

**T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOCAELİ YÖRESİNDEKİ MASTİTİSLİ
HAYVANLARDAN ALINAN SÜT
ÖRNEKLERİNDEN *Staphylococcus aureus*
İZOLASYONU, TİPLENDİRİLMESİ, TOKSİN
TİPLERİNİN BELİRLENMESİ, SOMATİK HÜCRE
SAYIMI ve SÜTLERDEKİ ÇEVRESEL ETKİLERİN
İNCELENMESİ**

**Özcan BUDAK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GEBZE
2008**

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOCAELİ YÖRESİNDEKİ MASTİTİSLİ HAYVANLARDAN
ALINAN SÜT ÖRNEKLERİNDEN *Staphylococcus aureus*
İZOLASYONU, TİPLENDİRİLMESİ, TOKSİN TİPLERİNİN
BELİRLENMESİ, SOMATİK HÜCRE SAYIMI ve
SÜTLERDEKİ ÇEVRESEL ETKİLERİN İNCELENMESİ

Özcan BUDAK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Yavuz İ. SEZEN

GEBZE
2008



MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
JÜRİ ONAY FORMU

JÜRİ

ÜYE (BAŞKAN) : Prof. Dr. Yavuz İ. SEZEN

ÜYE : Yrd. Doç. Dr. Yosun MATER

ÜYE : Yrd. Doç. Dr. Melek ÖZKAN

Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 22/06/2008 tarih ve 2008/02 sayılı yukarıdaki öğretim elemanlarından oluşmuş jüri tarafından 14/07/2008 tarihli Tez Savunma Tutanağı neticesinde Yüksek Lisans Öncesi BUDAK'ın çalışması GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Yönetim Kurulu'nun 22/06/2008 tarih ve 2008/02 sayılı kararıyla Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi olarak onaylanmıştır.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

TEZ BAŞLIĞI: Kocaeli Yöresindeki Mastitisli Hayvanlardan Alınan Süt örneklerinden *Staphylococcus aureus* İzolasyonu, Tiplendirilmesi, Toksin Tiplerinin Belirlenmesi, Somatik Hücre Sayımı ve Sütlerdeki Çevresel Etkilerin İncelenmesi

YAZAR ADI: Özcan BUDAK

Mastitis inek memesinin yangısıdır. Meme bezleri hücrelerinin veya bağ dokusunun veya her ikisinin salgılanmasıyla kendini gösterir. Bu şartlarda süt verimi düşer, renkte değişim olur ve tüketim için istenmeyen sonuçlar oluşturur. Sonuç olarak büyük ekonomik kayıplara sebep olur. Mastitis emzirme döneminin başlangıcında veya sonunda hatta süttten kesilen ineklerde bile görülebilir. Çiftlik çalışanları, ıslak elbiseler ve sinekler hastalığın yayılmasında rol alır. *S. aureus* mastitis oluşumunda en önemli bakteriyel ajandır. Oluşturduğu toksinler nedeniyle hücre membranını parçalar ve süt üreten dokuyu bozar.

Mastitis akut, subakut veya kronik bir seyir izleyebilir. Sık sık subklinik tablolarla karşılaşılır. Bu tabloda ne anormal bir süt olgusu ne de meme dokusunda gözle görülebilir değişiklik olur. Fakat somatik hücre sayısında artış gözlenir.

Bu hastalık Türkiye’de her yıl 50 milyon YTL’ lik ekonomik kayba neden olur. Bu nedenle hastalığın tanımlanması ve hastalıktan korunma yöntemlerinin geliştirilmesi çok önemlidir.

Bu çalışmada Kocaeli yöresindeki mastitisli ineklerin prevalansı, hasta ineklerden toplanan numunelerde *S. aureus* izolasyonu, tanımlanması, ürettikleri toksin tiplerinin ve sütlerdeki somatik hücre sayısının belirlenmesi, izole edilmiş olan *S. aureus*’ların antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının belirlenmesi amaç edinilmiştir.

Ayrıca çalışılacak bölgede sanayinin yoğun olması nedeniyle bu bölgede yer alan çiftliklerde üretilen sütlerin bileşiminde süt kalitesini etkileyecek oranlarda ağır metaller bulunabilir. Bunu tespit edebilmek için alınan sütlerde ağır metallerin konsantrasyonlarına da bakılacaktır.

SUMMARY

TITLE OF THE THESIS: Isolation and identification of *S. aureus*, detect these bacteria enterotoxins and determine number of somatic cells and antibiotic from Mastitic Cows' Milk in Kocaeli Region and enviromental effects in the Milk.

AUTHOR: Özcan BUDAK

Mastitis is an inflammation of udder. It may involve secreting cells or connective tissue or both of the mammary glands. In this condition, the milk yield is reduced, colour is changed and becomes unfit for consumption. As a result, there is great economic loss. It is more common at the beginning or at the end of lactation. It may occur even in dry cow. Milkers' hands, wash cloths and flies are the ways in which the infection can be spread from cow to cow. Most causing bacterial agent of mastitis is *Staphylococcus aureus* producing toxins that destroy cell membranes and can directly damage milk producing tissue.

Mastitis may be acute, subacute or chronic. Often, it is subclinical, where there is neither abnormal milk nor detectable change in the udder, but somatic cell count has increased.

This illness causes 50 million YTL economic loss in Turkey every year. Because of this reason detection and prevention of this illness is very important.

In this study we purpose isolation and identification of *Staphylococcus aureus*, to detect their enterotoxins and antibiotic susceptibility and determine somatic cell in milks and bring out prevalance of cows with mastitis in Kocaeli region. In addition we'll

determine concentration of heavy metal in specimens due to the effects of industrial pollution onto quality of milk and milk products.

TEŞEKKÜR

Sevgili hocam Prof. Dr. İ.Yavuz SEZEN'e, sütlerin temininde bana yardımcı olan tüm çiftlik sahiplerine, beni çalışmalarında destekleyen, bilgi ve birikimlerini bana aktaran tüm GYTE Mikrobiyoloji Laboratuvar çalışanlarına, süt toplamamda beni yalnız bırakmayan Tuğrul DORUK arkadaşşıma ve diğler tüm dostlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışmada, bana en büyük maddi ve manevi desteğı veren ve de her zaman yanımda olan sevgili aileme ve özellikle annem Melek BUDAK'a ayrıca benden yardımlarını esirgemeyen arkadaşşıım Özlem TERZİ' ye en derin şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	v
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	ix
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
RESİMLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1.GİRİŞ	16
1.1. Genel Bilgiler	18
1.1.1. Tarihçe	18
1.1.2. Stafilokok Cinsi	19
1.1.3. Dirençlilik	20
1.1.4. Antijen Yapıları ve Faj Tipleri	21
1.1.5. Hastalandırıcı Özellikler	22
1.1.5.1. Toksin Niteliğindeki Maddeler	23
1.1.5.1.1. Sitolitik Toksinler	23
1.1.5.1.2. Lökosidin	24
1.1.5.1.3. Enterotoksinler	24
1.1.5.1.4. Epidermolitik Toksin (Eksfoliatif Toksin=Eksfoliatin)	25
1.1.6 Enzim Yapısındaki Maddeler	26
1.1.6.1. Koagülaz	26
1.1.6.2. Deoksiribonükleaz	28
1.1.6.3. Lipazlar	28
1.1.6.4. Hiyalüronidaz	28
1.1.6.5. Stafilokinaz	29
1.1.6.6. Betalaktamaz	29
1.1.7. Antifagositik Maddeler	29
1.1.7.1. Slime Maddesi	29
1.1.8. Stafilokokların Oluşturdukları Enfeksiyonlar Şunlardır	30

1.1.8.1. Deri ve Mukoza Lokalizasyonlar	30
1.1.8.2. Yaygın Deri Döküntüleriyle Seyreden Enfeksiyonlar	30
1.1.8.3. Sepsis ve Endokarditler	31
1.1.8.4. Sistem ve Organ Enfeksiyonları	31
1.1.9. Besin Zehirlenmeleri	31
1.2. Mastitis	31
1.2.1. Mastitisin Tanımı	31
1.2.2. Mastitisin Etiyolojisi	32
1.2.3. Mastitisin Sınıflandırılması	34
1.2.6. Klinik Mastitisler	35
1.2.7. Subklinik mastitis	36
1.2.9. Somatik Hücre Sayılarının (SHS) Tespit Yöntemleri	38
1.2.9.1. Somatik Hücre Sayılarının İndirekt Testlerle Saptanması	39
1.2.9.2. Somatik Hücre Sayılarının Direkt Testlerle Saptanması	39
1.2.9.3. Direkt Mikroskopik Somatik Hücre Sayımı	39
1.2.9.4. Coulter Counter Kullanımı ile Ölçüm	40
1.2.9.5. Fossomatik	40
1.2.9.7. Mikrobiyolojik Muayene	40
1.3. AĞIR METALLER	41
1.3.1 Ağır Metallerin Etkileri	41
2. KONU İLE İLGİLİ YAYINLAR VE ÇALIŞMALAR	44
3. MATERYAL VE METOD	51
3.1. Materyal	51
3.1.1. Örneklerin Toplanması	52
3.2. Metod	52
3.2.1 CMT Testi	52
3.2.2. Örneklerin Analize Hazırlanması	53
3.2.3 Genel Uygulamalar	53
3.2.4 Laboratuvar Testleri	54
3.2.4.1. Katalaz Ayırıcı	54
3.2.4.2 Hemoliz Deneyi	54

3.2.4.3 Gram Boyama Yöntemi	54
3.2.4.3.1 Gram Boyalarının Hazırlanması	55
3.2.4.3.2. Gram Boyama	56
3.2.4.3.3 Koagülaz	57
3.2.4.3.4 Api (Analytic Profile Index)	57
3.2.4.3.5. Antibiyotik Duyarlılıklarının Araştırılması	58
3.2.4.3.6 Toksin Tiplerinin Belirlenmesi	59
3.2.4.3.7 Somatik Hücre Sayımı	60
3.2.4.3.8 Ağır Metal İyonlarının Tayini	61
3.2.4.3.9 EK.1. (ÇALIŞMADA KULLANILAN BOYA, BESİYERLERİ ve KULLANILAN YÖNTEMLER)	61
5. BULGULAR	73
6.TARTIŞMA ve SONUÇ	82
KAYNAKLAR	90
ÖZGEÇMİŞ	99

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

API	: Analytic Profile Index
ATP	: Adenozin trifosfat
BCP	: Brom Creosol Purple
BTB	: Brom Thymol Blue testi
Cd	: Kadmiyum
CMT	: California Mastitis Testi
dak	: Dakika
DMSHS	: Direkt Mikroskopik Somatik Hücre Sayımı
ETA	: Eksfoliatif Toksin-A
ETB	: Eksfoliatif Toksin-B
fc	: Fragment, crystalizable region
gr	: Gram
KNS	: Koagülaz Negatif Stafilokoklar
μ	: Mikro
μ g	: Mikrogram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
NCCLS	: National Committee for Clinical Laboratory Standards
nm	: Manometre
Pb	: Kurşun
PFGE	: Pulsed-Field Alan Elektroforezi
PFGE	: Pulsed-Field Jel Elektorforezi
SEA	: Stafilokokal Enterotoksin A
SEB	: Stafilokokal Enterotoksin B
SEC	: Stafilokokal Enterotoksin C
SED	: Stafilokokal Enterotoksin D
SCC	: Somatic Cell Count
SET-RPLA	: <i>S. aureus</i> Enterotoxin - Reversed Passive Latex agglutination
SHS	: Somatik Hücre Sayısı

RESİMLER DİZİNİ

<u>Resim</u>	<u>Sayfa</u>
3.1.Baird-Parker Agar hazırlama reaktifleri.	64
3.2. Metilen mavisi ile boyanan somatik hücrelerinin mikroskop altındaki görünümü.	65
3.3. İnkübasyon sonucu api staph stripi renklenmeler gözlenmektedir	70
3.4 Api Staph Değerlendirme şeması görülmektedir.	70
3.5. Set Rpla Toksin Kitleri	70
3.6. Aglutinasyon sonucu mikropleyt kuyucukları görülmektedir.	72

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. <i>S. aureus</i> Fajları ve Başlıca Faj Tipleri	22
1.2 Stafilokok Türlerinin Karakteristik Özellikleri	27
1.3. Değişik çalışmalarda mastitisli sütlerden üretilen mikroorganizma oranları	33
3.1 Api Değerlendirme Paneli	69
4.1. Sütlerin CMT test sonuçları ve SHS görülmektedir	74
4.2 Gram Boyama, Katalaz, Koagülaz sonuçları	75
4.3. İdentifikasyonu yapılmış Staphylococcus türleri	77
4.4. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları	78
4.5. <i>S. aureus</i> türlerine ait enterotoksin deney sonuçları	80
4.6 Sütlerdeki Ağır Metal(Pb, Cd) Sonuçları	81

1.GİRİŞ

Süt yaşayan her canlının ihtiyacı olan önemli besin maddeleri, protein, karbonhidrat, süt şekeri, yağ, eser elementler, vitaminler, mineraller ve enzimleri bünyesinde dengeli ve yeterli miktarda içermektedir. Ayrıca süt insanların beslenmesi için önemli olan kalsiyum bakımından da zengin bir üründür [Demirci ve Şimşek,1996, Geçgil ,1987].

Fizyolojik yönden yüksek besin değerine sahip olan sütün kusursuzca içilebilmesi için onun, sağlıklı, iyi beslenmiş hayvanlardan elde edilmiş ve tüketiciye kadar giden yolda zararlı etkilere mümkün olduğunca korunmuş olması gereklidir. Mastitis profilaksisi ile kimyasal ve mikrobiyolojik kontaminasyon kaynaklarının erken teşhis edilerek, ortadan kaldırılması süt hijyeninde en önemli aşamadır. [Ergün ,1989]

Sütteki mikroorganizmaların sayısı ve türü hayvanın bakımına, sağımın özelliğine, ahır şartlarına, elde edilen süte yapılan ilk muamele ve muhafaza şekline göre çok değişir. [Sakız ,1973]

Sütler normal şartlar altında ve hijyenik kurallara uyularak hazırlansa bile, belli sayıda mikroorganizma bulundurabilmektedir. Yani hijyenik şartlara ne kadar uyulursa uyulsun mililitrede 20.000 lere varan mikroorganizma sayıları normal kabul edilmektedir. Fakat bu sayıyı aşan değerler sütün çeşitli kaynaklardan kontamine olduğunu göstermektedir. [Robinson ,1990]

Mastitis, sığır yetiştiriciliğinde önemli derecede ekonomik kayıplara neden olan polimikrobiyal bir meme enfeksiyonudur.[Sakız,1973]

Memenin iritan etkiyi nötralize etmek ve normal fonksiyonuna yeniden dönmek için gösterdiği fiziksel, kimyasal, bakteriyolojik ve patolojik değişiklikler, çeşitli formlarda mastitis belirtilerinin ortaya çıkmasına neden olur. Çevrede yaygın olarak bulunan kontaminantlardan memeyi korumak her zaman mümkün olamamaktadır.

Bunun yanısıra teknolojinin getirdiği yenilikler de dikkatsiz kullanım sonucunda önemli bir dispozisyon faktörü oluşturmaktadır. Mastitisin birçok nedeni vardır. Bu nedenler varolduğunda, memeye mikroorganizmaların yerleşmesi kolaylaşarak enfeksiyon ortaya çıkar.

Mastitis yapan etkenler bakteriyel, viral, mantar ve nonspesifik nedenler olmak üzere dört grupta toplanır. Meme içindeki hasarlı tabakanın iyileşemeyeceği enfeksiyonlarda gözlenebilir. Süt üretimi düşer, yeniden hastalanma riski artar. Yapılan araştırmalarda ineklerde klinik mastitis oranının %2,7 ve subklinik mastitis oranının % 45,4 olduğu tespit edilmiştir.

Mastitisin bu kadar önemli olmasının başlıca sebeplerinden biri, hastalığın subklinik şeklinin klinik haline nazaran 20–30 kat daha fazla oranda rastlanmasıdır. Subklinik mastitisler yetiştiriciler tarafından kolaylıkla belirlenememekte, böylece hayvanda hastalık, varlığını uzun süre devam ettirebilmektedir. [Ergün ,1989]

Subklinik Mastitis, Mastitisin önemli bir formu olup, meme dokusunda henüz önemli bir değişiklik şekillenmeden özel yöntemler kullanılarak tanımlanabilen ve süt veriminin önemli ölçüde düşmesine sebep olan bir meme enfeksiyonudur.

Bugüne kadar hem dünyanın çeşitli ülkelerinde hem de yurdumuzda yapılan çalışmalarda mastitis oluşturan etkenlerin büyük bir çoğunluğunun bakteriler olduğu ortaya konulmuştur. Bu etkenlerin %95'ini *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis* gibi bakteriler oluşturur.[Bilgehan, 2000]

Subklinik Mastitislerin tanısında en güvenilir yöntemlerden bir tanesi mikrobiyolojik kontrollerdir. Süt örneklerinin kültürleri yapılarak etkenlerin izolasyonu ve identifikasyonu ile antibiyotik duyarlılık testlerinin uygulanması, tanı, sağıtım ve korunma yönünden büyük yararlar sağlamaktadır. [Ergün ,1989]

Mastitisin insan sağlığına etkisi ise; Mastitisli memelerden elde edilen sütleri içenler ve bu sütlerden yapılan peynirleri yiyenler, Mastitisin belli başlı etkenleri olan *Staphylococcus spp.* ve toksinlerini besin yolu ile alarak, zehirlenmelere maruz kalırlar. Ayrıca, Tberklozik Mastitisli sütler daha tehlikeli olup, insanlara Tüberkülozu bulaştırır. Bu bakımdan Mastitis, aynı zamanda hayvanlardan insanlara geçebilen (zoonos) hastalıklar arasında yer alır.

Bu çalışmada materyal olarak Kocaeli bölgesindeki süt sığırı yetiştiriciliği yapan işletmelerdeki sağmal süt sığırları ve bunlardan aseptik koşullarda elde edilen sütler kullanılmıştır. Çalışmada sütün ilk muayenesi California Mastitis Testi (CMT) kullanılarak yapılmıştır. CMT sütteki artan hücre sayısını ve pH' yı indirekt olarak tespit etmede kullanılan bir yöntemdir. [Schalm ve Ark, 1971]

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1 Tarihçe

İnsan ve hayvanlarda çeşitli hastalıklara yol açabilen stafilokok cinsi bakterileri ilk defa 1878 yılında Koch tarafından irinde görülmüştür ve ilk stafilokok adı 1881 yılında İskoçyalı Ogston tarafından kullanılmıştır. O tarihlerde stafilokoklar çok ağır seyreden, tedavisi g, ölümcül enfeksiyonlara neden olmaktaydı. *Staphylus* eski Yunanca'da üzüm salkımı anlamına gelmekte olup, bu bakterilerin üreme esnasında birbirlerinden ayrılmayarak üzüm salkımına benzer kümecikler yaptıkları için bu deyim kullanılmıştır. Stafilokoklar ilk defa 1884'de Rosenbach tarafından izole edilmiştir. [Bilgehan, 1995]

1960'lı yıllarda β -laktamaz halkası taşıyan dirençli yarı sentetik penisilinler (metisilin, oksasilin ve nafsilin) stafilokok enfeksiyonlarında kullanılmaya başlanmıştır. Bu antibiyotikler, penisiline duyarlı stafilokoklar üzerinde daha etkili olmuştur. β -laktamaz dirençli penisilinlerin kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra dirençli türler saptanmıştır [Dndr ve Dündar, 2002]

1970’li yıllarda stafilocokların metisilin ve diğerk sentetik penisilinlere dirençli olması sebebiyle, vankomisin gibi glikopeptid grubundaki antibiyotikler kullanılmaya başlanmıştır. [Domaracki ve ark., 1998]

1980’ li yıllardan günümüze kadar, hemen tüm dünyada stafilocoklar ile oluşan nozokomiyal enfeksiyonların oranında sürekli bir artış gözlemlenmiştir. Vankomisin’e dirençli KNS (Koagülaz Negatif Stafilocok)’lardan sonra, vankomisine dirençli *S. aureus* suşu ilk defa 1997’de Japonya’dan bildirilmiştir. [Sönmez ve ark.,2000]

1.1.2. Stafilocok Cinsi

Genel karakterleri olarak stafilocoklar yuvarlak, 0,5–1.5 µm çapında; çoğu kez düzensiz kümeler, bazen dördü bazen de ikişerli kok ya da tek tek koklar şeklinde görülen Gram(+) bakterilerdir. Üreme esnasında bölünme sonucu meydana gelen hücreler birbirlerinden ayrılmazlar ve üç boyut yönünden çoğaldıklarından, üzüm salkımına benzer kümeler yaparlar. Tipik üzüm salkımı görünümü vermeyen stafilocokları, zincir şeklindeki streptokoklardan ayırt etmek için, katalaz testinden yararlanılır. Katalaz testi stafilocoklarda pozitif olduğu halde, streptokoklarda negatiftir. Hareketsizdirler, Fakültatif anaerop (yalnız *S. saccharolyticus* anaerop) olup daha çok aerop üremeyi tercih ederler. Genellikle %10 NaCl lü ortamda ve 18–40 °C’lar arasında üreyebilirler. Birçok türlerinde karotenit pigmenti bulunabilir. Glikozun parçalanması sonucu oluşturulan esas ürün laktik asit olup aerop koşullarda asetik asit ve CO₂ oluşturabilirler. Lizostafin stafilocokları eritir ancak stafilocoklar lizozime dirençlidirler. [Bilgehan, 2000]

1.1.3. Dirençlilik

Stafilokoklar oldukça dayanıklı bakterilerdir. Diğer bakterilerin çoğu 60 °C' ta 30 dakika bekletilmekle öldükleri halde, stafilokoklar bir saat süre sonra bile canlılıklarını koruyabilmektedirler. Aynı şekilde sporsuz olmalarına rağmen kuruluğa karşı dayanıklılıkları fazladır. İrin içerisinde kurutulursa haftalarca canlı kalabilirler. NaCl' ün % 9–10 yoğunluğundaki ortamlarda üremelerini sürdürebilirler. Bazı dezenfektanların alışlagelmiş konsantrasyonlarına dayanabilirlerse de kristal viyole ve malaşit yeşili gibi boyaların düşük konsantrasyonları onları öldürür [Bilgehan, 2000]

Genel olarak sülfonamid ve antibiyotik maddelere karşı diğer bakterilere göre dayanıklıdır. Yeni çıkan antibiyotikler başlangıçta etkili oldukları halde zamanla ona karşı direnç kazanırlar. Bu olay özellikle kemoterapötiklerin en çok kullanıldığı hastane ortamında gelişir. Stafilokoklarda direnç geni ile birlikte çeşitli ağır metal direnç genleri bulunur. Bunların bir hücredeki kopya sayıları da sınırlıdır. Bir kısmı plazmidler ise küçük plazmidler halinde olup yalnızca bir antibiyotik direnç geninden sorumludur. Tetrasiklin direnç plazmidleri bu şekildedir. Stafilokoklar arası direnç aktarımı bakteriyofaj aracılığı ile transdüksiyon ya da bakteriyofaj konjugasyonu ile olur.

