceedings of a Symposium held on June 22. Ontario Veterinary College. p.:1-35
- OLIVER, S. P., GILLESPIE, B. E., JAYARAO, B. M. (1998) Detection of new and persistent *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* Intramammary Infections by polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *FEMS Microbiol. Lett.* **160**: 69-73
- ØSTERÅS, O., SØLVERØD, L., REKSEN, O. (2006) Milk culture results in a large norwegian survey-effects of season, parity, days in milk, resistance, and clustering milk culture results in a large Norwegian. *J. Dairy Sci.* **89**: 1010-1023
- PETROVSKI, K.R., HEUER, C., PARKINSON, T.J., WILLIAMSON, N.B. (2009). The incidence and aetiology of clinical bovine mastitis on 14 farms In Northland, New Zealand. *N. Z. Vet. J.* **57**: 109-15.
- PHILPOT, N. W., NICKERSON, S. C. (2000) How Does Mastitis Develop. *Winning The Fight Against Mastitis*. p.:14-17. Westfalia Surge,Inc. USA.
- PHUEKTES, P., BROWNING, G. F., ANDERSON, G., MANSELL, P. D. (2003) Multiplex PCR as a mastitis screening test for *S.aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* and *S. uberis* in bulk milk samples. *J.Dairy Res.* **70**: 149-155
- PHUEKTES, P., MANSELL P.D., BROWNING, G.F. (2001a) Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* **84**: 1140-1148
- PHUEKTES, P., MANSELL, P. D., DYSON, R. S., HOOPER, N. D., DICK, J. S., BROWNING, G. F. (2001b) Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* isolates from dairy cows with mastitis. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 1460-1466

- PIEPERS, S., MEULEMEESTER, L. D., KRUIF, A., OPSOMER, G., BARKEMA, H. W., Vlieghe, S. D. (2007) Prevalance and Distribution of mastitis pathogens in subclinically infected in Flanders,Belgium. *J. Dairy Res.* **74**: 478-483
- PITKALA, A., KOORT, J., BJÖRKROTH, J. (2008) Identification and antimicrobial resistance of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* isolated from bovine milk samples. *J.Dairy Sci.* **91**: 4075-4081
- PYÖRALA S (1995) Staphylococcal and Streptococcal Mastitis. In: *The Bovine Udder and Mastitis*. Ed. Sandholm M, Buzalkski T, Kaartinen L, Pyörala S. Gummerus Kirjapaino Oy. Finland. p.:143-148
- QUINN, O. J, MARKEY, B. K., CARTER, M. E, DONNELLY, W. J, LEONARD, F. C.(2004) Streptococci. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Blackwell Science Ltd., Oxford. p.:49-54
- RATO, M. G, BEXIGA, R., NUNES, S.F., CAVACO, L. M, VILELA, C.L., SANTOS-SANCHES, I. (2007) Molecular epidemiology and population structure of bovine *Streptococcus uberis*. *J. Dairy Sci.* **91**: 4542-4551
- REKSEN, O., SØLVERØD, L., ØSTERÅS, O. (2007) Relationships between milk culture results and milk yield in Norwegian dairy cattle. *J. Dairy Sci.* **90**: 4670-4678
- RIEKERINK, R. G. M., BARKEMA, O. H. W., KELTON, D.F., SCHOLL, D. (2008) Incidence rate of clinical mastitis on dairy farms. *J.Dairy Sci.* **91**: 1366-1377
- RIEKERINK, R. G. M., BARKEMA, O. H. W., VEENSTRA, S., POOLE, D. E., DINGWELL R. T., KEEFE G. P. (2006) Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island. *Can. Vet.J.* **47**: 567-572
- RIFFON, R., SAYASITH, K., KHALIL, H., DUBREUIL, P., DROLET, M., LAGACÉ, J. (2001) Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J.Clin. Microbiol.* **39**: 2584-2589
- ROGUINSKY, M. (1977) Comparison of *Streptococcus uberis* and *S.infrequens* pathogenicity for cow udder. *Ann. Rech.Vet.* **8**: 153-157
- RUOFF, K.L. (1995) Streptococcus. In: *Manual of clinical microbiology*. Ed: Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C. and Tenover, R.H. 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. p.: 299-307
- SAMPIMON, O., BARKEMA, H.W., BERENDS, I., SOL, J., LAM, T. (2009) Prevalence of intramammary infection in Dutch dairy herds. *J. Dairy Res.* **76**: 129-136
- SANDHOLM, M. (1995) Inflammation in Mastitis. *The Bovine Udder and Mastitis*. Ed: Sandholm M, Buzalkski T, Kaartinen L, Pyörala S. Gummerus Kirjapaino Oy. Finland p.:59-75.
- SCHUKKEN, Y. H. , WILSON, D. J., WELCOME, F., TIKOFSKY, L. G., GONZALEZ, R. N. (2003) Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet. Res.* **34**: 579-596
- SHERMAN, J. M. (1937) The Streptococci. Cornell University, Ithaca, New York. p.:3-97
- SUKHNANAND, S., DOGAN, B., AYODELE, M.O., ZADOKS, R.N., CRAVER, M.P.J., DUMAS, N.B., SCHUKKEN, Y.H., BOOR, K.J., WIEDMANN, M. (2005) Molecular subtyping and characterization of bovine and human *Streptococcus agalactiae* isolates. *J.Clin.Microbiol.* **43**: 1177-1186
- ŞAHİN, M., ÇOLAK, A., OTLU, S., AYDIN, F., GENÇ, O., GÜLER, M.A., ORAL, H. (1995) Kars yöresi ithal simental ineklerde subklinik ve klinik mastitislerin görülme oranı ve etkili antibiyotiklerin belirlenmesi. *Kafkas Üniv.Vet.Fak.Derg.* **3**: 49-55
- TAPONEN, J., MYLLYS, V. (1995) The Economic Impact of Mastitis. *The Bovine Udder and Mastitis*. Ed: Sandhom, M., Hankanen-Buzalksi, T., Kaartinen, L., Pyörala, S. Gummerus Kirjapaino Oy. Finland. p.:261-264