Penisilin, metisilin gibi antibiyotiklerin karşısında stafilokokların *L* kolonileri meydana gelir. Stafilokoklar arasında gittikçe metisilin direnci artmaktadır. Metisiline dirençli stafilokoklar in vitro testlerde sefalosporinlere duyarlı olsalar bile, in vivo olarak bu antibiyotiklere direnç gösterirler. Hastaya sefalosporinler verildiğinde bu hususta dikkat edilmelidir. [Mulder, 1997; Domaracki, 1998; Bilgehan, 2000]

Bazı türlerin üredikleri ortamlara diğer tür bakteriler için antibiyotik etkisi gösteren bazı maddeler yaydıkları saptanmıştır. Stafilotoksinler de bunlardan biridir. Bu toksinlerin başta difteri basili olmak üzere, stafilotoksin yapmayan diğer stafilokoklar üzerinde de etkili oldukları görülmüştür [Bilgehan, 2000]

1.1.4. Antijen Yapıları ve Faj Tipleri

Antijen yapısı bakımından stafilokoklar kesin bir özellik göstermezler. Stafilokoklarda antijen özelliği gösteren 30'dan çok madde vardır. Bunlardan bazıları şunlardır;

Teikoik asit stafilokların hücre duvarında bulunan glikoprotein yapıda bir maddedir. Bu madde *S. aureus*'da ribitol teikoik asit, *S. epidermidis*'deki yapısı ise lipo teikoik asit yapısındadır. Erişkin insanların çoğunda teikoik asite karşı erken tipte bir aşırı duyarlılık ve kanlarında düşük düzeyde presipitan antikorlar rastlanılmaktadır. [Koneman ve ark.,1997; Bilgehan, 2000]

Endokarditlerde ve metastatik fokal abseli süregelen hastalarda bu antikorların düzeyi daha yüksek olur.

S. aureus yüzeyinde peptidoglikana bağlı olarak bulunan protein A'nın bilinen antijen-antikor ilişkisinden çok, belirli IgG sınırlarının Fc kısımlarına bağlanma özelliği vardır. Bu madde komatetik, antikomplenmanter ve antifagositik etki gösterir [Koneman ve ark.,1997; Bilgehan, 2000]

İlk kez "Protein A" 1940 yılında Verwey tarafından açıklanmıştır. Bakterinin kolonize olmasında katkıda bulunurlar. Protein A, IgG₃ haricindeki IgG'leri ve bazı IgM ve IgA₂'leri Fc kısımlarından bağlanabilmektedir. Bu şekilde bağlanan antikorların Fab uçları serbest kaldığında özgül antijenler ile birleşebilirler. Bu özelliği nedeniyle Protein A taşıyan stafilokoklar koaglutinasyon deneyleri ile bilinmeyen bir antijen veya antikoru tespit etmede kullanılabilmektedir [Yazgı ve ark.,1997]

Aynı şekilde *S. aureus*'un kümeleştirici faktörü antijenik özelliktedir. Yine kapsüllü *S. aureus*'larda daha çok, fakat kapsülsüz görünenlerde de bulunan kapsül

polisakkaritleri antijenik yapıda olup bunların antifagositik etkileri bakteri virulansında etkili olur [Bilgehan, 2000]

Bugün *S.aureus* suşlarının tiplendirilmesinde, faj tiplendirilmesinden yararlanılmaktadır. Özellikle epidemiyolojik amaçlar için, sorumlu kökenlerin izlenmesinde faj tiplendirilmesinin önemi büyüktür. Tüm stafilokoklarda bir ya da bir çok profaj bulunduğu bilinmektedir [Bilgehan, 2000]

Faj tiplendirilmesi Dünya Sağlık Örgütü'nün kabul ettiği yaklaşık 24 standart stafilokok fajı kullanılarak yapılmaktadır. Bu bakteriyofajlar her birisinin konuk olduğu özgül duyarlı *S. aureus*, konak kökenlerinde denenecek stafilokok kökenlerinin onları eritmelerine göre tiplendirilmektedirler. Sonunda incelenen stafilokok kökeni, duyarlı olduğu fajın grup ve tipine göre isimlendirilmektedir. Birden çok faj varsa hepsi birlikte gösterilmekte, bu nedenle faj modelleri çıkmaktadır. Örneğin; 29, 52/52A, 3C/66 faj modelleri gibi. Stafilokokların faj tiplendirilmesinde kullanılan fajlar ve saptanan belli başlı stafilokok fajları Çizelge 1.1'de verilmiştir. [Bilgehan, 2000]

Çizelge 1.1. *S. aureus* Fajları ve Başlıca Faj Tipleri

Faj Grubu	Fajlar	Başlıca Staf. Faj Tipleri
I	29, 52, 52A, 79, 80	29, 52/52A/80/81, 80
II	3A, 3B, 3C, 55, 71	3A/3B/3C/55 v.b.
	6, 7, 42E, 47, 53, 54	6/7/47/53/75/77 v.b.
III	75, 77, 83A, 84, 85	
IV	42D	
Sınıflandırılmamış	81, 87, 94, 95, 96, 187	

1.1.5. Hastalandırıcı Özellikler

Organizmaya giren stafilokoklar yoğun ve karışık bir savunma mekanizması ile karşılaşılır. Opsoninler ve komplemanın C₃, C₄, parçaları, lökosit ve

makrofajların fagositoz aktivitesini arttırır. Bu mekanizmada olabilecek herhangi bir eksiklik stafilokokların enfeksiyon riskini arttırır [Heinzelman,1997.; Bilgehan, 2000]

Stafilokoklar organizmaya girdikleri yerde yerel olarak üremek ve süpürasyonlara neden olmak suretiyle hastalık yapabildikleri gibi dokular arasına ve kana yayılmak suretiyle, buralarda çeşitli ekstrasellüler maddeler oluşturarak değişik klinik tablolara neden olabilirler. Hastalandırıcı etkisi olan çeşitli maddeler şunlardır:

1.1.5.1. Toksin Niteliğindeki Maddeler

1.1.5.1.1. Sitolitik Toksinler

Sıvı besiyerlerinde üretilmiş stafilokokların kültür süzüntülerinde ekzotoksin niteliğinde maddelerin bulunduğu ve bunların eritrosit ve çeşitli hücrelerin üzerinde sitolitik, deney hayvanlarında öldürücü nekrotik etkilerin bulunduğu bilinmektedir. İyi antijen yapısındaki bu toksinlere karşı organizmada nötralizan antikorlar oluşmaktadır. Bunlar; alfa, beta, gama ve delta toksinleridir [Koneman ve ark.,1997; Bilgehan, 2000]

Alfa Toksin: Alfa hemolizinde geniş bir biyolojik etkinlik alanı vardır. Hemolitik, dermatolojik, lizozom parçalayıcı ve doku kültürlerinde sitolitik etkiler yaparlar. İnsan makrofajları ve trombositleri üzerine litik etkisi varsa da monositlere etkisizdir. Dolaşım, kas ve böbrek korteksi dokuları duyarlı olup bunların üzerinde tahribat yaparlar. Bu toksinin geninin bir transpozona bağlı olduğu kabul edilmektedir. [Koneman ve ark.,1997; Bilgehan, 2000]

Beta Toksin: (Stafilokok Sfingomiyelinazı). Soğukta ve sfingomiyelin üzerine etki etmek suretiyle eritrositleri eriten bir toksindir. Çeşitli eritrositlerinin beta toksine karşı duyarlılıkları değişiktir. [Koneman ve ark.,1997; Bilgehan, 2000]

Gama Toksin: Belirgin bir hemolitik etkisi vardır. Etki mekanizması bilinmemektedir. Özellikle stafilokoklar bağlı kemik enfeksiyonlarında kanda bu toksine karşı antikor düzeyinin yüksek bulunması, bu toksinin bu tür hastalıkların oluşmasında etkili olduğu kanısını vermektedir. [Koneman ve ark.,1997; Bilgehan, 2000]

Delta Toksin: Termolabil yüzeye etkin bir toksin olup detarjanlara benzer bir etki ile hücre membranını bozar. Geniş bir biyoloji etkinliği var olup eritrositleri, makrofajlar, lenfositler ve trombositler üzerinde litik etkileri vardır. Bunların yanında ileumda su absorpsiyonunu inhibe eder. Adenozin monofosfat birimini stimüle eder ve kobay ileumda iyon permeabilitesini değiştirir. [Koneman ve ark.,1997; Bilgehan, 2000]

1.1.5.1.2. Lökositidin

S. aureus tarafından oluşturulan lökositidin polimorf nüveli lökositler ve makrofajların üzerinde litik etkisi vardır. Diğer hücreleri etkilemezler. Birbirlerine sinerjik etki yapılarak hücre erimesini oluşturan S ve F diye adlandırılan iki komponentten oluşmaktadır. Bu komponentlerden her birisi iyi antijen yapısında olup, her ikisinden ayrı toksoid elde edilmiştir. Hücre zarında gözeneklerin açılmasını sağlayarak, potasyum ve diğer katyonlara karşı geçirgenliği arttırarak etkili olurlar [Koneman ve ark.,1997; Bilgehan, 2000]

1.1.5.1.3. Enterotoksinler

S. aureus tarafından oluşturulan, suda erir, termostabil (100°C'de 30 dak. dayanıklı) özel antijen yapısında maddelerdir. Özellikle yüksek CO₂'li ortamda karbonhidrat ve proteince zengin besiyerlerinde üreyen stafilokoklar tarafından oluşturulurlar. A, B, CI, C2, D ve E olmak üzere serolojik olarak 6 grup stafilokok enterotoksinleri ayrılmıştır. *S.aureus* kökenlerinin %35-50'sinin bu toksinleri oluşturabildikleri saptanmıştır. Bir stafilokok kökeni bu toksinlerden yalnız birisini oluşturabildiği gibi bir kaçını birden de oluşturabilir. Bu toksinler insanlar dışında

maymunlarda da etkili olup, diğer deney hayvanlarında bir etkileri olduğu saptanamamıştır. Kusturucu etkilerinin mide ve bağırsaklardaki reseptörler aracılığıyla vagus ve sempatik sinirler yoluyla kusma merkezine iletilen stimulus ile olduğu bilinmektedir. Sürgün oluşturmaları, bağırsak lümeninden su absorpsiyonunun engellenmesi ve mukozadan bağırsak boşluğuna sıvı boşaltılmasının artması yoluyla olmaktadır [Koneman ve ark.,1997; Bilgehan, 2000]

Entertoksinlerin, bir süper antijen gibi etkili olarak T lenfosit mitojenleri gibi T lenfosit aktivitelerini hızlandırdıkları, bunda MHC-II (Major Histocompatibility Complex II) moleküllerinin de rol aldığını ayrıca bu enterotoksinlerin makrofajları da stümile ederek tümör nekroz faktörü oluşturmalarına yönelttiği ortaya konmuştur. [Bilgehan, 2000]

1.1.5.1.4. Epidermolitik Toksin (Eksfoliatif Toksin=Eksfoliatin)

S. aureus tarafından oluşturulan, insanlarda veziküler ve eksfoliatif deri lezyonlarından sorumlu toksindir. Özellikle bakteriyofaj grup II kökenleri tarafından oluşturulur. Antijenik ve biyokimyasal yapılar bakımından en az iki farklı eksfoliatin bulunduğu saptanmıştır. Eksfoliatif Toksin-A (ETA) ve Eksfoliatif Toksin-B (ETB) diye adlandırılan bu toksinlerden birincisinin kromozomal, ikincisinin plazmide bağlı genlerce oluşturulduğu saptanmıştır. Yeni doğan farelerde insanlarınine benzer deri lezyonları oluştururlar. Derinin granüler katmanı hücreleri arasındaki litik etkileri ile lezyon oluştururlar fakat yangısal tepkime oluşturmazlar ve primer olarak hücre ölümüne yol açmazlar. Bu toksinin bir sfingomiyelinaz niteliğinde fakat stafilokok beta toksininden farklı olduğu şeklinde belirtiler vardır. Özellikle T lenfositleri üzerinde mitojen etkilidirler [Koneman ve ark.,1997; Bilgehan, 2000]

Toksik Şok Sendromu Toksini

Toksik şok sendromunda yer alan stafilokokların çoğu faj-I grubunda bulunan 29 ve 52 tiplerindendir. Bunların çoğunluğu toksik şok sendromu toksin-I oluştururlar. Bu toksinin ayrı immunolojik etkileri vardır. Bunlar; interlökin-2 reseptör oluşturulmasını

başlatma ve monositlerce II-1 'in oluşumunu uyarmaktadır. [Koneman ve ark.,1997; Bilgehan, 2000]

1.1.6 Enzim Yapısındaki Maddeler

1.1.6.1. Koagülaz

İnsan veya tavşan plazması ile temasta bırakılan stafilokoklar veya bunların kültür süzüntüleri bir süre sonra plazmayı pıhtılaştırır. Bu tip stafilokoklar girdikleri organizmada koagülazları sayesinde bir fibrin zırhı ile kapanarak fagositoza karşı korundukları gibi normal serumun bakterisit aktivitesini de önlediklerinden patojenite özelliği kazanmış olurlar [Isenberg,1992; Koneman ve ark.,1997; Bilgehan, 2000]

Koagülaz, stafilokoklardan başka *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis* gibi birçok bakteriler tarafından meydana getirilebilir. Protein bileşiminde ve özel antijen yapısındadır. Koagülaz, plazmada bulunan bir aktivatör ile birleştikten sonra onu pıhtılaştırabilmektedir. [Isenberg,1992; Koneman ve ark.,1997; Bilgehan, 2000]

Telluritli besiyerlerinde üretilen koagülaz pozitif stafilokoklar siyah koloni meydana getirirler. Koagülaz deneyi *S. aureus*'un araştırılmasında en güvenilir deneydir. *S. intermedius* ve *S. hyicus* da koagülaz olumlu stafilokoklardır.[Bilgehan, 2000]

İnsanlarda bulunan stafilokok türleri: 1-*S. aureus*, 2-*S. epidermidis*, 3-*S. saprophyticus*, 4-*S. haemolyticus*, 5-*S. capitis*, 6-*S. warneri*,7-*S. hominis*, 8-*S. saccharolyticus*, 9-*S. auricularis*, 10-*S. xylosus*,11-*S. simulans*, 12-*S. cohnii*' dir. Bu türlerin karakteristik özellikleri sırası ile Çizelge 1.2 de belirtilmiştir.

Çizelge 1.2 İnsanlardan İzole Edilen Bazı Stafilikok Türlerinin Karakteristik Özellikleri (sayfa: 26)

Özellik	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Aerop üreme	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Anaerop üreme	+	+	*	*	+	+	-	+	*	&	+	&
Hemoliz	+	-	-	+	-	&	-	-	-	-	&	&
Koagülaz	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DNase	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehaloz-mannitol Fosfataz agar (TMPA) da renk değişikliği	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Novabiocin duyarlılığı	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Bacitracin duyarlılığı	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asetoin oluşturma	+	+	+	&	&	+	&	&	&	&	-	&
Mannitol	+	-	&	&	+	&	-	-	-	&	+	-
Trehaloz	+	-	+	+	-	+	+	-	*	+	+	+
Maltoz	+	+	+	+	-	*	+	-	*	+	-	&
Ksiloz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Sükroz	+	+	+	+	*	+	*	-	&	+	+	-
Laktoz	+	&	&	&	-	&	&	-	-	&	+	-
Cellobioz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ = Pozitif * = Çoğunlukla pozitif - = Negatif & = Değişken

1.1.6.2. Deoksiribonükleaz

Çoğu koagülaz olumlu stafilocoklar DNAz oluştururlar. Çeşitli özellikleri ile (alfa toksin oluşturma, stafilokinaz, hiyarulonidaz yapma, *S. aureus* fajları ile erime v.b.) *S. aureus* oldukları anlaşılan stafilocokların nadir bazı kökenleri koagülaz olumsuz bulunurlar. Bunların, DNAz deneyi ile olumlu bulunmaları *S. aureus* oldukları kanıt sayılır. DNAz deneyi, içinde % 0.2 DNA içeren besiyerlerine ekilen stafilocokların üredikleri yerde ve çevrelerindeki DNA' yı eritmelerini araştırmak suretiyle yapılır. Bu plaklarda stafilocoklar 18 h sonra eritildikten sonra besiyerine normal HCl döküldüğünde DNA'nın erimediğı yerlerde presipitasyon ile bulanıklık oluşurken DNAz olumlu stafilocokların üredikleri bölgeler saydam olarak kalır. Özellikle *S. aureus'un* besin maddelerinde saptanması için DNAz deneyinden yararlanılır [Isenberg,1992; Koneman ve ark.,1997; Bilgehan, 2000]

Stafilocoklar bazı antibiyotiklere duyarlılık deneyi ile ayırt edilebilir. Besiyerine 75 µg/ml polimiksin B'nin eklenmesi ile *S. aureus* 24 saatte üreme gösterir. Buna karşın, diğerk KNS'lar, mikrokoklar ve gram negatif bakterilerin çoğunun üremesi önlenir [Koneman ve ark.,1997; Bilgehan, 2000]

1.1.6.3. Lipazlar

Bu maddeler plazma ve deri yüzeyinde biriken yağlı maddeler üzerinde etkilidir. Ayrıca deri ve deri altı yerleşiminde yağ dokusu üzerindeki etkilerde önemli rol oynarlar [Koneman ve ark.,1997; Bilgehan, 2000].

1.1.6.4. Hiyalüronidaz

Yine *S. aureus'*ların %90'ında bulunan bir enzimatik aktivedir. Bağ dokusunun yapısında bulunan hiyarülonik asitin depolimerizasyonu ve bu suretle stafilocokların doku içerisine yayılmasını sağlar. Antijen özelliğı olan bir maddedir [Koneman ve ark.,1997; Bilgehan, 2000]

1.1.6.5. Stafilokinaz

Streptokoklarda olduğu gibi stafilokoklarda da fibrinolitik etki vardır. Burada bakteriler tarafından salınan kinazlar plazmada bulunan plazminojen veya profibrinolizin isimli maddeyi aktive ederek plazmin (fibrinolizin) oluştururlar. Fibrinolitik etki bu madde aracılığıyla oluşur. Bir faj genomu yönetimindedir. Patojenlikte rolü kesin değildir [Koneman ve ark.,1997; Bilgehan, 2000]

1.1.6.6. Betalaktamaz

Betalaktamaz (Penisilinaz) oluşturan bakteriler *penisilin* ve analoglarının betalaktam halkasındaki amid bağıını hidrolize edip, penisiloik asit oluştururlar. Stafilokoklar salgıladıkları bu enzim ile betalaktam grubu antibiyotiklere karşı dirençli hale gelir. Bu durum patojenite artışına yol açar [Bilgehan, 1995].

1.1.7. Antifagositik Maddeler

Stafilokokların yüzeyinde bulunan protein A ve kapsül niteliğindeki polisakkarit maddelerin bakteriyi fagositozdan koruyucu etkileri vardır. Bu şekilde patojenliğin artmasına neden olurlar [Bilgehan, 1995].

1.1.7.1. Slime Maddesi

Günümüzde tıpta tedavi olanaklarının ve modern metotların gelişmesi ile birlikte kateter uygulamaları ve diğer damar içi girişimler giderek çoğalmıştır. Bu ilerlemeler başta enfeksiyon olmak üzere beraberinde birçok problemin ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Slime oluşumu, KNS'in biyometallere yapışmasını kolaylaştıran konak savunma sistemi ve antibiyotiklerden bakterinin korunmasını sağlayan bir faktördür [Aygen ve ark.,1996 ;Yıldırım, 2004].

Sürekli damar içi kateter bulundurulmuş hastalarda ve hemodiyaliz uygulamalarında deri yüzeyindeki mikroorganizmalar giriş kapısından başlayarak sepsise varan enfeksiyonlar oluşturmaları sıklıkla görülür. *S. epidermidis*, *S. aureus*, gram negatif basiller, *Candida spp.*, *Corynebacterium JK* grubu, *Aspergillus spp.* türleri, *Mycobacterium chelonae* sık görülen enfeksiyon etkenleri arasındadır [Bilgehan, 1995].

Virulans faktörleri arasında yer alan slime faktör, ekstrasellüler bir madde olup, bakterinin plastik ve metal yüzeylere yapışmasını arttırmakta, antibiyotiklerin difüzyonunu inhibe ederek mikroorganizmaya ulaşmalarını, mitojenlere karşı lenfoproliferatif cevabı, kemotaksis gibi polimorf nükleer nötrofil fonksiyonlarını ve bakterinin fagosite olmasını engellemektedir. Bu özelliklerinden dolayı mukus maddesi, KNS' larda gerçek bir patojenite faktörüdür. Bu özelliklerinden dolayı mukus faktör, KNS suşlarının daha yayılımcı ve çok sayıda antibiyotiğe dirençli oldukları birçok araştırmacı tarafından doğrulanmaktadır [Aydınlı v r ark.,1997].

1.1.8. Stafilokokların Oluşturdukları Enfeksiyonlar Şunlardır

1.1.8.1. Deri ve Mukoza Lokalizasyonlar

Stafilokoklar, deride fronkül (sivilce), sikozis (sakal, kıl kökleri yangısı), karbonkül (kan çıbanı), panaris (dolama), deri altı abseleri, hidroadenit (ter bezi yangısı), blefarit (göz kapağı yangısı), hordeolum (arpacık), çevreye yayılmak suretiyle oluşturdukları flegmon, çocuklarda bülloz impetigo v.b. enfeksiyonlar oluştururlar. Yeni doğanlarda ve doğum yapanlarda enfeksiyonlar oluştururlar

Mukozalarda; tonsilit, faranjit, peritonsiller abse ve diğer mukoza altı abseler yaparlar [Bilgehan, 1995].

1.1.8.2. Yaygın Deri Döküntüleriyle Seyreden Enfeksiyonlar

Bu tür enfeksiyonlarda stafilokoklar, vücudun belirli bir bölgesinde lokalize olmuşlardır. Güçlü epidermolitik toksinlerinin yayılması ile deride tipik döküntü ve

lezyonlar oluşur. Daha çok bebeklerde ve bazen çocuk ve erişkinlerde görülen haşlanmış deri sendromu, yine çocuklarda ve özellikle hiper absorban vajinal tampon kullanan kadınlarda görülen toksik şok sendromu bunlardandır.

1.1.8.3. Sepsis ve Endokarditler

Direnci kırılmış kimselerde stafilocoklar tarafından oluşturulan enfeksiyonlardır [Bilgehan, 1995].

1.1.8.4. Sistem ve Organ Enfeksiyonları

Direnci kırılmış kimselerde stafilocoklar tarafından oluşturulan bu tip enfeksiyonların içerisinde, stafilocok etkenli pnömonileri, akciğer abseleri, periostit, periartrit, bursit, tromboflebit otitis media, menenjit, sinüzit, idrar yolları enfeksiyonları, prostatit, perinefekrik abse gibileri bulunur. *S. saprophyticus*'un idrar yolları epiteline afinitesi olup kadınlarda bu tip enfeksiyonlarda rastlanılmaktadır [Bilgehan, 1995].

1.1.9. Besin Zehirlenmeleri

Besin zehirlenmeleri enterotoksin yapan stafilocokların pasta, süt, krema, et v.b. besin maddelerinde üreyerek bu toksinlerini bırakmaları ve bu maddelerin yenilmesi ile oluşan gastrointesitinal intoksikasyonlardır [Koneman ve ark.,1997; Bilgehan, 2000].

1.2. Mastitis

1.2.1.Mastitisin Tanımı

Meme dokusunu oluşturan bütün yapıların ve bu dokuları saran bağ dokunun, sebebi ne olursa olsun yangısına mastitis adı verilmektedir. Hastalık, meme bezinin iritan etkilere karşı bir tepkisi olup, meme dokusu ile sütün nitelik ve niceliğini önemli ölçüde etkilemektedir. Mastitis; etiyolojisi, patogenezi, şiddeti, süresi, tedavisi ve

kalıcı etkileri açısından karmaşık bir hastalıktır [Harmon,1994; Jain,1979; Mcdonald,1979].

Başka bir tarife göre, meme dokusunun süt yapan bezleri (alveoller ve meme parankimi) ile sinüs ve kanallarında meydana gelen enfeksiyona mastitis adı verilir.

Yine meme bezinde sıcaklık artışı, ağrı, kızarıklık, şişkinlik, süt salgısında azalma ve de sütün bileşiminin değişimi ile karakterize bütün meme hastalıklarına “Mastitis” denilmektedir.

Mastitis memenin kısmen veya tamamen tahrip olmasına, bazen de hayvanın ölümüne kadar varabilen sonuçlara neden olur. Mastitis, süt veriminin azalması, elde edilen sütün kalite ve bileşiminin bozulması, sağaltım giderlerinin artması ve hayvanın elden çıkarılmasına kadar varabilen ekonomik zararlara yol açmaktadır [Deveci,1994;Radostitis].

1.2.2. Mastitisin Etiyolojisi

İneklerin memesinde, değişik türden birçok faktör yangı oluşturmaktadır. Bunlar enfeksiyöz olan ve olmayan sebepler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Enfeksiyöz olmayan faktörler, meme dokusunda tahrişe sebep olan organik ve inorganik kimyasal maddelerdir. Enfeksiyöz sebepler içerisinde bakteriler, virüsler, parazitler ve mayalar bulunmakla birlikte en önemli yeri bakteriler almaktadır. Bugüne kadar mastitis vakalarında izole edilen mikroorganizma sayısının 137 olduğu bildirilmektedir . Ancak, meme enfeksiyonlarının ortaya çıkışında stafilokokların streptokoklara nazaran ve aerob mikroorganizmalarında anaeroblara nazaran daha fazla rol oynadığı bildirilmektedir. Değişik çalışmalarda, mastitisli sütlerden üretilen mikroorganizma oranları Çizelge 1.3’de gösterilmiştir [Erk,1972;Arda,1992].

Çizelge 1.3. Değişik çalışmalarda mastitisli sütlerden üretilen mikroorganizma oranları

	Türüt(%)	Taştan(%)	Fırat(%)	Aydın(%)	Batu(%)	Sihukken(%)	Hu(%)	Ateş(%)
<i>Staph. aureus</i>	28.1	36.69	33.85	23.4	44.6	9.6	17.4	54.3
<i>Strep.agalactiae</i>	18.9	7.19	7.18	10.6	14.3	0.2	22.4	8.4
<i>Strep.dysgalactiae</i>	3.9	2.15	5.38	2.1	13.4	4.8	8.8	4.6
<i>Strep.uberis</i>	3.7	6.47	6.92	9.3	0.6	8.0	6.4	2.0
<i>E coli</i>	8.0	3.59	13.08	8.5	6.6	16.2	-	1.2
<i>C.pyogenes</i>	-	5.05	0.51	7.4	0.8	-	-	5.8
<i>Staph.epidermidis</i>	23.1	3.59	16.15	7.2	15.0	13.0	34.5	13.3

İneklerde mastitise sebep olan mikroorganizmalar 4 grupta incelenmektedir;

- 1.Kontagiyöz mikroorganizmalar
- 2.Çevresel mikroorganizmalar
- 3.Fırsatçı mikroorganizmalar
- 4.Diğerleri [Philpot,1991;Arda,1986].

Mastitis, hazırlayıcı nedenler aracılığı ile mikroorganizmalar tarafından oluşturulur. Sütün besleyici değerinin çok yüksek olması nedeniyle çok sayıda ve türde etkenin meme dokusuna yerleşmesi ve üreyerek hastalığı oluşturması mümkündür. Sığırların mastitisli süt örneklerinden, 130'un üzerinde farklı mikroorganizma izole edilmiştir . Bunlardan bakteriyel orjinli olanlarının başlıcaları; stafilokoklar, streptotoklar, koliform bakteriler (*Esheria coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumoniae*, vs.), *Corynebacterium pyogenes* (*Actinommyces pyogenes*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium bovis*, Brusella etkenleri, *Pasteurella multocida* ve *P.haemolytica*'dır. Bu mikroorganizmalardan başka *Clostridium perfringens*, *Nocardia asteroides*, *Cryptococcus neoformans*, *Listeria monocytogenes*, *Corynebacterium*

pseudotuberculosis de mastitise neden olmaktadır . Bu mikroorganizmalar genellikle meme başı yoluyla mastitise neden olurlar. Brusella ve tüberküloz etkenleri gibi bazı mikroorganizmalar ise, sistemik enfeksiyon sırasında kan yolu ile meme dokusuna ulaşarak mastitisi meydana getirirler. Bakteriler dışında bazı mantar ve maya türleri ile virüsler de mastitise neden olur. Çiçek ve şap hastalığının seyri sırasında meme ve başlarında meydana gelen primer vesiküllerin sekonder bakteriyel enfeksiyonları, mastitisle sonuçlanabilmektedir [Watts,1988;Arda,1980;Eberhatr,1986].

1.2.3. Mastitisin Sınıflandırılması

Mastitis çok değişik şekillerde sınıflandırılabilir. Bunlardan en çok kullanılanları şunlardır.

✓ Mastitis, hastalığın klinik seyrine göre

Klinik mastitis

Perakut mastitis

Akut mastitis

Subakut mastitis

Kronik mastitis

✓ Oluşumunda rol oynayan faktörlere göre

Viral mastitisler

Paraziter mastitisler

Bakteriyel mastitisler

Kimyasal mastitisler olmak üzere 4'e ayrılmaktadır.

Mastitislerde yagının şekli; hastalığın şekillenme süresi, enfeksiyonun şiddeti, mikroorganizmanın türü, mikroorganizmaların sayısı, meme dokusunun direnci, hayvanın yaşı, ırkı, bakım, beslenme şartları, çevre ve mevsim gibi faktörlere bağılı olarak değişmektedir [Ulusoy,1988; Philpot,1991].

1.2.6. Klinik Mastitisler

a) Perakut Mastitis

Perakut mastitisler, hayvanlarda titreme, vücut ısısında yükselme, nabız artışı, kısa ve hızlı soluma, huzursuzluk, yeme içmenin durması, lümen hareketlerinin azalması ve tek taraflı topallık gibi genel semptomlara sebep olurlar. Memenin bir veya daha fazla lobunda şişkinlik, gerginlik, kızarıklık, ısı artışı, ödem ve ağrı görülür. Süt sekresyonu azalır veya tamamen durur. Enfeksiyonun ilk birkaç saatinde memeden seröz, daha sonra da kanlı ve irinli bir içerik gelir. Erken müdahale edilmeyen vakalarda ölümler görülebilir [Guidry,1985;Büyükpamukçu,1980;Blood,1989].

b) Akut mastitis

Perakut vakalardan farklı olarak, genel semptomlar bu tipte biraz daha hafiftir. Sütteki ve meme loblarındaki değişiklikler hemen hemen aynıdır [Başkaya,1972].

Mastitislerin perakut ve akut şekilleri gangrenli mastitislere dönüşebilir. Gangrenli mastitislerde, meme dokusundaki nekroza bağlı olarak meme soğuk, mor-mavimtrak renkte, hissiz ve duyarsızdır. Hayvan daima durgun, bitkin ve kederli bir haldedir, tüyleri kabarık ve karışık olup, yeme içme durmuştur [Ulusoy,1988; Philpot,1991].

c) Subakut mastitis

Bu tipte, perakut ve akut mastitislerde görülen şiddetli genel ve lokal semptomlar görülmez. Bu tür mastitislerde belirtiler yavaş gelişir. Hastalığın başlangıç döneminde sağımda güçlüklerle karşılaşılır. Hayvan sağıma izin vermez. Sağımın başlangıcında sütte pıhtıya rastlanabilir. Enfeksiyonun ilerlemesi ile memede artan şişme, kızarma, ısı artışı ve ağrı görülür [Başkaya,1972; Arda,1979].

d) Kronik mastitis

Mastitisin bu şekli, tedavi edilmeyen ve uzun süre devam eden diğer klinik ve subklinik vakaların sonucunda ortaya çıkar. Kronik mastitisli hayvanlarda genel semptomlar görülmez. Memelerde sertlik ve hipertrofi vardır. Uzun süre devam eden kronik mastitisler sonucu memede atrofi şekillenir. Meme loblarında ısı artışı, kızarıklık ve ağrı gibi lokal semptomlar gözlenmez. Sütte her zaman belirgin değişiklikler ortaya çıkmaz, sütün az çok tuzlu olması, renginin mavimsi bir renk alması ve sulanma genellikle kronik mastitislerde sütte meydana gelen fiziksel değişikliklerdir. Memeden irinli bir içerik salgılanabilir. Herhangi bir uygulama yapılmadığı durumlarda, süt salgısı tamamen durup, meme körleşebilir [Başkaya,1972; Arda,1979]

Bazı kaynaklarda kronik mastitislerin, vücudun direncini zayıflatan genel enfeksiyonlar, ani iklim ve yem değişiklikleri, stres ve doğum gibi durumlarda, diğer klinik formlara dönüşebileceği bildirilmektedir [Ulusoy,1988;Aydın,1995].

1.2.7. Subklinik mastitis

Mastitisin bu şekli meydana getirdiği zararlar bakımından, diğer tiplere nazaran daha fazla önem taşımaktadır. Süt ineklerinde subklinik mastitislere, klinik mastitislerden 25–30 kat daha fazla rastlanmaktadır. Bunun sebebi bu tür mastitislerin herhangi bir belirti göstermeksizin, uzun süre varlığını devam ettirmesinden kaynaklandığı bildirilmektedir [Ulusoy,1988; Philpot,1991; Aydın, 1975].

Mastitisin bu şeklinde, memede yangı olduğu halde, klinik olarak herhangi bir belirti görülmez. Süt normal görünümündedir ancak miktarında tedrici bir azalma ve bazı durumlarda sağımın sonunda memeden bir miktar pıhtı çıkabilir. Subklinik vakalar tedavi edilmediği takdirde, diğer klinik şekillere dönüşebilir veya meme loblarında atrofiye sebep olabilirler

Hayvanlarda lokal ve genel semptomlara bakılarak, mastitise sebep olan bakteri türünü belirlemek zordur. Ancak, memede enfeksiyon oluşturan mikroorganizma türlerine göre, hayvanlarda ortaya çıkan semptomlarda bazı değişiklikler görülebilir. Enfeksiyona sebep olan bakteri türüne göre, mastitisin semptomları şöyle sıralanabilir [Arda. 1979; Aydın, 1975].

a) Stafilokokların Sebep Olduğu Mastitisler

Stafilokoklardan ileri gelen mastitisler, ineklerde perakut şekilden kronik şekle kadar değişen bir tablo gösterir. Perakut stafilokokal mastitislere, genellikle doğumdan sonraki ilk birkaç günde rastlanır. Şiddetli genel semptomlara sebep olurlar. Genel semptomların ve lokal değişimlerin ortaya çıkış anıdır. Hayvanın ölümüne sebep olabilir [Mcdonald 1979; Deveci,1994].

Akut stafilokokal mastitislere de genellikle laktasyonun başında rastlanır. Hayvanlarda ateş, iştahsızlık, depresyon, lumen hareketlerinin durması, zayıflama ve dehidrasyon gibi genel semptomlar görülür. Hastalıklı meme lobları hipertrofik, ödemli, kızarıklık, sıcak ve ağrılıdır. Ağrıdan dolayı tek taraflı topallık şekillenir. Süt salgısı azalır; memeden seröz, irinli, pıhtılı ve kanlı bir sıvı salgılanır. Stafilokokların salgıladığı toksinler, toksemiye ve gangrenli mastitislere de sebep olabilir [Jain, 1979; Philpot,1991].

Kronik şekilde, başlangıçta memede ve hayvanın genel durumunda bir bozukluk fark edilmez. Fakat, zamanla süt salgısı azalır, süt sulu bir görünüm alır, memede hipertrofi ve sertlik ortaya çıkar, ilerlemiş durumlarda memede süt salgısı durur ve meme körleşir [Jain, 1979; Philpot,1991].

b) Streptokokların Sebep Olduğu Mastitisler

Bu mikroorganizmalar gizli ve yavaş seyirli genellikle kronik enfeksiyonlara sebep olurlar. Çoğunlukla kuru dönemde enfeksiyon oluşturlar, ancak laktasyon döneminde

de enfeksiyonlara sebep olabilirler. Streptokoklar genellikle arka meme loblarında daha fazla hastalık oluşturlar [Philpot,1991; Aydın, 1975].

c) Koliformların Sebep Olduğu Mastitisler

Bu mikroorganizmalar, perakut şekilden subklinik şekle kadar değişen derecelerde ve çoğunlukla akut seyirli mastitislere sebep olurlar. Perakut enfeksiyonlara doğumdan hemen sonra rastlanılır. Hızlı bir seyir gösterip, şiddetli klinik belirtilere sebep olurlar. İştahsızlık, ateş, titreme ve lumen hareketlerinde azalma gözlenir. Bu ilk klinik belirtiler esnasında memede sertlik, ağrı, ödem, aşırı şişlik ve hassasiyet dikkati çeker. Perakut şeklin ilerlemesine bağlı olarak, endotoksik şok belirtileri (depresyon, şiddetli dehidrasyon, ishal, metabolik asidozis) ortaya çıkar. Enfeksiyonunun erken dönemlerinde süt normal veya hafif suludur. Daha sonra süt seröz hale geçer ve çok küçük partiküller içerir. Hastalığın ileri dönemlerinde süt miktarı çok azalır veya tamamen kesilir.

Perakut koliform mastitisler, genellikle hayvanın ölümü ile sonuçlanır. Akut koliform mastitisler, belirtilerin daha hafif ve seyrinin daha kısa olması sebebiyle perakut şekilden ayrılır. Kendiliğinden iyileşme eğilimi vardır [Philpot,1991; Aydın, 1975].

Koliform mastitislerin kronik şekli diğer şekillere nazaran daha uzun bir sürede şekillenen ve tekrarlayan klinik vakalar olarak ortaya çıkar. Bu klinik şekilde, sütte bariz belirtiler görülmeyebilir [Philpot,1991; Aydın, 1975].

1.2.9. Somatik Hücre Sayılarının (SHS) Tespit Yöntemleri

Sütlerde mastitis esnasında sayıları artan epitel hücreleri ve lökositlerin teşhis edilebilmesi için çok değişik yöntemler geliştirilmiştir [Arda,1997].

1.2.9.1. Somatik Hücre Sayılarının İndirekt Testlerle Saptanması

Bu testler deterjan ile somatik hücre DNA' sinin yapışkan bir jel oluşturması ilkesine dayandırılmıştır. Reaksiyonun derecesi sütün somatik hücre sayısına bağlıdır. Oluşan reaksiyon subjektif olarak gözlenir. Bu nedenle değerlendirmede hatalara düşülebilir. Bu prensibe dayandırılan testler, saha koşullarında rahatlıkla uygulanabilen CMT, White Side Testi, Wisconsin Mastitis Testi (WMT) ile CMT'nin daha fazla örneğe uygulanmasını sağlayan ve laboratuvarlarda kullanılan tipi Barabant Mastitis Testidir. Bu testlerden en pratik olana CMT'dir. Sütteki somatik hücrelerin miktarına göre hafif bir presipitasyondan yoğun bir jel şekillenmesine kadar değişik reaksiyonlar gösterir . Pal ve arkadaşları (1989), subklinik mastitisin teşhisinde kullanılan 4 indirekt testle mikrobiyolojik muayeneyi karşılaştırmışlardır [Pal,1989].

Subklinik mastitisli meme loplarının teşhisinde en iyi metodun CMT olduğunu gözlemişlerdir. Yapılan diğer çalışmalarda da, subklinik mastitislerin teşhisinde kullanılan bazı indirekt testler karşılaştırmıştır. Bu testler arasında SHS (Somatik Hücre Sayısı) değerleri ile en iyi uyum sağlayanın ve subklinik mastitislerin teşhisinde en iyi sonuç verenin CMT olduğu belirtilmiştir [Schalm, 1971;Ergün,1984].

1.2.9.2. Somatik Hücre Sayılarının Direkt Testlerle Saptanması

Direkt somatik hücre sayımı, Direkt Mikroskopik Somatik Hücre Sayımı (DMSHS), Coulter Counter ve Fossomatik gibi elektronik sayım gereçleri ve yöntemleri ile yapılmaktadır [Quinn,1994; Akay,1993].

1.2.9.3. Direkt Mikroskopik Somatik Hücre Sayımı

Bu metodun uygulanması sırasında, 0.01 ml süt pipetle alınarak, lam üzerindeki 100 mm² alana yayılır. Hazırlanan preparat değişik boya maddeleri ile boyanıp, immersiyon objektifi ile incelenir. Bir mililitredeki toplam somatik hücre sayısını bulmak için, belirli sayıdaki sahalarda hücreler sayılarak hesaplanan bir çalışma faktörü ile sayılan toplam hücre adedi çarpılır. Normal laktasyondaki ineklerden alınan ilk süt

örneklerini 1 ml'sindeki 500.000 hücre veya daha fazla hücre IDF tarafından subklinik mastitislerin teşhisinde genel bir kriter olarak kabul edilmiştir [Akay,1993].