- TAYLOR, D. L., WARD, P. N., RAPIER, C. D., LEIGH, J. A., BOWLER, L. D. (2003) Identification of a differentially expressed oligopeptide binding protein (OppA2) in *Streptococcus uberis* by representational difference analysis of cDNA. *J. Bacteriol.* **185**: 5210–5219
- TEL, O. Y., KESKİN, O., ZONTURLU, A. K., ARSERİM KAYA, N.B. (2009) Şanlıurfa yöresinde subklinik mastitislerin görülme oranı, aerobik bakteri izolasyonu ve duyarlı antibiyotiklerin belirlenmesi. *F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.* **23**: 101-106
- TENHAGEN, B., HANSEN, I., REINECKE, A., HEUWIESER, W. (2009) Prevalance of pathogens in milk samples of dairy cows with clinical mastitis and heifers at first parturition. *J.Dairy Sci.* **76**: 179-187
- TMANOVA, L. (2003) Detection of *Mycoplasma bovis*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* by PCR assay Directly from Milk. Phd Thesis.
- TODHUNTER, D. A., SMITH, K. L., HOGAN, J. S. (1995) Environmental streptococcal intramammary infections of the bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* **78**: 236-2374
- TOMITA, T., MEEHAN, B., WONGKATTIYA, N., MALMO, J., PULLINGER, G., LEIGH, J., DEIGHTON, M. (2008) Identification of *Streptococcus uberis* multilocus sequence types highly associated with mastitis. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 114-124
- TOPÇU, Y. (2008) Süt sığırcılığı işletmelerinde başarıyı etkileyen faktörlerin analizi: Erzurum ili örneği. *OMÜ.Zir.Fak.Dergisi.* **23**: 17-24
- ULUSOY, E., İZGÜR, M., AKAY, Ö., DİKER, K.S., AYDIN, N., ARDA, M. (1985) Mastitisli inek sütlerinden izole edilen mikroorganizmaların identifikasyonları ve antibiyotiklere duyarlılıkları üzerinde bir araştırma. *A.Ü.Vet. Fak. Derg.* **32**: 358-370
- UNNERSTAD, H.E., LINDBERG, A., WALLER, K.P., EKMAN, T., ARTURSSON, K., NILSSON-ÖST, M., BENGTSSON, B. (2009) Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. *Vet. Microbiol.* **137**: 90-97
- VEHMAS, T., SANDHOLM, M. (1995) Balance between Bacteria and Host – The Bacteria's Point of View. *The Bovine Udder and Mastitis*. Ed: M, Buzalkski T, Kaartinen L, Pyörala S. Gummerus Kirjapaino Oy. Finland. p.:49-58
- WANGER, A. R., DUNNY, G. M. (1985) Development of a system for genetic and molecular analysis of *Streptococcus agalactiae*. *Res. Vet. Sci.* **38**: 202-208
- WARD, P. N., HOLDEN, M.T., LEIGH, J. A., LENNARD, N., BIGNELL, A., BARRON, A., CLARK, L., QUAIL, M.A., WOODWARD, J., BARRELL, B.G., EGAN, S.A., FIELD, T.R., MASKELL, D., KEHOE, M., DOWSON, C.G., CHANTER, N., WHATMORE, A.M., BENTLEY, S. D., PARKHILL, J. (2009) Evidence for niche adaptation in the genome of the bovine pathogen *Streptococcus uberis*. *BMC Genomics.* **28**: 10:54
- WATTS, J.,L. (1988) Characterization and identification of Streptococci isolated from bovine mammary glands. *J. Dairy Sci.* **71**: 1616-1624
- WIBAWAN, W. T., LAMMLER, C., SELEIM, R., PASARIBU, F.N. (1993) Haemagglutinating adhesin of group B streptococci isolated from cases of bovine mastitis mediates adherence to HeLa cells. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 2173-2178
- WIELICZKO, R.J., WILLIAMSON, J. H., CURSONS, R. T., LACY-HULBERT, S. J., WOOLFORD, M. W. (2002) Molecular typing of *S. uberis* strains isolated from cases of bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* **85**: 2149-2154
- WILLIAMS, A. M., COLLINS, M. D. (1990) Molecular taxonomic studies on *Streptococcus uberis* types I and II description of *Streptococcus parauberis* sp. nov. *J. Appl. Bacteriol.* **68**: 485-490