1.2.9.4. Coulter Counter Kullanımı ile Ölçüm

Hücre sayımı için geliştirilmiş elektronik bir alettir. Bu metodda, süt örnekleri somatik hücre membranlarını stabilize etmek için formaldehit ile tespit edilip, bir elektrolit solüsyonu ile sulandırılır ve sayım esnasında zarar verebilecek yağ globüllerini ayırmak için ısıtılır. Bu şekilde hazırlanan süt örnekleri belirli büyüklükteki 4.5 μ küçük bir süzgeçten geçerler ve her bir hücre tarafından sebep olunan elektriksel akımlar, amplifikatör yardımı ile algılanır. Akımların toplam miktarı, mevcut somatik hücrelerin sayısı olarak kaydedilir [Blood, 1989].

1.2.9.5. Fossomatik

Bu alet ile somatik hücre sayımında, süt örneği bir tampon solüsyon ile sulandırılıp, Etidyum Bromid ile karıştırılır. Hücre çekirdeğinin DNA'sı ile Etidyum Bromid arasına bağlanan bir boyadan oluşan floresans kompleksi, halojen ark lambasından çıkan 580 nm. Dalga boyundaki ışıklardan etkilenerek kuvvetli bir floresans çıkarır. Yayılan ışık enerjisi bu alet ile elektronik olarak saptanır [Guidry, A. J. 1985; Kitchen,1981].

1.2.9.7. Mikrobiyolojik Muayene

Sütün somatik hücre sayısının belirlenmesi ilkesine dayanan testlerle, etiyolojileri ne olursa olsun memedeki yangılar belirlenebilmektedir. Etiyolojilerinin belirlenmesi ise, ancak mikrobiyolojik muayenelerle hastalık etkenlerinin izolasyonu ve identifikasyonu ile mümkündür. Süt örneklerinin mikrobiyolojik muayenesi ile etkenlerin izolasyonu, identifikasyonu ve farklı özelliklerde antibiyotik duyarlılık testlerinin uygulanması, tanı ve tedavi yönünden çok önemlidir [Leloğlu,1997].

1.3. AĞIR METALLER

Ağır metal tanımı fiziksel özellik açısından yoğunluğu 5 g/cm^3 ’ ten daha yüksek olan metaller için kullanılır. Bu gruba kurşun, kadmiyum, krom, demir, kobalt, bakır, nikel, civa ve çinko olmak üzere 60 tan fazla metal dahildir. Bu elementler doğaları gereği yer kürede genellikle karbonat, oksit, silikat ve sülfür halinde stabil bileşik olarak veya silikatlar içinde hapis olarak bulunurlar. Her ne kadar metallerin yoğunluk değeri üzerinden hareketle ekolojik sistem üzerindeki etkileri tanımlanmaya/gruplandırılmaya çalışılıyorsa da gerçekte metallerin yoğunluk değerleri onların biyolojik etkilerini tanımlamaktan çok uzaktır [Rether,2002].

1.3.1 Ağır Metallerin Etkileri

Ağır metaller biyolojik proseslere katılma derecelerine göre yaşamsal ve yaşamsal olmayan olarak sınıflandırılırlar. Yaşamsal olarak tanımlananların organizma yapısında belirli bir konsantrasyonda bulunmaları gereklidir ve bu metaller biyolojik reaksiyonlara katıldıklarından dolayı düzenli olarak besinler yoluyla alınmaları zorunludur. Örneğin bakır hayvanlarda ve insanlarda kırmızı kan hücrelerinin ve bir çok oksidasyon ve redüksiyon prosesinin vazgeçilmez parçasıdır [Bigersson ve Arkadaşları,1988].

Ağır metallerin insan metabolizmasında oluşturdukları etki ve etkin oldukları aşamaları ana sistemler açısından kısaca ele alırsak bunları:

- Kimyasal reaksiyonlara etki edenler,
- Fizyolojik ve Taşınım sistemlerine etki edenler,
- Kanserojen ve mutojen olarak yapı taşlarına etki edenler,
- Alerjen olarak etki edenler ,
- Spesifik etki edenler olarak sıralamak mümkündür.

Metallerin ekolojik sisteme ve özellikle insanlara etki yönünden ele alınış sıralamasında gruplar veya kimyasal özellikler yerine çevresel etki açısından tipik olmaları dikkate alınacaktır. Öncelikle en yüksek yayınıma sahip olan kurşun, toksikolojik olarak en büyük hasara yol açan kadmiyum öncelikli olarak ele alınmalıdır [Bigersson ve Arkadaşları,1988].

KURŞUN (Pb)

Biyosfere insan faaliyetlerine bağlı olarak önemli oranda yayılan kurşun, ekolojik sisteme en önemli zararlı veren ilk metal olma özelliği taşımaktadır. Kurşun atmosfere metal veya bileşik olarak yayıldığından ve her durumda toksik özellik taşıdığından (Çalışma ortamında izin verilen sınır $0,1 \text{ mg/m}^3$) çevresel kirlilik yaratan en önemli ağır metaldir. 1920'lerde kurşun bileşikleri benzine ilave edilmeye başlanmıştır ve bu kullanım alanı kurşunun ekolojik sisteme yayınımlarında önemli rol oynar (227.250 ton/yıl ABD) [Bigersson ve Arkadaşları,1988].

Kurşunun vücutta absorpsiyonu çocuklarda daha yüksek olmakla beraber normalde % 5 gibi düşük bir oranda gerçekleşmektedir Bu oran dahi kalsiyum ve demir gibi birçok mineralin vücut tarafından emilimini azaltmaktadır. Kana karışan kurşun buradan kemiklere ve diğer dokulara gitmekte ya da dışkı ve böbrekler yoluyla vücuttan atılmaktadır. Kemiklerde biriken kurşun zamana bağlı olarak (yarılanma ömrü yaklaşık 20 yıl) çözünerek böbreklerde tahribata neden olur. Kurşun bir nevi nörotoksindir ve anormal beyin ve sinir sistemi fonksiyonlarına sebep olmaktadır. Çocuklar üzerinde yapılan araştırmalarda kanda kurşun miktarı arttıkça IQ seviyesinin düştüğü tespit edilmiştir. Diğer taraftan kurşun nörotoksik özelliğinden dolayı sinir sisteminde iletimin azalmasına da yol açmaktadır [Baldwin ve ark.,1999].

Besin zincirinde kurşun yayınımları genellikle midye türü kalsiyumlu kabuklular üzerinden ve kalsiyuma bağlı olarak gerçekleşir. Tek hücreli canlıların ve balıkların $0,04 - 0,198 \text{ mg/l}$ inorganik kurşun içeren suları tolere edebildikleri ancak daha düşük

miktarlarda kurşunun besin yoluyla alınmasında akut zehirlenme gösterdikleri bilinmektedir [European E3 Project-Danimarka,2002].

KADMİYUM (Cd)

Kadmiyum, çinko üretimine eşlik eden metal olarak üretilmiştir. Çinko üretiminde ortaya çıkıncaya kadar havaya, yiyeceklere ve suya doğal süreçlerle önemli miktarlarda karışmamıştır. Ancak günümüzde kadmiyum da çevre kirliliğine sebep olan ağır metaller arasında yerini almıştır. Günümüzde kadmiyum endüstriyel olarak nikel/kadmiyum pillerde, korozyona karşı özellikle denizel koşullara dayanımı nedeniyle gemi sanayinde çeliklerin kaplanmasında, boya sanayinde, PVC stabilizatörü olarak, alaşımlarda ve elektronik sanayinde kullanılır. Kadmiyum empürüte olarak fosfatlı gübrelerde, deterjanlarda ve rafine petrol türevlerinde bulunur ve bunların çok yaygın kullanımı sonucunda da önemli miktarda kadmiyum kirliliğine ortaya çıkar [Mertz,1987].

İnsan yaşamını etkileyen önemli kadmiyum kaynakları; sigara dumanı, rafine edilmiş yiyecek maddeleri, su boruları, kahve, çay, kömür yakılması, kabuklu deniz ürünleri, tohum aşamasında kullanılan gübreler ve endüstriyel üretim aşamalarında oluşan baca gazlarıdır. Endüstriyel olarak kadmiyum zehirlenmesi kaynak yapımı esnasında kullanılan alaşım bileşimleri, elektrokimyasal kaplamalar, kadmiyum içeren boyalar ve kadmiyumlu piller nedeniyledir. Kadmiyum önemli miktarda gümüş kaynaklarda ve spreylere boyalarda da kullanılmaktadır [Mertz,1987].

Kadmiyum içeriği $0,01 \text{ mg/m}^3$ havanın 14 günden daha fazla solunması durumunda kronik akciğer rahatsızlıkları ve böbrek yetmezliği ortaya çıkar. Çünkü kadmiyum ve bileşikler genellikle böbrekler ve karaciğerde birikirler ve ilerleyen yaşlarla böbreklerdeki birikim yüksek tansiyona da sebep olabilmektedir. Kısa süreli olarak $0,05 \text{ mg/kg}$ kadmiyum alınımı mide rahatsızlıklarına neden olurken, uzun süreli (>14 gün) $0,005 \text{ mg/kg/gün}$ dozu böbrek ve kemiklerde önemli problemlere neden olmaktadır [Holleman,1995].

2. KONU İLE İLGİLİ YAYINLAR VE ÇALIŞMALAR

Gagliano ve Hindsill (1970) *S. aureus* kültürlerinden izole ettikleri stafilocok kaynaklı patojenite özellikteki bakteriosinin kimyasal, fiziksel ve biyolojik özellikleri ile ilgili çalışmalarında; bakteriosine ulaşmak için öncelikle hücreyi parçaladılar ve hücrenin istenmeyen kısmından diferansiyal santrifüj yardımıyla kurtuldular ve sütun kromatografisi kullanarak farklı molekül büyüklükteki maddeler elde ettiler. Bulunan bu maddelerin kimyasal, fiziksel, immünolojik incelemeleriyle *S. aureus* izolatı olan toksin yapısındaki maddelerin toksinlerin gerek hücre zarı, hücre membranı ve hücrenin diğer bölümlerinden orjin aldıklarını buldular. Bu çalışma *S. aureus* ile ilgili gerek antibiyotik kullanımı gerek aşı ile tedavilerde patojen odaklarının farklı bölgelerden orjin aldıklarını ve buna bağlı olarak farklı kimyasal özellik gösterdiklerini netice olarak kullanılacak tedavi yolunun seçilecek maddenin belirlenmesinde seçici olunmasına dikkati çektiler [Gagliano ve Hindsill,1970].

Jain ve arkadaşları (1979) mastitise patojenik mikroorganizmaların neden olduklarını ve yerleşip enfeksiyon oluşturdukları bölgedeki dokular tarafından bu bakterilere karşı doku yapısının sağlıklı kalması için bazı savunma sistemlerini kullandıklarını fakat; mikroorganizmaların bu bölgelerde yaşamaya başladıkça patojenik karakterlerini bu bölgelere yaydıklarını: dokunun doğal savunma olarak kullandığı fiziksel bariyer ve bağışıklık hücrelerinin yetersiz kaldıklarını belirlemişlerdir. Bu amaçla meme dokusunu ve süt kanalını incelemişler, subklinik ve klinik mastitise en çok neden olan *S.aureus*'un bu bölgelerdeki en çok rastlanan patojenik bakteri olduğunu ve patojenite özelliğine sahip yapılarının fazlalığından dolayı bu bölgede en uzun varlığını koruyabilen bakteri olduğunu saptamışlardır. Tedavi için kullandıkları antibiyotiklerin patojenite özelliği gösteren maddelerin hepsine birden etkili olamayacağına dikkat çekmişlerdir [Jain ve ark. ,1979].

Harmon ve arkadaşları (1994) patojen bakterilerin meme dokusuna yerleştikten sonra buradaki varlıklarıyla sütün doğal yapısını bozduklarını ve sütteki somatik hücre sayılarında artmaya neden olduklarını düşünmüşler ve bu dokulardaki enfeksiyon varlığı ile somatik hücreler arasında bir paralellik olduğunu, enfeksiyonlu hayvanların sütlerindeki SHS arttığını bulmuşlardır. Yapılan mikrobiyolojik çalışmalarda patojen kaynaklı enfeksiyonların büyük bir bölümüne ait sütlerin içeriği incelendiğinde somatik hücre sayısının artışı gözlemlenmiştir ve 1 ml’ de 200.000 den fazla hücre saymışlardır, incelenen sütlerde sayısında artış görülen hücrelerin genellikle lökosit ve azda olsa epitel hücreleri olduğunu bulmuşlardır [Harmon ve ark.,1994].

De Soza ve arkadaşları (2007) farklı tür hayvanlardan aldıkları subklinik mastitisli sütlerde yaptıkları incelemelerinde 84 adet *Staphylococ spp.* izole elde ettiler. Bu 84 izolatin 30 tanesi biyokimyasal ve moleküler tekniklerle ve fenotipik–genotipik karşılaştırma yapılarak *S. aureus* olduğunu saptadılar. Moleküler teknik olarak Pulsed-Field Gel Elektorforezi (PFGE) ve çoklu alan dizi tiplendirmesi ile gerçekleştirdiler. Moleküler teknikler kullanılarak çalışma bölgesine has bir bakteri türü bulunmaya çalışılmış bu amaçla insanlardan izole edilen *S. aureus* türüyle sadece benzer bir tür bulmuşlardır. Ayrıca araştırmada *Staphylococcus* olarak identifikasyonu yapılan türlerin antibiyotik duyarlılıkları incelendiğinde tüm örneklerin vankomisine karşı duyarlı oldukları bulunmuştur. 30 izolatin 10 tanesi yani %33 penisiline karşı dirençli, 2 tanesi %6,5 klindamisine karşı hafif dirençli ve yine 2 tanesi %6,5 eritromisine karşı hafif dirençli olduğu saptanmıştır [De Soza ve ark.,2007].

Baizabal ve Aguirre (2006) patojenik bakterilerin meme dokusuna yerleştikten sonra bu dokudaki enfeksiyonlara karşı vücudun oluşturduğu immün cevabın ve bu cevapla oluşan hücrelerin varlığının somatik hücrelere karşı faj özelliği olan hücreler ve interlökinlerin varlığına dayanılarak hastalığın tanısı hatta tedavi yöntemi üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir [Baizabal ve Aguirre ,2006].

Nagahata ve İto (2007) somatik hücre sayımı ve *S. aureus* kaynaklı mastitis enfeksiyonları arasında bir bağlantı olduğunu ve bu doğrultuda belli bir bölgede 3.5 yıllık bir çalışma sonucunda belli çiftliklerden bu parametreleri hijyen koşullarını dikkate alarak incelemişlerdir. İlk ölçümlerinde SCC (Somatic Cell Count) sayısı süt toplama tanklarında ortalama 52.3×10^4 bulunuyor ve bu sütlerdeki mikrobiyolojik incelemeler sonucunda bu enfeksiyonları gerçekleştiren bakterilerin % 29'nun *S. aureus* kaynaklı olduğunu buluyorlar. Çalışmanın ilerleyen aylarında hijyen kurallarının sıkı uygulandığı bu çiftliklerde SCC sayısında ciddi bir düşüş meydana geliyor. SCC sayısı 18 ay sonunda ortalama 30×10^4 /ml, daha sonraki aylarda 20×10^4 /mL altında sayılara ulaşıyorlar. Bu çalışma hijyenik şartların Mastitis olgularındaki önemi gösteriyor [Nagahata ve İto ,2007].

Kalmus ve Kask (2005) yılları arasında 11 hayvan sürüsü belirleyip bu sürülerde klinik Mastitis olgularını incelemişler. Bu incelemelerde ineklerde klinik Mastitis olgularının ana patojeninin *S. aureus* olduğu ve %11,2 ile ilk sırada olduklarını belirlemişlerdir [Kalmus ve Kask ,2005].

Tormod ve arkadaşları (2007) Pulsed-Field Alan Elektroforezi (PFGE) kullanarak 547 klinik Mastitis olgusunun tespit edildiği ineklerin meme dokularındaki incelemelerinde enfeksiyon etkeni bakterilerin % 63,1 *S. aureus* kaynaklı olduklarını tespit etmişlerdir. Ayrıca bu ineklerde saptanan 28 subklinik Mastitis olgusunda 24 tanesinin *S. aureus* kaynaklı olduğu (%84) yine PFGE kullanarak bulmuşlardır. Bu bölgede (Norveç) yapılan çalışmada Mastitis olgularında *S. aureus*' un dominant bir karakter gösterdiği tespit edilmiştir [Tormod ve ark.,2007].

Normanno ve arkadaşları (2006) çeşitli gıdalardan izole ettikleri *S. aureus* bakterilerinin enterotoksin tipleri ve bu bakterilerin antibiyotik duyarlılık testlerini çalışmışlardır. *S. aureus* türlerinin izolasyon ve identifikasyonunu Koyun Kanlı agar, Baird Parker agarları kullanarak yine şüpheli kolonileri katalaz ve gram boyamalarından sonra APİ (Analytic Profile Index) biyokimyasal belirleme metodunu kullanarak belirlemişlerdir. Toksin tayin deneyini ise OXOID firmasının SET-RPLA kiti ile

gerçekleştirmişlerdir. Antibiyotik duyarlılık deneylerini Müller Hinton agarda disk difüzyon metodu ile gerçekleştirmişlerdir. Çalışmaları sonucunda; ençok Stafilocokal Enterotoksin D (SED) %33.6, sonra sırası ile Stafilocokal Enterotoksin A (SEA) %18.4, Stafilocokal Enterotoksin C(SEC) %15.2 ve Stafilocokal Enterotoksin B (SEB) %6.4 bazı örneklerde ise birden fazla toksin tipi bir arada bulunmuştur. 14 örnekte SED ve SEA %11.4, SEB-SEC %5.6, SEA-SEB %4, SEB-SED %0.8, SEC-SED %0.8 sadece bir örnekte SEB-SEC-SED bir arada bulunmuştur %0.8 Antibiyotik duyarlılık testlerinde ise çalışmada en az bir bakteri bir antibiyotiğe karşı direnç göstermiştir bu oran %68.8'dir. Fakat hiçbir bakteri vankomisin ve teikoplanine karşı direnç gösterememiştir [Normanno ve ark.,2006].

Contreras ve arkadaşları (1998) Akdeniz bölgesinde süt endüstrisinde büyük ekonomik değere sahip olan keçi sütleri üzerinde mastitise neden olan bakteri kaynaklı çalışmalarında enfeksiyona etken olan bakterilerin %70 oranında *Staphylococcus spp.*, *Corynebacteria* %24, %3 gram-negatif basil, %3 karışık bakteri gurubu bulmuşlardır [Contreras ve ark.,1998].

Abay ve Bekyürek (2006) sütçü ineklerde *S. aureus*'un neden olduğu subklinik mastitislerin sağültimında sefkuinom ile amoksisilin + klavulanik asit kombinasyonunun etkinliklerini karşılaştırmışlardır. Yapılan meme içi uygulamalarla sefkuinom ile amoksisilin + klavulanik kombinasyonunun başarıyla kullanılabileceği saptanmıştır [Abay ve Bekyürek ,2006].

Yüzüncü Yıl Üniversitesi veterinerlik fakültesi mikrobiyoloji bölümünden Şimşek ve Aksakal (2005) subklinik mastitisli ineklerde E vitamininin bazı biyokimyasal değerlere etkisini araştırmışlar. Araştırmada, 40 adet inek kullanmışlardır. Sağlıklı ve mastitisli inekler, CMT ve SHS'ına göre belirlendi. Mastitisli ineklere 20 gün boyunca gün aşırı 2.000 IU E vitamini kas içi uygulandı. Sonuç olarak mastitisli ineklerde kan biyokimyasal değerlerinde E vitamininin çok önemli etkide bulunmadığı bunun yanında mastitise karşı korunmada E vitaminini koruyucu olarak etkili olduğunu bulmuşlardır [Şimşek ve Aksakal ,2005].

Rişvanlı ve Kalkan (2002) subklinik mastitisli meme loblarından alınan süt numunelerinde SHS ve mikrobiyolojik izolasyon oranlarının karşılaştırılması ve hayvanların yaş ve ırklarına göre sonuçların değerlendirilmesini amaçlamışlardır. Çalışmada subklinik mastitisli 271 adet meme lobu kullanılmıştır. % 8,12'si CMT (+), % 22,88'i CMT (++), ve % 69'u da CMT (+++) olarak sonuç vermiştir. SHS sonuçları ise sırasıyla CMT (+) olanlarda ortalama 313,001, CMT (++) olanlarda 559,007, CMT (+++) olanlarda ise ortalama 1,563,618 olarak bulmuşlardır. Mikrobiyolojik testler sonucunda ise en fazla üreyen mikroorganizma *S. aureus* olarak tespit edilmiştir [Rişvanlı ve Kalkan ,2002].

Keskin ve Akan (2002) tavuklardan izole edilen 46 koagülaz pozitif stafilokok suşunu, çeşitli biyokimyasal ve bazı antibiyotiklere duyarlılık özelliklerine göre identifiye ettiler. 46 suştan 28'i *S. aureus*, 9'u *S.delphini*, 3'ü *S. intermedius*, 2'si *S. aureus subssp. anaerobicus*, 1'i *S. schleiferi subssp. coagülans*, 1'i *S.hyicus* olarak saptanırken 2 stafilokok suşu identifiye edilemedi. Tavuklardan izole edilen stafilokokların farklı türler olabileceği ve suşların antibiyotiklere duyarlılıklarının değişebileceği. Ancak genel olarak düşünüldüğünde furazolidon, neomisin, sefuraksimin tedavi için düşünülebilecek önemli antibiyotikler olduğu kanısına varıldığını bildirdiler [Keskin ve Akan ,2002].

1998 yılında Fthenakis süten izole ettiği stafilokok türlerinin ve antibiyotik duyarlılıklarını incelediğinde; 172 izolatın 78'i *Staphylococcus aureus*, 62'si *S. chromogenes*, 34'ü *S. stimulans*, 37'si *S. epidermidis* ve 17'si *S. xylosus* olarak bulmuştur. 172 izolatın tümü cefoperazone, cefurosim, kloksasillin, enrofloksasin ve metisilin, 159'u clindamisin, 135'i tetrasiklin, 129'u neomisine, 125'i eritromisine, 109'u gentamisine ve 102'sinin de ampisilin ve penisilin-G' ye karşı hassas oldukları gözlenmiştir [Fthenakis, 1998].

Oliver ve arkadaşları (2004) sütlerdeki mastitise neden olan mikroorganizmaların türleri ile ilgili yaptıkları araştırmalarda; en çok görülen türlerin *Staphylococclara* ait sekiz tür olduğunu bunlardan daha çok yaygın olan üç türünü izole etmiştir. Bunlar *Staphylococcus aureus*, *S. chromogenes*, *S. hyicus*' tur [Oliver ve ark.,2004].

Wilson ve Gonzalez (1999) mastitise neden olan patojen bakterilere karşı 7 antibiyotik kullanarak bu antibiyotiklerin duyarlılık testlerini değerlendirdiler. Antibiyotik tedavisinde tüm patojen türlerin % 75'inde başarılı olmuşlardır. Mastitise neden olan olguların % 65'inde tam olarak başarı kazanamamışlardır. Aynı tür bakterilerin aynı antibiyotiğe karşı duyarlılıkları ve dirençlilikleri çok farklıdır. Tedavi edilemeyen türlerde antibiyotiklere karşı gösterilen hassasiyet %82 amoksisilin, %76 eritromisin, %73 kloksosilin ve %44'de pirilmisin'dir. Sephapirin, hetasillin, ve penisilinin tedavi edilemeyen vakalardaki etkilerinde bir farklılık yoktur. Çalışmada kullanılan antibiyotikler içerisinde tedavi en çok etkili olan amoksilindir. Diğer antibiyotiklerin mastitis etkeni bakteri türleri üzerindeki etkileri çok farklı değildir [Wilson ve Gonzalez ,1999].

Wats ve Yancey (1994) çeşitli hayvanlardan izole edilen mastitis kaynaklı patojen bakterilerin identifikasyonunu Api 20GP (BIOMERIEUX) kullanarak gerçekleştirmiş. *Staphylococcus* türlerinin identifikasyonunda sistemin %90.2'lik bir başarı gösterdiğini sadece *S.epidermidis* ve *S.hyicus*'da hassasiyet gösterdiğini belirlemişleridir. Bu durum kullanılan identifikasyonda kullanılan sistemdeki bilgi eksikliğinden kaynaklanmaktadır [Wats ve Yancey ,1994].

Yıldız (2002) subklinik ve klinik mastitisli ineklerde linkomisin-neomisin'in tedavideki etkinliğini belirlemek için süt örnekleri klinik ve bakteriyolojik muayeneden sonra belirlenen hasta meme loblarına 24 saat ara ile 3 gün meme içi yolla lincomisin-neomicin uygulandı. Tedavinin etkinliği uygulamadan 14 gün sonraki bakteriyolojik ve klinik iyileşmeye göre değerlendirildi. Doksan yedi subklinik mastitisli meme lobunda enfeksiyon etkenine göre tedavi etkinliği, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus spp.*, *Corynebacterium pyogenes* ve *Streptococcus*

agalactiae için sırasıyla % 81.4, 92.0, 73.3, 88.9, 66.7 ve 100.0 olarak belirlendi. On yedi klinik mastitisli inekte tedavi etkinliği *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus agalactiae* ve *Escherichia coli* için sırasıyla; klinik iyileşmeye göre %100.0, 100.0, 66.7, 100.0 ve 100.0; bakteriyolojik iyileşmeye göre % 66.7, 100.0, 66.7, 100.0 ve 100.0 oldu. Klinik ve subklinik vakalarda bakteriyolojik iyileşme sırasıyla % 82.4 ve %85.6 oranındaydı. Klinik olgularda klinik iyileşme oranı %94.1 oldu. Bu sonuçlar linkomisin-neomisin kombinasyonunun laktasyondaki mastitisli sütçü ineklerin tedavisinde uygun bir seçenek olduğunu göstermektedir [Yıldız, 2002].

Leotsinidis ve çalışma grubu (2005) yaptıkları çalışmada yunan bayanlarının sütü üzerine beslenme alışkanlıkları, sigara kullanımı ve yaşanan bölgenin etkisini incelemişlerdir. Bu amaçla bayanların sütündeki Zn, Fe, Mn, Cd, Pb ve Cu gibi metal seviyelerine bakılmıştır. Yunan bayanlarında 14 gün arayla alınan sütler Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresinde analiz edilmiştir. Sütler analiz edilmeden önce HNO₃ ile muamale edilmiştir. Sonuçta Zn $4905 \pm 1725 \mu\text{g l}^{-1}$, Fe $544 \pm 348 \mu\text{g l}^{-1}$, Mn $4.79 \pm 3.23 \mu\text{g l}^{-1}$, Cu $381 \pm 132 \mu\text{g l}^{-1}$, Cd $0.190 \pm 0.150 \mu\text{g l}^{-1}$, Pb $0.48 \pm 0.60 \mu\text{g l}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlarda dikkati çeken nokta kentsel bölgelerde yaşayan bayanlarda Zn miktarının yüksek olduğu, sigara kullanımının sütteki Cu seviyesini etkilediği olmuştur [Leotsinidis ve ark., 2005].

Vidoviç ve arkadaşları (2005) metal endüstrisinin yoğun olduğu bölgedeki toprak, buğday ve o bölgedeki ineklerden alınmış sütler içindeki Zn ve Cd seviyelerini incelemişlerdir. Sütler ayda sekiz kez inekler sağıldıktan hemen sonra alınmıştır. Toplanan süttten 5 gr alınarak yanıcaya kadar hot platte ısıtılmıştır. Daha sonra bu yanmış süt zerine 5 ml der HNO₃ ilave edilerek alevli atomik absorbsiyon spektrofotometresinde analiz edilmiştir. 3 yıl boyunca aynı bölgeden alınan süt numunelerindeki Zn ve Cd nin toprak-ineğin beslendiği ot-süt şeklinde besin çevrimi içinde süt içerisinde toplandığı görülmüştür. Ayrıca bulunan diğer önemli bir sonuçta metal üretiminin yapılmadığı dönemlerde süt içindeki Zn miktarı % 17 ve Cd % 13 daha az olduğu görülmüştür [Vidoviç ve ark.,2005].

Tripathi ve arkadaşları (1999) süt içindeki Zn ve Cu gibi gerekli metallerin yanı sıra Pb ve Cd gibi toksik metal miktarlarını incelemişlerdir. Analiz için toplanan süt numuneleri öncelikle suyu giderilmiş daha sonra ise % 25 HNO₃ ile muamele edilmiştir. Elde edilen analiz sonuçlarına göre Cu ve Zn gibi insan sağlığı için gerekli olan metallerin istenilen orandan daha az olduğu tespit edilmiştir [Tripathi ve ark.,1999].

Trombetta ve çalışma grubu (2004) İtalya'nın Calabria bölgesinde çiftliklerden alınmış süt numunelerindeki Cu, Zn, Cd, Pb, Cr ve Se miktarları araştırılmıştır. Bulunan değerlerden yola çıkılarak o bölge için çevresel risk olup olmadığı değerlendirmesi yapılmıştır [Trombetta ve ark.,2004].

3.MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Kocaeli ve çevre köyleri süt üretim merkezlerinden 2006 Aralık ve 2007 Mayıs ayları arasında toplam 125 süt numunesinden CMT yardımı ile 100 adet subklinik mastitisli çiğ süt numunesi tespit edildi. Sütler mikrobiyolojik çalışmalara uygun bir şekilde alındı.

Numune alma işleminde aseptik koşulların sağlanmasına dikkat edilmiştir. Numuneler için 121°C de 20 dakika süreyle otoklavda steril edilmiş ve mikrorganizmalardan arındırılmış 150 ml hacimli, kapaklı cam şişeler kullanıldı.

Toplanan süt numuneleri -20 °C'de dondurularak hazırlanmış buz kalıpları içeren taşıma kapları ile +4 °C'de (Soğuk Zincir) Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mikrobiyoloji Laboratuvarına getirildi ve vakit kaybedilmeden laboratuvara getirilen sütler üçe bölünerek ekimler, somatik hücre sayımı ve ağır metaller ölçülmesi için işlemlere alındı.

3.1.1. Örneklerin Toplanması

Örnekler alınmadan önce hayvanla ilgili ön bilgiler temin edildi. İlaç tedavisi uygulanan ineklerden numune alınmamasına dikkat edildi. Süt numuneleri steril eldiven kullanılarak sağma yöntemiyle steril tüplere toplandı. İlk aşamada meme başları % 70 alkolü pamukla silindi ve meme kanalındaki saprofit bakterilerin giderilmesi amacıyla iki-üç sıkımlık süt dışarı sağıldı. Sonra, her meme lobundan 8–10 ml miktarında alınan süt örnekleri plastik kapaklı steril cam tüplere konuldu.

3.2. Metod

3.2.1 CMT Testi

Alınan süt örneklerinin mastitis yönünden incelenmesi amacıyla, Schalm'ın (1971) CMT kullanım metodu referans alındı. Bu test, ayrıca bulunan NaOH ve anyonik deterjanın, mastitisli sütte bozukluğun derecesine göre memelere sızmış olan lokositlerin hücre zarını parçalayıp, lökositlerin DNA'ları ile birleşerek jelatin bir kitle oluşturması esasına dayanmaktadır [Schallm,1971].

Hazır olarak temin edilen CMT ayırıcının kullanıldığı testte, dört hazneli özel deney kabına, her meme lobundan yaklaşık 2–3 ml olacak şekilde süt örneği alındı ve her bir süt örneğinin üzerine yine aynı miktarda CMT ayırıcı ilave edildi. Dairesel hareketlerle iyice karıştırma suretiyle, 5–10 saniye arasında gerçekleşen reaksiyon gözlemlendi.

Pozitif olgularda, enfeksiyonun derecesine göre karışımın mukoid oluşum, jelleşme, jelin kıvamı ve hafif gri-mordan koyu menekşe rengine kadar değişen renk değişikliğine göre, ($\pm$), (+1), (+2) ve (+3) şeklinde değerlendirme yapıldı. Hiçbir değişiklik görülmeyen, hafif gri renkte ve sıvı olarak kalan karışım, negatif olarak değerlendirildi [Schallm,1971].

CMT testi süt alınımının olduğu yerde zaman kaybetmeden yapılır. Bu aşamadan sonraki mikrobiyolojik incelemeler laboratuvar ortamında gerçekleştirildi.

3.2.2. Örneklerin Analize Hazırlanması

Laboratuvara getirilen steril şişelerdeki süt numuneleri, vorteks yardımı ile karıştırılıp homejen bir hale getirilip, steril pipetlerle 1 ml alınarak içerisinde 9 ml steril peptonlu fizyolojik tuzlu çözeltisi bulunan kapaklı şişelere aktarıldı ve örneğin 10^{-1} 'lik seyreltmesi hazırlandı. Seyreltme işlemine devam edilerek 10^{-2} 'lik seyreltmeler elde edildi.

Seyreltmelerin yapıldığı steril cam tüpler ekimler yapılmadan önce yine vorteks yardımı ile karıştırılıp numeler homojenleştirilip ekime hazır bir duruma getirildi.

3.2.3 Genel Uygulamalar

Seyreltmeleri hazırlanan süt örneklerinin öncelikle genel besiyerleri olan Nutrient ve Kanlı agarlara ekimleri yapıldı. Daha sonra ekilen numuneler etüvde 24 – 48 saat ve 37 °C'de inkübasyona alındı. Bu süre içerisinde 24 ve 48 saatteki koloni gelişimleri incelendi. 48 saatlik inkübasyon süresinden sonra koloniler değerlendirilmeye alındı.

İnkübasyon sonunda yapılan kontrollerde oluşan kolonilerin koloni morfolojilerine, yapılarına, renklerine, şekillerine ve hemoliz oluşturup oluşturmadığına bakılıp değerlendirme yapıldı. Üreyen kolonilerden, büyük, beyaz renkli, S tipli ve genellikle hemolitik olanlar aradığımız koloniler olarak kabul edilip, subkültürleri yapıldı.

Koloniler saflaştırıldıktan sonra elde edilen kolonilerin Gram boyamaları yapıldı. Boyanan preparatlar mikroskopta incelenerek mikroorganizmaların şekillerine (kok, basil, viroid) ve gram özelliklerine bakıldı.

Burada uygun özellikleri tespit edilenlere yani Gram (+) kok olanlara katalaz testi uygulandı.

3.2.4 Laboratuvar Testleri

3.2.4.1. Katalaz Ayıracı

% 3'lük hidrojen peroksit hazırlandı. Lam üzerine 1 damla hazırlanan hidrojen peroksitten damlatıldı. İzolasyonu yapılan kültürlerden şüpheli koloniler hidrojen ile süspanse edildi.

Gaz kabarcıklarının oluşumu pozitif, kabarcıkların oluşmaması negatif olarak değerlendirildi. Gerek katalaz uygulaması gerek gram boyama uygulamalarında Nutrient agardaki örnekler kullanıldı [Mikrobiyoloji org.].

3.2.4.2 Hemoliz Deneyi

İzole edilen Stafilokokların kültürlerinin % 8–10 defibrine koyun kanı katılmış kanlı agara ekimi yapıldı ve 37 °C'ta 18–24 saat inkübe edilerek hemoliz oluşumu incelendi [Mikrobiyoloji org].

3.2.4.3 Gram Boyama Yöntemi

Bu boyama yöntemi ile bakteriler iki büyük ve temel grup olarak tanımlanırlar: Gram (-) ve Gram (+) bakteriler. Gram (-) bakteriler Gram boyama yönteminde kullanılan iki farklı boyadan ilkinin (Jansiyen moru veya kristal viyole) preparatın alkolle muamelesi sonucunda vererek renksizleşir ve ikinci boya (fuksin veya safranin) ile boyanarak pembe (viyole kırmızı) rengini alır.

Gram (+) ise ilk boya olan Jansiyan morunu (ve/veya kristal viyole) alkolle muamelede renk vermeyip kristal viyoleyi tutarak mor renk alırlar.

3.2.4.3.1 Gram Boyalarının Hazırlanması [Mikrobiyoloji org]

Fuksin Boyası;

Stok solüsyon

Bazik fuksin	3 gr
Alkol (%95)	100 ml

Bazik fuksin havanda alkolle ezilip eritildikten sonra bir şişe içerisinde 5 saat çalkalanır ve 24 saat bekletildikten sonra filtre kağıdından süzülür koyu renkli şişelerde saklanır [Mikrobiyoloji org].

Sulu Fuksin Solüsyonu

Bazik füksin (Stok)	10 ml
Distile su	100 ml

Fuksin distile su ile iyice karıştırılır ve filtre kağıdından süzülür [Mikrobiyoloji org].

Kristal-viyole boyası;

Stok solüsyon

Kristal-viyole	5 gr
Etil alkol % 95' lik	100 ml

Kristal-viyole solüsyonu:

Kristal-viyole (stok)	10 ml
Distile su	100 ml

Boya tartılır, içine alkol ilave edilir. Boyanın alkolde iyice çözünmesi sağlanır [Mikrobiyoloji org].

Lugol solüsyonu;

I ₂	1 gr
KI	2 gr
Damıtık su	300 ml

Potasyum iyodür ve iyot kristalleri bir havan içinde öğütülür, üzerine bir miktar damıtık su ilave edilir. Kristaller damıtık su içinde tamamıyla çözüldükten sonra solüsyon elde edilir. Koyu renkli bir cam şişe içine dökülen solüsyon üzerine bir miktar damıtık su eklendikten sonra (son konsantrasyonun 300 ml olması istenir) çalkalanır [Mikrobiyoloji org].

3.2.4.3.2. Gram Boyama İşlemi [Mikrobiyoloji org]

1. Kullanmadan önce ve kullandıktan sonra öze bek alevinde kızıl duruma gelinceye dek ısıtılır. Petrilerin kapağını açmadan önce ve kapatırken petrilerin ağzı alevden geçirilerek bir öze dolusu kültür örneği alınıp lam üzerine damlatılan serum fizyolojik ile iyice süspanse edilip homojen hale getirilir ve lamın üzerine yayılır, kuruması beklenir.

2. Hazırlanan preparatta boyaması gerçekleştirilecek koloni örneği üste gelmek üzere preparat bek alevinden 3 kere geçirilip tespit edilir [Güngör ve Balcı, 1995].

3. Lam üzerindeki örneğin üzerine gelecek ve örneği örtecek şekilde Sulu Fuksin dökülür, bir dakika beklenir.

4. Bekleme süresi tamamlandıktan sonra boya dökülerek preparat çeşme suyu ile yıkanır.

5. Örnek üzerine lugol eriyiği (iyodin solüsyonu) dökülerek bir dakika bekletilir.
6. Lugol dökülür ve preparat önce su, sonra alkolle (% 96) mor boya akmayana kadar yıkanır.
7. Renk giderme işleminden sonra preparatın üzerine sulu fuksin koyarak 30–60 saniye kadar bekletilir.
8. Boya dökülerek preparat çeşme suyu ile yıkanır ve kurutma kağıdı ile kurutulur.

Boyama işlemlerinden sonra, preparatlar iyice kurutulur, kurutulduktan sonra mikroskopta immersiyon yağı ile 100X objektifte incelenmeye alınıp Gram karakterleri yönünden belirleme yapıldı.

3.2.4.3.3 Koagülaz [Mikrobiyoloji org]

Baird-Parker agar besiyerinde görülen etrafı berrak zonlu siyah koloniler koagülaz testi için stafilokokların şüpheli türlerinin doğruluğunu kanıtıdır. Koagülaz testi taze kültürle yapılır. Üremeden sonra incelenen uygun koloni morfolojileri, gram (+) ve katalaz (+) özelliğine sahip kolonilerin Baird-Parker agar' a ekimi yapıldı. 37 °C de 18 – 24 saat inkübasyona alındı ve oluşan koloniler ve renklenmeler gözlemlendi.

Çalışmada Baird-Parker Agar olarak Biomerieux firmasının REF 44 003 nolu ürünü kullanıldı.

3.2.4.3.4 Api (Analytic Profile Index) [Murray, 2003]

Çalışmamızda yaptığımız identifikasyon işlemlerine rağmen identifikasyonu tam olarak yapılamayan stafilokok suşlarının türünün belirlenmesini API Staph sistemi ile gerçekleştirdik. API Staph sistemi tür tayini yaparken, stafilokok suşlarının çok

sayıda test gerçekleştirme olanağı ve okuyucu makinesiyle de değerlendirme kolaylığı sağlamaktadır. Bu çalışmada ID 32 Staph API sisteminden (Biomérieux, France) yararlanıldı.

API Staph, dehydrate test maddeleri içeren 20 mikrotüp içeren bir tetst stripinden oluşur. Bu mikrotüplere, testleri sulandıran, API Staph medyumunu ile hazırlanmış bir bakteri süspansiyonu ile ekim yapılır. İnkübasyon sırasında, metabolizma kendiliğinden veya ilave testlerle açıklanan renk değişiklikleri meydana getirir. Bu reaksiyonlar okuma tablosuna göre okunur ve Analitik Profil İndeksi ya da bilgisayar tanımlama programı kullanarak tanımlama elde edilir.

Tür tayini yapılamamış stafilokok suşlarının Mc Farland ayarı 0.5'e ayarlandı. Mc Farland (yoğunluk) ayarı yapılırken, bakteri API sisteminin özel solusyonlarında süspanse edildi.

Daha sonra API panellerinin her kuyucuğuna bu süspansiyondan 55 µl ilave edildi. 24 h etüvde inkübasyondan sonra, kuyucuklarında bakteri süspansiyonunun taşıyan API panellerinin 3 kuyucuğuna NIT, PAL ve VP' ye sırasıyla, Nitrit 1 ve Nitrit 2, ZYMA+ZYMB ve VP 1+ VP2 ayraçları damlatıldı. 5-10 dakika bekletildikten sonra API sisteminde (bio- Mérieux, Seri no: IN S001719, France) okutuldu. Bakterinin türü tespit edildi.

3.2.4.3.5. Antibiyotik Duyarlılıklarının Araştırılması [Mikrobiyoloji org]

Türü tanımlanan stafilokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) standartlarına uygun olarak disk agar difüzyon yöntemi ile belirlendi.

Antibiyogramı yapılacak kültür örnekleri öze ile steril tüpler içine konulmuş steril distile su içine aktarılır. Homojen bir süspansiyon elde edildikten sonra Muller-Hilton agar'a steril swap ile yayılır. Antibiyogram diskleri Muller-Hilton agar'a dikkatlice yerleştirilir ve 24 saat 37°C'da inkübasyona alınır. İnkübasyon sonucunda antibiyotik

disklerinin etrafında oluşan zonların çaplarına göre antibiyotiklere karşı gösterilen dirençlilik ve hassasiyet durumları tespit edildi.

Çalışmada, vankomisin, sefotaksim, gentamisin, azlosilin, siprofloksasin, eritromisin, tetrasiklin, ampicillin + sulbaktam, trimetoprim sülfametaksazol ve amoksisilin + klavulanik asit antibiyotik diskleri (Oxoid) kullanılmıştır. Antibiyotik diskler, + 4 °C’ta saklanmıştır.