- WILLIAMS, A. M., COLLINS, M. D. (1991) DNA fingerprinting of *Streptococcus uberis* based on polymorphism of DNA encoding rRNA. *Lett. Appl. Microbiol.* **12**: 23-28
- WINN, W., ALLEN, S., JANDA, W., KONEMAN, E., PROCOP, G., SCHRECKENBERGER, P., WOODS, G. (2006) *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Lippincott Williams-Wilkins. PA., USA. p.:683-684
- ZADOKS, R. (2004) Environmental Mastitis, Part 1. *Nodpa News*. **4**: 13-14
- ZADOKS, R., GILLESPIE, B. E., BARKEMA, H. W., SAMPIMON, O. C., OLIVER, S. P., SCHUKKEN, Y. H. (2003) Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. *Epidemiol. Infect.* **130**: 335-349
- ZADOKS, R., TIKOFSKY, L. L., BOOR, K. J. (2005) Ribotyping of *Streptococcus uberis* from a dairy's environment, bovine feces and milk. *Vet Microbiol.* **109**: 257-65
- ZSCHÖCK, M., MANHOLD-MAURER, S., WESCHER, A., MERL, K., KHAN, I., LÄMMLER, C. (2005) Evaluation of tRNA intergenic spacer length polymorphism analysis as a molecular method for species identification of streptococcal isolates from bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* **72**: 333-337

ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

Adı : Seyda
 Soyadı : (Çetin) CENGİZ
 Doğum yeri ve tarihi : İstanbul, 07/11/1981
 Uyuşuğu : T.C.
 Medeni durumu : Evli
 İletişim adresi ve telefonu : Atatürk Üniversitesi Veteriner
 Fakültesi Mikrobiyoloji A.D.
 ERZURUM Tlf :555 464 46 44

II- Eğitimi

1998-2003 Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Konya
 1992-1998 Bahçelievler Kemal Hasoğlu Lisesi, Bahçelievler/İstanbul
 1987-1992 50.Yıl Ahmet Merter İlkokulu, İstanbul

III- Ünvanları

Veteriner Hekim

IV- Mesleki Deneyimi

2005 yılından itibaren Araştırma Görevlisi

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınlar ve Posterler

1. Fatih ATASOY, Akın YAKAN, Mustafa UĞURLU, Necmettin ÜNAL, Taylan AKSU, Seyda CENGİZ. 2010. Kısıtlı protein ile beslenen erkek ve dişi broilerlerde karkas özellikleri, et kalitesi ve bağışıklık düzeyleri. Ankara Üniv Vet Fak Derg, **57**, 49-54.
2. E.E.Onbaşılar, Ö.Poyraz, S.Cetin 2008 Effects of Breeder Age and Stocking Density on Performance, Carcass Characteristics and Some Stress Parameters of Broilers. Asian-Aust.J.Anim.Sci. **21**:262-269
3. Bastan,A., Cengiz, M., Sel, T., Cetin, S., Akan,M., Acar, D.N., Darbaz, I., Fidancı, U.R. 2009. Is it possible to use nitric oxide levels in prepartum heifer mastitis. Folia Veterinaria. **53**:177-185.

4. Z.Cantekin, S.Çetin, O.Y.Tel, O.Elibol, M.Akan. 2006. Tavuklarda Newcastle Hastalığı (ND) ve İnfeksiyöz Bronşitis (IB)'e karşı içme suyu ile yapılan aşılamlarda su stabilizatörü bileşiklerin etkisi. V. Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi. Eylül 2006. Antalya- Türkiye.
5. E.Kireççi, Seyda Çetin. 2006. Klinik Örneklerden İzole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında Slime üretiminin ve protein A varlığının araştırılması. V. Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi. Eylül 2006. Antalya- Türkiye
6. Bastan,A., Cengiz, M., Sel, T., Cetin, S., Akan,M., Acar, D.N., Darbaz, I., Fidancı, U.R. 2009. Is it possible to use nitric oxide levels in prepartum heifer mastitis. X. Middle European Buiatrics Congress. 2009, Kosice-Slovakia

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Katıldığı Seminerler ve Kongreler

1. 10.Orta Avrupa Buiatri Kongresi 2009 Slovakya
2. 1.Ulusal Zoonoz Kongresi 2007 Erzurum
3. VII.Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi 2006 Antalya
4. 14. Dünya Veteriner Tavukçuluk Kongresi. 25-26 Ağustos 2005. İstanbul
5. V.Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi 2002 Konya
6. 1.Ulusal Atçılık Sempozyumu 1999 Konya