3.2.4.3.6 Toksin Tiplerinin Belirlenmesi [Crass, 1986]

S. aureus’ların toksin üretilip üretilmediğine, üretiliyorsa hangi tip toksin ürettiklerini inceledik. Bu amaçla Oxoid firmasının ürettiği SET-RPLA (TD-900) set kiti kullandık.

SET-RPLA test pek çok gıdada ve kültür filtratlarındaki *S. aureus* izolatlarında enterotoksin varlığını saptamak için kullanılan bir yöntemdir. Testin duyarlılığı 0.5 ng/ml’ dir. Polistren lateks partikülleri saflaştırılmış A, B, C ve D tipi stafilokok enterotoksinleri ile immunize edilmiş tavşanlardan elde edilen saflaştırılmış antiserumla duyarlı hale getirilmiştir. Bu lateks partikülleri enterotoksinlerin varlığında aglütinasyon oluşturur. Kontrol reaktifi ise immunize edilmeyen tavşan globulinleri ile duyarlı hale getirilmiş lateks partikülleri içerir. Kitin içinde bulunan seyreltim sıvısı, gıda matriksi bileşenleri ile oluşabilecek spesifik olmayan reaksiyonların görülme sıklığını azaltan sodyum hekzamatafosfat içermektedir.

Deneylerde ilk olarak izole edilen bakteriler içinde 10 ml Brain-Heart Infusion sıvı besiyeri bulunan tüplerde 37 °C’ta 24 saat çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. Gelişme gözlemlendikten sonra tüpler 3000 devir/dakika’da 30 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı alınır ve toksin analizlerinde kullanıldı. Test beş kuyucuklu mikrotitre plaklarında gerçekleştirilir. Kültür filtratlarının seyreltimleri, kuyucukların beş sırası kullanılarak yapılır, uygun hacimde lateks süspansiyonu her bir kuyucuğa ilave edilir ve karıştırılır. Stafilokok enterotoksinlerinden biri mevcutsa aglütinasyon oluşur, kuyucuğun tabanında yayılmış bulanık bir tabaka şeklinde görülür. Stafilokok enterotoksinleri yok ise veya

konsantrasyonu testin saptama limitinden daha düşükse, aglutinasyon oluşmaz, sıkı yapılı düğme görünümünde bir yapı gözlenir.

Test sonucunun pozitif olması durumunda oluşan pozitif konsantrasyon yoğunluğuna göre +1 den +3' e kadar değerler kullanılarak toksin şiddeti belirlenir.

3.2.4.3.7 Somatik Hücre Sayımı [TSI ISO 13366–1]

Standart analiz yöntemi basit, ucuz, hızlı ve kolay olması açısından mikroskopik yöntemdir. Mikroskopik sayımın prensibi, çiğ sütlerde mikroskopik yöntemle bakteri sayım yöntemi olan Breed yöntemine çok benzemek üzere, çekirdeği metilen mavisi ile belirgin bir şekilde boyanabilen lökositler ve epitel hücreler gibi somatik hücrelerin sayım işlemidir. Bu yöntemde de 0,01 ml (10 µl) çiğ süt örneğinde boyama sonrasında mikroskopik sayım yapılır, buradan elde edilen sayım sonucundan formül yardımı ile 1 ml çiğ sütteki somatik hücre sayısı hesaplanır.

Milimetrik kâğıttan 5 x 20 mm olacak şekilde bir şerit kesilir, milimetrik kısım şablon olarak kullanılacak bir lama alttan yapıştırılır. Bu şekilde boyama yapılacak lam şablon lam üzerine konulduğunda 5 x 20 mm boyama alanı belirgin bir şekilde görülür. Somatik hücre sayımında her örnekten 2 sayım yapılması esastır. Buna göre aynı lam üzerine 2 örnek alınması boyamada ve lamaların saklanması kolaylık sağlar. Dolayısı ile şablon lam hazırlanırken 2 şerit yapıştırılması uygun olur.

Süt örneği en fazla 6 saat içinde analiz edilmelidir. Sütün depolanması zorunlu ise mutlaka buzdolabı sıcaklığında depolanmalı ancak asla dondurulmamalıdır. Analize başlanılacağı zaman süt örneği su banyosunda hızla oda sıcaklığına getirilir. Lamalar etil alkol ile temizlenip tozsuz kağıt ile kurutulur ve tozsuz bir yerde saklanır. Mikro pipet ile 10 µl süt örneği alınır, şablon lam kullanılarak deney lamının üzerine 5 x 20 mm alana yayılır. Yayılan sütün kuruması 37°C'ta etüvde gerçekleştirildi. Kuruma tamamlandıktan sonra hazırlanmış olduğumuz lami boya küvetinin içine koyup 10 dakika beklettik. Boyama işlemi bittikten sonra boyanan lam yine 37°C'ta kurutulmak için etüve koyduk, kuruma işlemi tamamlandıktan sonra hazırlanmış olan lam içinde distile

su bulunan beher içine konup üstündeki fazla boyadan arındırılıp, filtre kağıdını üzerine konup kurumaya bırakıldı.

Sayım işleminde mikroskop görüş alanını kullanarak, boyanarak hazırlanan boyalı şeridin uzun kenarı üzerinde 1- 1.5 görüş sahası kaydırma ile diğer uca ulaşana kadar bu işleme devam edildi.

1 ml ' deki somatik hücre sayısı = A x ÇF formülü ile hesaplanır.

A: Farklı alanlarda yapıla somatik hücre sayısı ortalaması,

ÇF (Çalışma Faktörü): Objektif mikrometre kullanılarak hesaplanan mikroskop faktörü ile 10 µl deki sayıyı 1 ml' çevirmek için kullanılan sabit sayıdır.

Bu uygulamada TSI ISO 13366–1 standartında belirtilen yöntem kullanılmıştır.

3.2.4.3.8 Ağır Metal İyonlarının Tayini [Bermejo, 1995]

Laboratuvara getirilen süt örneklerinden 5 ml. alınıp üzerlerine 2,5 ml %65 HNO₃ ile 0,5 ml H₂O₂ ilave edilip saydam bir görünüm alana kadar bekletildi daha sonra 15 dakika mikrodalgada yakıldı. Digesyon olan bu örnekler miktar olarak 10,0 ± 0,1 ml volumetrik polipropilen tüplere aktarılmış ve son hacim % 65 HNO₃ eklenerek 3,0 ml'ye ayarlanmıştır. Daha sonra otomatik olarak grafit fırınlı atomik spektrosuna enjekte edilmiştir.

3.2.4.3.9 EK.1. (ÇALIŞMADA KULLANILAN BOYA, BESİYERLERİ ve KULLANILAN YÖNTEMLER)

A. KOYUN KANLI AGAR: Çalışmada ek-bak firmasından aldığımız koyun-kanlı besiyerini kullandık. Besiyeri içeriği; Kalp ekstresi 10 g/l, triptoz 10 g/l, sodyum klorür 5 g/l, agar agar 15 g/l, koyun kanı 50 ml.

B. NÜTRİENT AGAR: İçeriği peptone from meat 5,0 g/l; Meat extract 3,0 g/l; Agar-agar 12,0 g/l

Hazırlanışı: Toz besiyeri 20,0 g/l olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilip, otoklavda 121° C'da 15 dakika sterilize edilir ve 45-50°C'a soğutulup steril petri kutularına 12,5'er ml dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı kahve renkte olup, 25 °C' da pH' sı 7,0±0,2'dir.

C.MÜLLER-HİNTON AGAR: İçeriği: meat infusion 2,0 g/l; Casein hydrolysate 17,5 g/l; Starch 1,5g/l; Agar-agar 13,0g/l.

Hazırlanışı: Müller-Hilton Agar distile suda eritilmiş, pH 7.4'e ayarlanarak otoklavda steril edildi. Besiyerleri 9 mm çapındaki steril petrilere 4 mm derinlik olacak şekilde dökülmüş ve kontaminasyon kontrolü yapılmıştır.

D. BAIRD-PARKER AGAR:

Çalışmada Biomerieux firmasına ait REF 44 003 nolu Baird-Parker agar ve ekipmanları kullanıldı. Çalışma ekipmanları R1 ve R2 reaktiflerden oluşmaktadır. R1 ve R2 içerikleri aşağıdaki gibidir.

R1 Reaktifi:

Meat peptone (bovine/porcine)	15 mg
Yeast extract	1 mg
Lithium chloride	5 mg
Sodium pyruvate	10 mg
Glycine	12 mg
Agar	12.5 mg

R2 Reaktifi:

Bovine fibrinogen	3.75
Rabbit plasma	25 ml
Trypsin inhibitor	25 mg
Potassium tellurite	25 mg
pH 7.6	

R1 reaktif şişesinin ağzını gevşetip, dikkatli bir şekilde sıcak su banyosunda tam olarak 45 dakika kaynamış su sıcaklığında bekletildi. Besi yeri eriyik bir hal alınca şişenin kapağını kapatıp, şişe dikkatli bir şekilde çalkalandı. Şişe oda sıcaklığına alınmadan önce 15 dakika 47°C'ta kontrollü bir şekilde bekletildi, R2 deki reaktif 10 ml. steril distile su ile iyice çözülür ve bir müddet 37°C'ta bekletildi. Daha sonra R2 çözülmüş koagülaz çözeltisi, R2 deki agarın içine aktarıldı ve iyice karıştırılıp homojen hale getirildi. Daha sonra steril petrilere aktarıldı, kontaminasyon kontrolü yapıldıktan sonra kullanıldı.

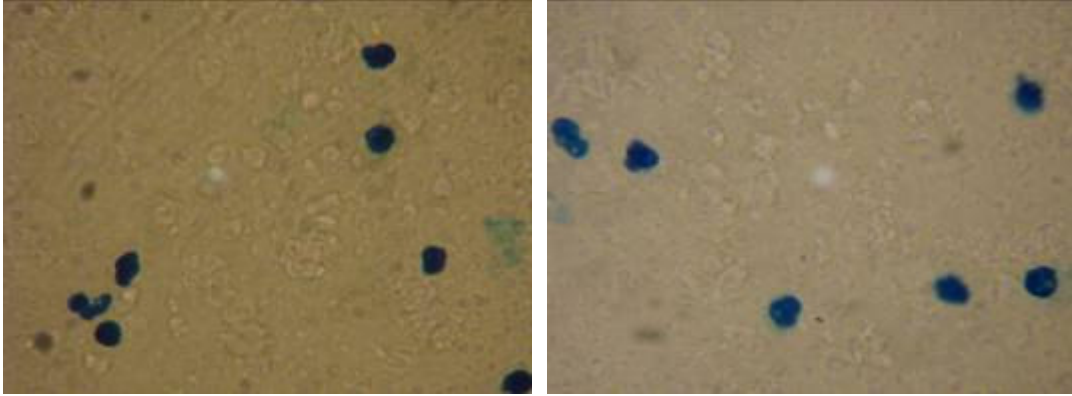


Resim 3.1.Baird-Parker Agar hazırlama reaktifleri.

E. SOMATİK HÜCRELERİN BOYANMASI

Boya çözeltisi metilen mavisi 0,6 g; %96'lık etil alkol 54 ml; 1, 1, 1-trichloroethane 40 ml; glacial asetik asit 6 ml bileşimindedir. Boyanın hazırlanış şekli önemlidir. Ağzı kapaklı bir şişede etil alkol içinde 1, 1, 1-trichloroethane karıştırılır, su banyosunda 65°C'ta ısıtılıp, metilen mavisi ilave edildikten sonra iyice karıştırılır ve buzdolabı sıcaklığına soğutulup 12 – 24 saat bu sıcaklıkta bekletilir. Daha sonra asetik asit ilave edilip kaba olmayan bir filitre kâğıdından (Whatman ya da eşdeğeri) süzülür. Ağzı kapaklı şişede saklanır. Zamanla boya çözeltisinde partiküller ve/veya sediment görülürse tekrar filtre edilip kullanılabilir. 1, 1, 1 trichlorethane yerine aynı miktarda tetrachloroethane da kullanılabilir.

Ancak tetrachloroethane'nın zehirli bir bileşik olduğu bu kimyasal kullanılacak ise mutlaka eker ocak ile çalışılması gerektiği unutulmamalıdır. ISO tarafından verilen boya hazırlama yönteminde asetik asit ilavesinden önce buzdolabı sıcaklığında 12–24 saat bekletilmeye deyiniilmemektedir.



Resim 3.2. Metilen mavisi ile boyanan somatik hücrelerinin mikroskop altındaki görünümü.

F. API

API Staph Besiyeri(6 ml.)	
Maya Ekstresi	0,5 gr
Bastopepton(İnek/domuz orijin)	10 gr
NaCl	5 gr
Eser elementler	10 ml
Demineralize su	qsp1000 ml

Reaktifler	: Referanslar
Mineral yağ	:(Ref. 70 100)
Reaktifler	: VP 1 + VP 2 (Ref. 70 422)
NIT 1 + NIT 2	:(Ref. 70 442)
ZYM A	:(Ref. 70 494)
ZYM B	:(Ref. 70 493)
McFarlanda Standard	:(Ref. 70 900)

API Staph Analitik Profil İndeksi (Ref. 20 590) veya apiweb TM tanımlama yazılımı

NUMUNELER (ALMA VE HAZIRLAMA):

API Staph direkt klinik veya diğer numunelerle kullanılmaz. Tanımlanacak mikroorganizmalar önce besiyerinde mikrobiyolojik tekniklere uygun olarak izole edilmelidir.

Api Stribin hazırlanması

- İnkübasyon kutusunu (tepsi ve kapak) hazırlayıp ve tepsi kuyularında nemli atmosfer yaratmak için tepsi kuyucuklarına 5 ml civarında distile su veya demineralize su ekledik,

Ekimin hazırlanması

- Kanlı agarda 18–24 saat süreyle 36°C±2°C'ta organizmanın alt kültürünü hazırladık,
- Suşun *Micrococcaceae* ailesine ait olduğunu kontrol edilir (Morfoloji, Gram yayma, katalaz vs.) ve aynı zamanda kullanılacak kültürün de saf olması esastır,
- API Staph medium ampulünü açıp,

- 0.5 McFarland'a eşdeğer bir yoğunluk ile homojen bir bakteriyel kültür hazırlayıp. Genç kültürler kullanılması gerekir. (18–24 saat eski) Süspansiyon hazırlandıktan hemen sonra kullanılmalıdır.
- Api sribindeki küçük dehidre besiyerleri bir tepecik oluşturmak üzere mineral yağ ile doldurarak ADH ve URE testlerinde anaerobik ortamı oluşturuldu,
- 18–24 saat süreyle $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ta inkübe edildi,

API STRİBİNİ OKUMA VE DEĞERLENDİRME

Stribin okunması

- İnkübasyon süresinden sonra, aşağıdaki reaktiflerin her birinden 1 damla ekleyerek reaksiyonları gelişimini gözlemleyip ve okuma tablosuna başvurarak bütün reaksiyonları okuduk,
 - VP testi: VP 1 ve VP 2 Reaktifleri. 10 dakika bekleyip Mor-pembe renk pozitif bir reaksiyonu gözlendi, 10 dakika sonra açık pembe veya açık pembe renk negatif olarak değerlendirildi..
 - NIT testi: NIT 1 ve NIT 2 reaktifleri. 10 dakika bekleyip Kırmızı renk pozitif bir reaksiyonu gösterir.
 - PAL testi: ZYM A ve ZYM B reaktifleri. 10 dakika bekleyip Mor renk pozitif bir reaksiyonu gözlendi
 - Sonuç kağıdına sonuçları kaydettik

Değerlendirme

Tanımlama sayısal profil ile elde edilir.

- Sayısal profil saptanması: Sonuç şemasında testler 3 gruba ayrılmıştır ve her biri için 1. 2 ya da 4 sayıları verilmiştir. Her grup içindeki pozitif reaksiyonlara uyarı sayıları ekleyerek, 7 rakamlı bir profil numarası elde edilir.
- Tanımlama: Veritabanı (V4.1) kullanılarak yapılır.
 - İdentifikasyon yazılımı kullanılarak:
 - 7 rakamlı numara profilinin manuel olarak yazıldığı bir bilgisayar tanımlama programı kullanılarak değerlendirme yapıldı.

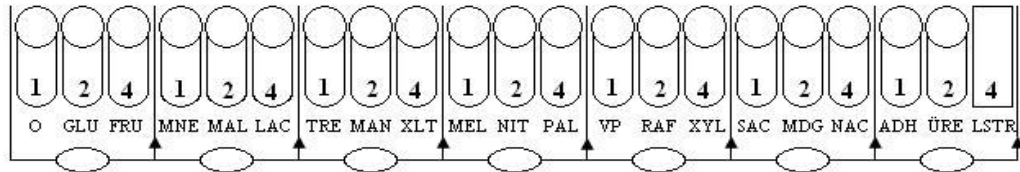
Çizelge 3.1 Api Değerlendirme Paneli

TESTLER	AKTİF İÇERİKLER	MİKTAR besiyerindeki miktarları	REAKSİYONLAR/ ENZİMLER	SONUÇ	
				NEGATİF	POZİTİF
0	Substrat yok		Negatif kontrol	Kırmızı	-
GLU	D-glukoz	1.56	(Pozitif kontrol) (D-GLUcose)	Kırmızı	Sarı
FRU	D-fruktoz	1.4	asidifikasyon (D-FRUctose)		
MNE	D-mannoz	1.4	asiditifikasyon (D-ManNosE)		
MAL	D-maltoz	1.4	asiditifikasyon (MALtose)		
LAC	D-laktoz (İnek orjinli)	1.4	asiditifikasyon (LACtose)		
	D-trehaloz				
TRE	D-Mannitol	1.32	asiditifikasyon (D-TREhalose)		
MAN	XyLİTOL	1.36	asiditifikasyon (D-MANnitol)		
XLT	d-Meliboz	1.4	asiditifikasyon (xYLİtOL)		
MEL		1.32	asiditifikasyon (D-MELibiose)		
NIT	Potasyum nitrat	0.08	NITratların nitritlere indirgenmesi	NIT 1 +NIT 2/10 dak.	
				renksiz-açık pembe	kırmızı
PAL	β-naftil fosfat	0.0244	Alkaline Phosphatase	ZYM A +ZLK S / 10 dak.	
				renksiz-açık pembe	Mor-pembe
VP	Sodyum piruvat	1.904	Aceyl-methyl-carbinol production (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2/ 10 dak.	
				Renksiz-açık pembe	Mor-pembe
RAF	D-raffinoz	1.56	Asidifikasyon (RAFinose)	Kırmızı	Sarı
XYL	D-ksiloz	1.4	Asidifikasyon (XYLose)		
SAC	D-sakkaroz (sukroz)	1.32	Asidifikasyon (SACcharose)		
MDG	Methyl-αD-glukopiranosid	1.28	asidifikasyon (Methyl-αD-Glucopyranoside)		
NAG	N-acetyl-glukozamin	1,28	asidifikasyon (N-Acetyl-glucosamine)		
ADH	Larginin	1.904	Arginine DiHydrolase	Sarı	Turuncu-kırmızı
URE	Üre	0.76	UREase	Sarı	Kırmızı

Asidifikasyon testleri negatif kontrol (0) ve pozitif (GLU) kontrolle karşılaştırılmalıdır.



Resim 3.3. İnkübasyon sonucu api staph stripi renklenmeler gözlenmektedir



Resim 3.4 Api Staph Değerlendirme şeması görülmektedir.

F. TOKSİN BELİRLEME REAKTİFLERİ:

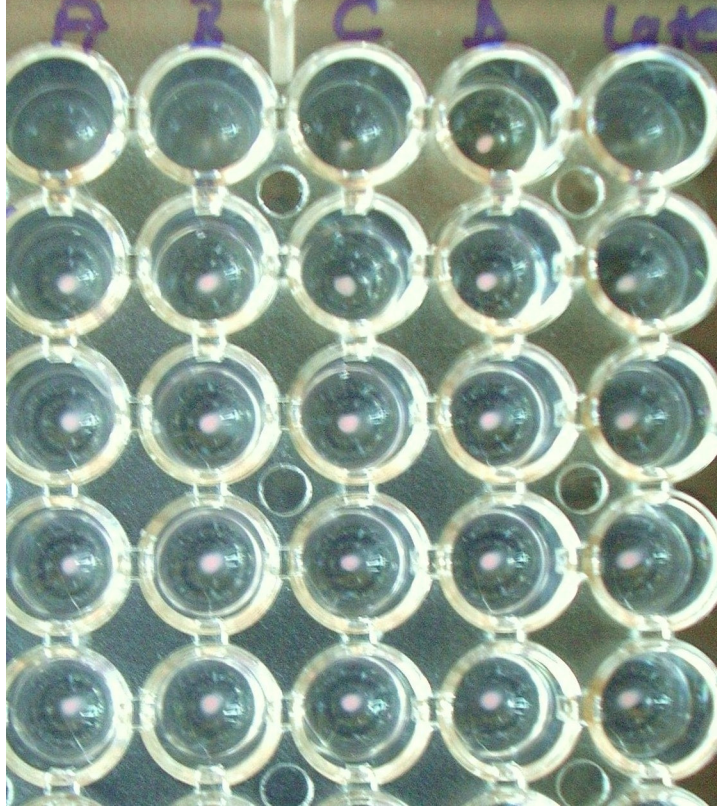


Resim 3.5. Set Rpla Toksin Kitleri

İnceleme yapılacak mikroorganizma tryptone soya broth içine aktarılıp, 37°C’de 18–24 saat ünkübasyona alınır, bu sırada numune karıştırıcı üzerinde bulundurulmalıdır. İnkübasyondan sonra örnekler steril tüplere aktarılıp 3000 rpm’de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı test için kullanıma hazırdır. Test kiti içerisinde her *Staphylococcus* toksinine ayrı olacak şekilde hazırlanmış lateks taneciklerine tutturulmuş toksin antijenleri mevcuttur ve bu antijenlerin çalışma güvenilirliğini görmek amacıyla kontrol toksinleride mevcuttur.

Mirolak test kuyucuklarına her bakteri için 1 den 5’e kadar numaralar verilir daha sonra kuyucuklara 25 µl dilüent çözeltisinden eklendi. Üzerlerine hazırladığımız örneklerden 25’er µl ekleyip, pipet yardımı ile homojen bir karışım elde edilip üzerlerine her toksine göre hazırlanmış, antijenlerden ekledik. Beşinci kuyucuklar kontrol kuyucuklarıdır bu kuyucuğa kontrol reaktifinden eklenir. Aglütünasyon gerçekleşirken buharlaşmayı önlemek için mikrolept’in üzeri silikon band ile kapatılıp, oda sıcaklığında 20 – 24 saat beklemeye alındı.

Test sonuçları mikrolept kuyucuklarının dibinde oluşan reaksiyonlara göre negatif, (+), (++) , (+++) pozitif olarak değerlendirme yapıldı.



Resim 3.6. Aglitünasyon sonucu mikropleyt kuyucukları görülmektedir.

Resimde negatif oluşum sonucu kuyucukların dibinde düğme yapısı görülmektedir.

5. BULGULAR

Çalışmamıza başlamadan önce Gebze İlçe Tarım Müdürlüğünden Kocaeli bölgesindeki önemli süt üretim merkezleri hakkında bilgi aldık ve süt toplama merkezleri olarak gidilecek yerleri belirledik.

Çalışmamızda 125 süt örneği ile çalıştık ve CMT testi yardımı ile bu numunelerden 100 adet subklinik mastitisli süt örneğini belirleyerek mikrobiyolojik çalışmalarımızı bu 100 numune ile devam ettik. Getirilen süt örneklerini üçe bölerek mikrobiyolojik inceleme, somatik hücre sayımı ve ağır metal iyonlarının belirlenmesi için ayrı ayrı işleme aldık.

Sütleri aldığımız anda yaptığımız CMT testi ile laboratuvarda yapılan Somatik Hücre Sayım sonuçları çizelge 4.1 de belirtilmiştir. Yaptığımız çalışmada süt numunelerine 1' den 100' e kadar numara verip bu numaralara göre işleme aldık.

CMT testlerinde değerlendirmemiz negatif (+), (++) ile (+++) arasında değişmektedir.

Çizelge 4.1. Sütlerin CMT test sonuçları ve SHS görülmektedir

Numune Kodu	Tarım Bakanlığı Kayıt No	CMT Sonucu	SHS Değeri
S-1	41100561	+++	1.850.940
S-2	568	++	449.514
S-3	1476	+++	1.498.380
S-4	562	+++	1.410.240
S-5	15075	+++	2.027.220
S-6	15073	+	264.420
S-7	5053	+	352.560
S-8	2292	+	374.595
S-9	1667	+++	1.366.170
S-10	1496	+	308.490
S-11	15061	+++	1.674.660
S-12	2445	++	528.840
S-13	2247	+++	1.454.310
S-14	1657	++	616.980
S-15	14309	+++	1.586.520
S-16	4455	++	550.875
S-17	5157	+++	1.652.625
S-18	15132	+++	1.520.415
S-19	13579	+++	1.630.590
S-20	2431	++	549.352
S-21	2422	+	334.932
S-22	2427	++	616.980
S-23	15150	+	337.654
S-24	1482	+	311.607
S-25	3051	+++	1.575.987
S-26	1485	+++	1.394.880
S-27	2430	+	322.556
S-28	15105	+++	1.326.437
S-29	2894	++	512.265
S-30	11168	+	254.134
S-31	15198	+++	1.926.342
S-32	1492	++	684.714

Numune Kodu	Tarım Bakanlığı Kayıt No	CMT Sonucu	SHS Değeri
S-33	562	+++	1.367.218
S-34	561	+++	1.504.706
S-35	2302	+++	1.718.730
S-36	14703	+++	1.817.888
S-37	14704	+	379.002
S-38	568	++	790.803
S-39	569	+	363.814
S-40	4345	+++	1.050.116
S-41	15073	+	314.296
S-42	553	+	303.154
S-43	558	++	632.911
S-44	Kargalı-1	+++	1.233.960
S-45	512	+++	1.278.030
S-46	511	++	669.864
S-47	15698	+	396.630
S-48	15709	++	793.260
S-49	1152	+++	1.510.240
S-50	509	+	370.188
S-51	478	+++	1.396.630
S-52	479	+++	1.145.820
S-53	480	++	639.015
S-54	9034	++	652.236
S-55	534	++	687.492
S-56	481	+	361.374
S-57	15768	++	740.376
S-58	3365	+++	925.470
S-59	9228	+	319.507
S-60	40228	+++	1.339.728
S-61	B.bağı-1	++	713.934
S-62	B.bağı-2	++	564.096
S-63	B.bağı-3	+++	1.343.746
S-64	B.bağı-4	+++	1.387.816

Laboratuvara getirdiğimiz süt numunelerinden 100 şüpheli koloniye izolasyonu (Gram boyama, katalaz, koagülaz ve hemoliz kontrolü) yapıldı. Test sonuçları Çizelge 4.2’ de belirtilmiştir. Gram boyama ve Katalaz işlemleri tüm kolonilere yapılmıştır. Koagülaz işlemi ise Gram (+) ve Katalaz (+) kolonilere uygulanmıştır. Hemoliz kontrolü *S. aureus*, *S. epidermidis* suşlarına yapıldı.

Çizelge 4.2 Gram Boyama, Katalaz, Koagülaz, Hemoliz Deney Sonuçları

Kod	Gram boyama	Katalaz	Koagülaz	Hemoliz	Kod	Gram boyama	Katalaz	Koagülaz	Hemoliz
S-1	(+) kok	+	+		S-51	(+) kok	+	+	+
S-2	(+) kok	+	+		S-52	(+) kok	+	+	+
S-3	(+) kok	+	+		S-53	(+) kok	+	+	
S-4	(+) kok	+	+		S-54	(+) kok	+	+	
S-5	(+) kok	+	+		S-55	(+) kok	+	+	
S-6	(+) kok	+	+		S-56	(+) kok	+	+	
S-7	(+) kok	+	+		S-57	(+) kok	+	+	-
S-8	(+) kok	+	+		S-58	(+) kok	+	+	+
S-9	(+) kok	+	+	+	S-59	(+) kok	+	+	
S-10	(+) kok	+	+		S-60	(+) kok	+	+	
S-11	(+) kok	+	+	+	S-61	(+) kok	+	+	
S-12	(+) kok	+	+		S-62	(+) kok	+	+	
S-13	(+) kok	+	+		S-63	(+) kok	+	+	+
S-14	(+) kok	+	+		S-64	(+) kok	+	+	+
S-15	(+) kok	+	+		S-65	(-) basil			
S-16	(+) kok	+	+	-	S-66	(+) diplokok			
S-17	(+) kok	+	+		S-67	(-) basil			
S-18	(+) kok	+	+	+	S-68	(+) diplokok			
S-19	(+) kok	+	+		S-69	(-) basil			
S-20	(+) kok	+	+		S-70	(-) basil			
S-21	(+) kok	+	+		S-71	(+) basil			
S-22	(+) kok	+	+		S-72	(+) diplokok			
S-23	(+) kok	+	+		S-73	(+) diplokok			
S-24	(+) kok	+	+		S-74	(-) basil			
S-25	(+) kok	+	+		S-75	(-) basil			
S-26	(+) kok	+	+		S-76	(-) basil			
S-27	(+) kok	+	+		S-77	(-) basil			
S-28	(+) kok	+	+	+	S-78	(-) basil			
S-29	(+) kok	+	+		S-79	(+) diplokok			
S-30	(+) kok	+	+		S-80	(+) basil			
S-31	(+) kok	+	+		S-81	(+) basil			
S-32	(+) kok	+	+		S-82	(-) basil			
S-33	(+) kok	+	+		S-83	(-) basil			
S-34	(+) kok	+	+	-	S-84	(-) basil			
S-35	(+) kok	+	+	-	S-85	(+) diplokok			
S-36	(+) kok	+	+		S-86	(-) basil			
S-37	(+) kok	+	+		S-87	(+) diplokok			
S-38	(+) kok	+	+		S-88	(-) basil			
S-39	(+) kok	+	+	-	S-89	(-) basil			
S-40	(+) kok	+	+	+	S-90	(+) diplokok			
S-41	(+) kok	+	+		S-91	(-) basil			

Kod	Gram boyama	Katalaz	Koagülaz	Hemoliz	Kod	Gram boyama	Katalaz	Koagülaz	Hemoliz
S-42	(+) kok	+	+	-	S-92	(+) diplokok			
S-43	(+) kok	+	+		S-93	(-) basil			
S-44	(+) kok	+	+		S-94	(+) diplokok			
S-45	(+) kok	+	+	+	S-95	(-) basil			
S-46	(+) kok	+	+		S-96	(-) basil			
S-47	(+) kok	+	+		S-97	(+) diplokok			
S-48	(+) kok	+	+		S-98	(+) diplokok			
S-49	(+) kok	+	+	+	S-99	(-) basil			
S-50	(+) kok	+	+	+	S-100	(-) basil			

(+) Olumlu

(-) Olumsuz

Laboratuvara getirilen sütler mikrobiyolojik incelemeler: Genel besiyerleri Nütrient ve Kanlı agara ekimleri yapıldı, burada üreyen şüpheli kolonilerin katalaz, gram boyama, koagülaz oluşumu, hemoliz oluşumu işlemlerinden sonra identifikasyon işlemi için Api identifikasyon yöntemi kullanıldı. Çizelge 4.3 de api sonucu, identifikasyonu yapılan türler belirtilmektedir.

Çizelge 4.3. İdentifikasyonu yapılmış *Staphylococcus* türleri

S-1	<i>Micrococcus spp</i>	S-33	<i>Staphylococcus hominis</i>
S-2	<i>Micrococcus spp</i>	S-34	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
S-3	<i>Micrococcus spp</i>	S-35	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
S-4	<i>Staphylococcus capitis</i>	S-36	<i>Staphylococcus warneri</i>
S-5	<i>Micrococcus spp</i>	S-37	<i>Staphylococcus xylosus</i>
S-6	<i>Staphylococcus capitis</i>	S-38	<i>Staphylococcus chromogenes</i>
S-7	<i>Staphylococcus lentus</i>	S-39	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
S-8	<i>Micrococcus spp</i>	S-40	<i>Staphylococcus aureus</i>
S-9	<i>Staphylococcus aureus</i>	S-41	<i>Staphylococcus capitis</i>
S-10	<i>Staphylococcus hominis</i>	S-42	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
S-11	<i>Staphylococcus aureus</i>	S-43	<i>Staphylococcus warneri</i>
S-12	<i>Staphylococcus cohnii</i>	S-44	<i>Staphylococcus xylosus</i>
S-13	<i>Staphylococcus capitis</i>	S-45	<i>Staphylococcus aureus</i>
S-14	<i>Staphylococcus capitis</i>	S-46	<i>Staphylococcus lentus</i>
S-15	<i>Micrococcus spp</i>	S-47	<i>Staphylococcus capitis</i>
S-16	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S-48	<i>Staphylococcus xylosus</i>
S-17	<i>Staphylococcus sciuri</i>	S-49	<i>staphylococcus aureus</i>
S-18	<i>Staphylococcus aureus</i>	S-50	<i>Micrococcus spp</i>
S-19	<i>Staphylococcus hominis</i>	S-51	<i>Staphylococcus aureus</i>
S-20	<i>Staphylococcus hominis</i>	S-52	<i>Staphylococcus aureus</i>
S-21	<i>Staphylococcus lentus</i>	S-53	<i>Staphylococcus xylosus</i>
S-22	<i>Staphylococcus xylosus</i>	S-54	<i>Staphylococcus warneri</i>
S-23	<i>Staphylococcus capitis</i>	S-55	<i>Staphylococcus xylosus</i>
S-24	<i>Micrococcus spp</i>	S-56	<i>Staphylococcus warneri</i>
S-25	<i>Staphylococcus xylosus</i>	S-57	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
S-26	<i>Staphylococcus hominis</i>	S-58	<i>Staphylococcus aureus</i>
S-27	<i>Micrococcus spp</i>	S-59	<i>Staphylococcus simulans</i>
S-28	<i>Staphylococcus aureus</i>	S-60	<i>Staphylococcus hominis</i>
S-29	<i>Staphylococcus hominis</i>	S-61	<i>Staphylococcus sciuri</i>
S-30	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	S-62	<i>Staphylococcus capitis</i>
S-31	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	S-63	<i>Staphylococcus aureus</i>
S-32	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	S-64	<i>Staphylococcus aureus</i>

Çalışmamızda şüpheli 64 örnekten 12 si % 18.8 *S. aureus*, 8'i % 12.5 *S. capitis*, 7'si % 10.9 *S. xylosus*, 7'si % 10.9 *S. hominis*, 6'sı % 9.4 *S. epidermidis*, 3'ü % 4.7'si *S. lentus*, 3'ü %4.7'si *S. warneri*, 2'şer tane % 3.1 ile *S.saprophyticus*, *S. chromogenes*, *S.cohnii* ve *S. sciuri*, 1'i % 1.6'sı *S. stimulans* 8'i % 12.5 de *Micrococcus spp.* olarak bulunmuştur.

Antibiyotik duyarlılık testleri tüm staphylococcus türleri için yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4 de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları

KOD	Ampisilin+ Sulbaktam	Amoksisilin+ Klavulanik asit	Gentamisin	Tetrasiklin	Siprofloksasin	Azlosilin	Eritromisin	Trimetoprin+ Sufametoksazol	Vankomisin	Sefotaksim
S-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-4	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
S-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-7	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
S-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-9	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
S-10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-11	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
S-12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-14	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
S-15	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
S-16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-17	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
S-18	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
S-19	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
S-20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-21	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
S-22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-28	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
S-29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S-30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-35	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
S-36	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-
S-37	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-

S-38	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-
S-39	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-
S-40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-42	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-43	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-46	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-47	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-49	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-51	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-52	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-53	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-54	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
S-55	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-56	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-57	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-58	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-61	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-62	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-63	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Hassas (+) Dirençli (-)

Antibiyotik duyarlılık testleri tüm stafilokok türlerine yapıldı. Çalışmada tüm suşların Vancomisine karşı duyarlı olduğu görüldü. Tüm suşların Ampisilin + Sulbaktam'a karşı % 20.3 direnç, Amoksisilin + Klavulanik asit'e karşı % 15.6 direnç, Gentamisine karşı % 10.9 direnç, Tetrasikline karşı % 1.56 direnç, Siprofloksasine karşı %3.1 direnç, Azlosine karşı % 15.6, Eritromisine karşı %25 direnç, Trimetoprin + Sufametoksazole karşı % 20.3 direnç, Sefotaksime karşı % 21.8 direnç.

S. aureus türleri arasında ise vankomisine karşı tüm örneklerin hassas olduğu gözlenmiş; her antibiyotiğe karşı bir dirençlilik söz konusudur. 2 suş %16.6 Ampicilin + Sulbaktam yine 2'şer suş %16.6 sırası ile Azlosilin, Eritromisin,

Trimetoprin + Sufametoksazol, Sefotaksim karşı dirençli, sadece 1'er suş % 8.3 ile Gentamisin, Tetrasiklin, Siprofloksasin karşı direnç gösterir.

İdentifikasyon sonucu elde edilen *S. aureus* türlerinin enterotoksin tiplerinin belirlenmesi SET RPLA ile gerçekleştirilmiştir. Enterotoksinlerin sonuçları aşağıda Çizelge 4.5 te görülmektedir.

Çizelge 4.5. *S. aureus* türlerine ait enterotoksin deney sonuçları

Kültür Numarası	SEA	SEB	SEC	SED
S-9	+2	Negatif	+2	Negatif
S-11	+1	+1	+1	Negatif
S-18	+1	Negatif	Negatif	+2
S-28	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
S-40	+2	+1	Negatif	Negatif
S-45	Negatif	+1	Negatif	+2
S-49	+1	+1	+1	+1
S-51	+3	Negatif	Negatif	Negatif
S-52	Negatif	+1	+1	+1
S-58	+1	+1	+1	Negatif
S-63	+2	Negatif	Negatif	+2
S-64	Negatif	Negatif	+3	Negatif

İdentifikasyon sonucu elde edilen 12 *S. aureus* izolatının sadece birinde % 8.3 (S-28 nolu suş) toksin tipine rastlanmadı. % 91.6' da ise toksin tiplerinin ya bir tanesi ya da bir kaçı bir arada bulunmaktadır. SEA % 66.6, SEB % 50, SEC % 50, SED % 41.6 oranında bulunur. SEA ve SEB beraber % 16.6, SEA ve SEC 33.3, SEA ve SED 33.3 oranında, SEB ve SEC beraber % 33.3, SEB ve SED% 16.6, SEC ve SED % 24.9 oranlarında beraber bulunur. SEA, SEB, SEC 3 SUŞTA % 24.9 oranında SEB, SEC, SED 2 suşta beraber % 16.6 oranında, sadece bir suşta toksinlerin hepsi bir arada % 16.6 oranında beraber bulunur.

Ağır metal ölçümünü yaptığımız numuneleri rastgele dokuz süt toplama merkezinden seçerek Kurşun ve Kadmiyum yönünden analizleri yapıldı. Ağır metal ölçüm sonuçlarımız Çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6 Sütlerdeki Ağır Metal(Pb, Cd) Sonuçları

Süt Toplama Merkezi	Pb (mg/l)	Cd (mg/l)
1	0,011	0,001
2	0,048	0,0002
3	0,039	0,001
4	0,008	0,034
5	0,016	0,016
6	0,010	0,0018
7	0,007	0,0023
8	0,126	0,040
9	0,006	0,0196

6.TARTIŞMA

Sütün besleyici değerinin çok yüksek olması nedeniyle çok sayıda ve türde etkenin meme dokusuna yerleşmesi ve üreyerek hastalığı oluşturmaları mümkündür. Sığırların mastitisli süt örneklerinden, 130' un üzerinde farklı mikroorganizma izole edilmiştir. Bunlardan bakteriyel orijinli olanlarının başlıcaları; Stafilokoklar, Streptokoklar, Koliform Bakteriler (*Esherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumoniae*, vs.), *Corynebacterium pyogenes* (*Actinomyces pyogenes*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium bovis*, *Brusella* etkenleri, *Pasteurella multocida* ve *P. haemolytica*' dır [Bilgehan,1995].

Memedeki irritasyonlara bağlı olarak artan hücre sayısının ortaya konması subklinik mastitislerin teşhisinde önemli bir kriterdir. Subklinik mastitisli sütlerdeki hücre artışını gösteren CMT'nin, mikroskopik veya elektronik cihazlarla direk hücre sayısının belirlendiği yöntemlerle desteklenmesi gerekmektedir. Ayrıca enfeksiyona neden olan mikroorganizmanın tespiti ve tedavide kullanılacak ilacın belirlenmesi amacıyla subklinik mastitislerin teşhisinde mikrobiyolojik testlerin yapılması zorunludur [Ergün,1996].

Gelişmiş ülkelerde süt endüstrisi işletmelerine gelen çiğ sütlerin somatik hücre sayımı zorunludur. Sayım sonuçları normalin biraz üzerinde olduğu zaman işletme süt üreticisine ceza vermekte, daha yüksek olduğunda ise sütü reddetmektedir. Çiğ sütlerde somatik hücre varlığının düşürülmesi için immun sistemi güçlendirici besinler ve probiyotik içeren yemlerin kullanımı da söz konusudur [Arda, 1997].

Avrupa Topluluğu için geçerli olan SHS limit değeri süt cinsine göre (inek, manda) değişmek üzere 400.000 - 500.000 hücre/ml olarak belirlenmiştir. Topluluk bu değerleri giderek aşağı çekmektedir. Avrupa Topluluğu uyum çalışmaları nedeni ile Türkiye'de de aynı zorunluluk vardır. Amerika Birleşik Devletlerinde bu sınır 750.000 iken Kanada da 500.000 olarak belirlenmiştir[Arda, 1997] .

Harmon ve arkadaşları (1994) patojen bakterilerin meme dokusuna yerleştikten sonra buradaki varlıklarıyla sütün doğal yapısını bozduklarını ve sütteki somatik hücre sayılarında artmaya neden olduklarını ve bu dokulardaki enfeksiyon varlığı ile somatik hücreler arasında bir paralellik olduğunu, enfeksiyonlu hayvanların sütlerindeki somatik hücre sayısının arttığını bulmuşlardır. Yapılan mikrobiyolojik çalışmalarda patojen kaynaklı enfeksiyonların büyük bir bölümüne ait sütlerin içeriği incelendiğinde somatik hücre sayısının artışı gözlemlenmiştir ve 1 ml'de 200.000 den fazla hücre saymışlardır, incelenen sütlerde sayısında artış görülen hücrelerin genellikle lökosit ve azda olsa epitel hücreleri olduklarını saptamışlardır [Harmon, 1994].

Alaçam ve arkadaşları (1998) subklinik mastitisli meme loblarındaki hücre sayısını 500.000/ml'den fazla olarak bulmuşlar ve bu orandan daha az hücre sayısına sahip sütleri de normal olarak kabul etmişlerdir [Alaçam, 1998].

Nizamlioğlu ve arkadaşları (1992) sağlıklı hayvanların sütlerindeki hücre sayısını ortalama 282.655, mastitisli hayvanlarda ise 1.236.396 olarak tespit etmişler; Baştan ve arkadaşları (5) toplam 183 süt örneğinde yaptıkları çalışmada CMT (+) grubunu %21.18, CMT (++) olanları %30.6 ve CMT (+++) olanları da %20.2 olarak tespit etmişler ve bu örneklerdeki hücre sayılarını CMT değerlerine göre sırasıyla 200.000-300.000, 300.000-1.000.000 ve 1.000.000'dan fazla olarak bulmuşlardır. Rişvanlı ve Kalkan (2002) çalışmalarında subklinik mastitisli 271 adet meme lobunu incelemişler ve bunların %8, 12'si CMT (+), %22 88'i CMT (++), ve %70'i de CMT (+++) olarak bulmuşlardır. SHS sonuçları ise sırasıyla CMT (+) ortalama 313.001, CMT (++) 559.007, CMT (+++) ise ortalama 1.563.618 olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda, incelediğimiz sütlerin %25'i CMT(+), %26.6'sı CMT(++) ve % 48.4' ü CMT(+++)’ dir. Sırası ile CMT(+) olanlarda ortalama SHS 354.307, CMT(++)’de 628.210, CMT(+++)’de ise 1.344.722’dir. Ayrıca *Staphylococcus spp.* dışındaki süt numunelerindeki SHS sayısı ortalaması 36 süt numunesinde 816,560 olarak hesapladık [Niazamlioğlu ve ark., 1992].

Nagahata ve İto (2007) somatik hücre sayımı ve *S. aureus* kaynaklı mastitis enfeksiyonları arasında bir bağıntı olduğunu düşünmüşler bu doğrultuda belli bir bölgede 3.5 yıllık bir çalışma sonucunda belli çiftliklerden bu

parametreleri hijyen koşullarını temel alarak incelemişlerdir. İlk ölçümlerinde SCC (Somatic Cell Count) sayısı süt toplama tanklarında ortalama 52.3×10^4 olduğunu ve bu sütlerdeki mikrobiyolojik incelemeler sonucunda bu enfeksiyonları gerçekleştiren bakterilerin %29'nun *S. aureus* kaynaklı olduğunu buluyorlar. Çalışmanın ilerleyen aylarında hijyen kurallarının sıkı uygulandığı bu çiftliklerde SCC sayımında ciddi bir düşüş meydana geliyor. SCC sayısı 18 ay sonunda ortalama 30×10^4 /ml, daha sonraki aylarda 20×10^4 /ml altında sayılara ulaşıyorlar. Bu çalışma hijyenik şartların mastitis olgularındaki önemi gösteriyor [Nagahata ve İto, 2007].

De Soza ve arkadaşları (2007) farklı tür hayvanlardan aldıkları subklinik mastitisli sütlerde yaptıkları incelemelerinde 84 adet *Staphylococ spp.* izole elde ettiler. Bu 84 izolatın 30 tanesi biyokimyasal ve moleküler tekniklerle ve fenotipik–genotipik karşılaştırma yapılarak *S. aureus* olduğunu saptadılar. Moleküler teknik olarak Pulsed-Field Jel Elektorforezi (PFGE) ve çoklu alan dizi tiplendirmesi ile gerçekleştirdiler [De Soza, 2007].

Biz çalışmamızda 100 subklinik mastitisli süt örneğini inceledik, mikrobiyolojik incelemelerle 64 şüpheli *Staphylococcus spp.* izole ettik, identifikasyon çalışmaları ile bu suşların: 12'si % 18.8 *S. aureus*, 8'i % 12.5 *S. capitis*, 7'si % 10.9 *S. xylosus*, 7'si % 10.9 *S. hominis*, 6'sı % 9.4 *S. epidermidis*, 3'ü % 4.7'si *S. lentus*, 3'ü %4.7'si *S. warneri*, 2'ser tane % 3.1 ile *S. saprophyticus*, *S. chromogenes*, *S. cohnii* ve *S. sciuri*, 1'i % 1.6' sı *S. stimulan* 8'i de *Micrococcus spp.* olarak bulduk.

1998 yılında Fthenakis süttten izole ettiği staphylokokal türlerinin antibiyotik duyarlılıklarını incelediğinde; 172 izolatın 78'i *Staphylococcus aureus*, 62'si *S. chromogenes*, 34'ü *S. stimulan*, 37'si *S. epidermidis* ve 17'si *S. xylosus* olarak bulmuştur. 172 izolatın tümü sefoperazone, sefuroxime, kloxacillin, enrofloxasin and methisillin, 159'u klindamisin, 135'i tetrasiklin, 129'u neomisin'e, 125'i eritromisin'e, 109'u gentamisin'e ve 102'sinin de ampisilin ve penisillin-G'ye karşı hassas oldukları gözlenmiştir [Fthenakis, 1998].

S. aureus'un neden olduğu mastitislerde çeşitli antibiyotiklerin etkili olduğunu bildirilmektedir. Akay (1986) yaptığı çalışmada, kolisin sülfat, ampisilin ve penisilinin; Şahin ve ark. (1997), ampisilin+sülbaktam, enrofloksasin, danofloksasin ve sefoperazonun; Rişvanlı (2001), sefalosporin, danofloksasin, enrofloksasin ve neomisin; Trinidad ve ark. (1990), sefalotin, eritromisin, gentamisin, oksasilin, penisilin, tetrasiklin, vankomisin ve sülfamethoksazol + trimetoprimin; Normanno ve arkadaşları çalışmalarında *S.aureus* suşlarının hiçbirinde Vankomisin ve Teikoplanine karşı direnç gözlemlenmemişlerdir. Malinowski ve ark.(2002) basitrasin, novobiosin ve eritromisinin *S.aureus*'un neden olduğu mastitislerde en etkili antibiyotikler olduklarını bildirmişlerdir [Akay, 1986; Şahin ve ark., 1997; Rişvanlı ,2001; Trinidad ve ark. ,1990; Malinowski ve ark.,2002].

Çalışmamızda; tüm *Staphylococcus spp.* Suşlarının Vankomisine karşı duyarlı olduğu görüldü. Tüm suşların Ampicilin + Sulbaktam'e karşı % 20.3 direnç, Amoksisilin + Klavulanik asit'e karşı % 15.6 direnç, Gentamisine karşı %10.9 direnç, Tetrasikline karşı %1.56 direnç, Sipprofloksasine karşı %3.1 direnç, Azlosine karşı % 5.6 direnç, Eritromisine karşı %25 direnç, Trimetoprin + Sufametoksazole karşı %20.3 direnç, Sefotaksime karşı %21.8 direnç görülmüştür. *S. aureus* türleri arasında ise Vankomisine karşı tüm örneklerin hassas olduğu gözlenmiş; her antibiyotiğe karşı bir dirençlilik söz konusudur. 2 suş %16.6 Ampicilin + Sulbaktam yine 2'şer suş %16.6 sırası ile Azlosilin, Eritromisin, Trimetoprin+Sufametoksazol, Sefotaksim karşı dirençli, sadece 1'er suş %8.3 ile Gentamisin, Tetrasiklin, Sipprofloksasin karşı direnç gösterdiğini bulduk.

Başta hayvansal gıdalar olmak üzere değişik gıdalarda stafilokoklar gıda zehirlenmelerine sebep olmaktadır. Hayvan kökenli pişirilmiş veya az pişirilmiş gıdalardan sığır, domuz, hindi ve tavuk eti, özellikle süt tozu ve peynir olmak üzere süt ürünleri, etli patates salatası ve diğer et salataları, balık ve yumurta, kremalı pasta ürünleri ayrıca süt, şeker ve yumurtadan yapılan dondurulmuş soslar bunların başında gelmektedir [Bergdoll, 1989].

Sokari (1991), yaygın olarak tüketilen kırmızı et, balık ve sebzeden oluşan 880 gıda örneğinden izole ettiği 552 (%62) koagülaz pozitif *S. aureus* suşundan

269'unun (%48) enterotoksijenik olduğunu saptamış ve bunlar içerisinde SEA oluşturanların en sıklıkla bulunduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada incelenen balık örneklerinde ise SEB ve SEA enterotoksinleri dominant olarak bulunmuştur [Sokari, 1991].

Yapılan başka bir çalışmada kanatlı çiftlikleri ve kanatlı işleme tesisleri ile işlenmiş kanatlı etlerinden izole edilen *S. aureus*'ların en çok SED'yi oluşturduğu saptanırken, bazı izolatların SEA, bazılarının ise SEA ve SED'nin her ikisini de oluşturduğu bildirilmiştir [Holmberg, 1989].

Kısa ve Ark. (1996) inceledikleri sade kremalı örneklerin 4'ünde (%36.4), kakaolu kremalı örneklerin 12'sinde (%22.6) ve meyveli kremalı örneklerin 9'unda (%28.1) olmak üzere toplam 25 (%26.0) pastadan izole edilen koagulaz pozitif stafilokokların stafilokokal enterotoksin oluşturma özelliğinde olduğunu saptamışlardır [Kısa ve Ark, 1996].

Normanno ve arkadaşları (2006) çeşitli gıdalardan izole ettikleri *S. aureus* bakterilerinin enterotoksin tipleri ve bu bakterilerin antibiyotik duyarlılık testlerini çalışmışlardır. *S. aureus* türlerinin izolasyon ve identifikasyonunu Koyun Kanlı agar, Baird Parker agarları kullanarak yine şüpheli kolonileri katalaz ve gram boyamalarından sonra API (Analytic Profile Index) biyokimyasal belirleme metodunu kullanarak belirlemişlerdir. Toksin tayin deneyini ise OXOID firmasının SET-RPLA kiti ile gerçekleştirmişlerdir. Antibiyotik duyarlılık deneylerini Müller Hinton agarda disk difüzyon metodu ile gerçekleştirmişlerdir. Çalışmaları sonucunda; en çok SED %33.6, sonra sırası ile SEA%18.4, SEC %15.2 ve SEB %6.4 bazı örneklerde ise birden fazla toksin tipi bir arada bulunmuştur. 14 örnekte SED ve SEA %11.4, SEB-SEC %5.6, SEA –SEB %4, SEB-SED %0.8, SEC-SED %0.8 sadece bir örnekte SEB-SEC-SED bir arada bulunmuştur %0,8 [Normanno, 2006].

İdentifikasyon sonucu elde ettiğimiz 12 *S. aureus* izolatının sadece birinde % 8.3 (s–28 nolu suş) toksin tipine rastlanmadı. % 91.6' da ise toksin tiplerinin ya bir tanesi ya da bir kaçı bir arada bulunmaktadır. SEA % 66.6, SEB % 50, SEC % 50, SED % 41.6 oranında bulunur. SEA ve SEB beraber % 16.6, SEA ve SEC

33.3, SEA ve SED 33.3 oranında, SEB ve SEC beraber % 33.3, SEB ve SED% 16.6, SEC ve SED % 24.9 oranlarında beraber bulunur. SEA, SEB, SEC 3 SUŞTA % 24.9 oranında SEB, SEC, SED 2 suşta beraber % 16.6 oranında, sadece bir suşta toksinlerin hepsi bir arada % 16.6 oranında beraber bulundu.

Vidović ve arkadaşları (2005) metal endüstrisinin yoğun olduğu bölgedeki toprak, buğday ve o bölgedeki ineklerden alınmış sütler içindeki Zn ve Cd seviyelerini incelemişlerdir. Sütler ayda sekiz kez inekler sağıldıktan hemen sonra alınmıştır. Toplanan süttten 5 gr alınarak yanıcaya kadar hot platte ısıtılmıştır. Daha sonra bu yanmış süt zerine 5 ml der HNO₃ ilave edilerek alevli atomik absorpsiyon spektrofotometresinde analiz edilmiştir. 3 yıl boyunca aynı bölgeden alınan süt numunelerindeki Zn ve Cd nin toprak - ineğin beslendiği ot - süt şeklinde besin çevrimi içinde süt içerisinde toplandığı görülmüştür. Ayrıca bulunan diğer önemli bir sonuçta metal üretiminin yapılmadığı dönemlerde süt içindeki Zn miktarı %17 ve Cd %13 daha az olduğu görülmüştür [Vidović ve ark., 2005].

Türk gıda kodeksi gıda maddelerinde belirli bulaşanların maksimum seviyelerinin belirlenmesi hakkındaki tebliğe göre sütte Pb 0.02 mg/kg, Cd ise 0.01 ile 1 mg/kg'dan daha fazla bulunmamalıdır.

İtalya'da yapılan bir çalışmada Lante ve arkadaşları (2006) sütte ve peynirde Pb ortalama 0.00 ve 0.060 mg/kg olarak belirlenmiştir. Hırvatistan'da 2004 yılında 15 çiftlik sütünde Pb miktarı 0.019-0.057 mg/l arasında bulunmuştur. Türkiye'de 2000 yılında farklı bölgelerden alınan 75 süt ör-neğinde Pb 0.018 ile 0.049 mg/kg arasında bulunmuştur. Analiz edilen örnekler tolere edilebilir seviyenin altında bulunmuştur. Analizini yaptığımız süt örneklerinde değerlerimiz Pb (0.007-0.126 mg/l) arasında olup üç süt toplama merkezine ait süt numunelerinde yüksek Pb miktarları görülmüştür [Lante ve ark.,2006; Paclovic ve ark., 2004; Şimşek ve ark. 2000].

Lante ve ark.(2006) İtalya'da yaptıkları bir araştırmada peynir sütünde ve peynirlerde Cd belirleyememişlerdir. Paclović (2004) Hırvatistan'da 15 çiftlik sütünde Cd miktarı 0.003-0.006 mg/l arasında değişmiştir (Paclovic, 2004).

Tripathi ve arkadaşları (1999) analiz ettiği yaklaşık 75 süt örneğinde Cd değerini oldukça düşük konsantrasyonlarda bulmuşlardır (0.00007-0.00010 mg/l). Değişik araştırmacıların sonuçlarından da anlaşılacağı gibi süt ve peynirlerde belirlenen Cd miktarları önemli farklılar göstermiştir. Çalışmamızda sütlerdeki Cd değerlerinde benzer farklılıklar görülmüştür. Çalışmamızda Cd (0.0002-0.040 mg/l) arasında bulunmuştur. Örneklerimizdeki Cd değerleri normal aralıklarda olup Türk gıda kodeksinin belirlediği kriterlere uymaktadır [Lante ve ark.,2006; Paclovic, 2004; Tripathi ve ark. 1999].

Çalışmalar boyunca alınan süt örneklerinin %80’de subklinik mastitis bulgusu saptadık. Bunun sebepleri arasında uygun olmayan şartlarda hayvan yetiştiriciliğinin yapılmaya çalışılması, yetiştiricinin konu hakkındaki bilgisinin yetersiz olması ve hasta hayvanlara yanlış tedavi uygulanması sayılabilir.

Toplanan süt numunelerinden bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiş ve yapılan biyokimyasal testlerin sonuçları göz önünde bulundurulduğunda örneklerin büyük bir kısmında *Staphylococcus spp.* türüne ait özellikleri gösteren mikroorganizmalar izole edilmiştir.

Ayrıca *S. aureus* olarak saptanan kültür örneklerinde yapılan toksin tipi belirleme testleri ile bazı türlerin birden fazla toksin tipine sahip olması, türün insan sağlığı açısından ciddi tehlike içerdiği gözler önüne konulmuştur.

Numunelerin alma aşamasında kullandığımız CMT testi ve sonuçları ile numunelerin mikrobiyolojik incelemesi sonuçlarını karşılaştırdığımızda sonuçlar arasında bir paralellik saptanmıştır. Subklinik mastitisin saptanmasında CMT testinin önemli bir referans olduğunu gözlenmiş oldu.

İzolasyonu sağlanan bu mikroorganizmalar üzerinde, moleküler tanımlama teknikleri kullanılarak yapılacak ileri çalışmalarda tür bazında kesin tanımlamaları mümkün olacaktır. Böylece bölgeye has enfeksiyon etkeni mikroorganizma belirlenerek, tedavi uygulamalarında kolaylık sağladığı gibi ekonomik katkı sağlar.

Antibiyotik dirençlilik testleri sonuçları göz önüne alındığında izolasyonu sağlanan bu mikroorganizmaların çoğunun kullanılan antibiyotiklere karşı duyarlı olduğu anlaşılmıştır. Özellikle tüm *Staphylococcus spp.* suşlarında Vankomisine karşı yüksek hassasiyet söz konusudur. Böylece tedavi amacıyla kullanılan antibiyotiklerin hastalıkların sağlığını için kullanılması hem zaman hem de ekonomik açıdan bölgedeki yetiştiricinin faydasına olacaktır. Fakat suşlar arasında anibiyotik duyarlılıklarının değişmesi, stafilokok nedenli vakaların tedavisinde mutlaka suşların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi gerekli kılar.

Ağır metallere yönelik yaptığımız çalışma sonucu üç süt toplama bölgesindeki Pb değerlerinin normal aralığın üstünde olması sanayi kuruluşlarının daha dikkatli olması gerektiği gerçeğini gösterir.

Ayrıca çalışmamızda elde ettiğimiz toksinler üzerine yapılacak ileri çalışmalar, hastalığın profilaksisi açısından önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

Abay M., Bekyürek T. Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences) 15(3) 189-193, 2006

Aires de Sousa M., E. S. R. Parente C., Vieira da Motta O., Isabel C. F. Bonna, Denise A. S., and Herminia de L., Applied and Environmental Microbiology, June 2007, p. 3845–3849

Akay Ö., Mastitisli İnek sütlerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotiklere karşı duyarlılıkları. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 1986, 33:1-11.

Akay, Ö., İzgür, M., Esendal, Ö., Çetin, C. (1993). İnek Sütlerinden Elde Edilen Streptokok Suşlarının Sero-Gruplandırılması. J, Ver Anim. Sci., 17: 89-95.

Alaçam E. (1988): Meme Hastalıkları. (in) Sığır Hastalıkları. E Alaçam, M Şahal (Editor), 389-425, Medisan Yayınları, Ankara.

Alaçam E., Sığır Hastalıkları, İkinci Baskı, Tekno Grafik Matbaası, İstanbul , 1991, 575-593.

Alexander R., 2002, Doktora Tezi, Münih Teknik Üniversitesi, Entwicklungund Charakterisierung wasserlöslicher Benzoylthioharnsto funktionalisierter Polymere zur selektiven Abtrennung von Schwermetallionen aus Abwässern und Prozesslösungen

Arda, M., Aydın, N., Akay, Ö, İzgür, M. (1986). Mastitis. Batı Akdeniz Bölgesi 1. Hayvancılık Semineri., S.: 202-216.

Arda, M., İstanbulluoğlu, E.,(1980).Mastitislere Sebep Olan Aerobik-Mikroaerofilik, Anaerobik Bakterilerin İzolasyon Ve İdentifikasyonu Üzerinde Çalışmalar, Tübitak Veterinerlik Ve Hayvancılık Araştırma Grubu Proje No: Vhag- 304

Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N., Akay, Ö. (1992). Streptokok Mastitisleri, Özel Mikrobiyoloji. Bölüm 2. Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayinevi- No741, Ders Kitabı 1, Erzurum. S.:60-77.

Aydın, F., Leloğlu, Şahin, M., Çolak, A., Otlı, S. (1995). Kars Yöresi İneklerinde Klinik ve Subklinik Mastitislere Neden Olan Mikroorganizmaların İdentifikasyonlarını ve Antibiyotik Duyarlılıklarını Üzerine Araştırmalar. Pendik. Vet. Mikrobiol. Derg. 2:125-137

Aydınlı, N. (1997). Mastitisin Mikrobiyolojik Tanı Yöntemleri. 1. Mastitis Semineri. 15-16 Kasım 1997, Ankara.

Aygen, S. (1996) Bursa Yöresinde Mezbahada Kesilen İneklerde Rastlanan Mastitis Lezyonlarının Makro ve Mikroskopik İncelenmesi. Uludağ Üniversitesi Vet. Fak. Der.3:11.

Baldwin D.R., Marshall W J. "Heavy Metal Poisoning and Its Laboratory Investigation" (Review Article), Annals of Clinical Biochemistry 1999; 36: 267-300.

Başkaya, H., Ertürk, Ö, Beşe, M. Ve Arda, M. (1972). Evcil Hayvanların Enfeksiyöz Hastalıkları. A.Ü. Vet. Fak. Yay., 283. Ankara Üniversitesi Basımevi

Bergdoll M.,MS (1989): *Staphylococcus aureus*. 463-523. In: MP Doyle (Ed), Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker, New York.

Berkin, Ş., Milli, Ü. (1984). Mastitislerin Patolojisi. 1. Mastitis Semineri. Lalahan Veteriner Zootečni Araştırma Enstitüsü Yetiştirme ve Deneme Çiftliği Müdürlüğü Ofset Tesisleri, Ankara, S.: 9-16.

Bermejo-Barrera, A. (1995). Direct determination of Cd in heroin and cocaine by electrothermal atomic absorption spectrometry using deuterium arc background correction combined with chemical modification. J.Anal.At.Spectrom, 10:1011-1017.

Bigersson B., O. Sterner, E. Zimerson, Chemie und Gesundheit "Eine verst in die Toxikologie", Vchverlagsgesellschaft, 1988, Isbn

Bilgehan, H. (1995) Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış Yayınları 2.Baskı, Bornova,İzmir

Bilgehan, H. (2000) Klinik Mikrobiyolojik Tedavi. Barış Yayınları 3.Baskı, Bornova,İzmir

Blood, D. C. And Radostass, O. M. (1989). Mastitis. 501-512. Ed. D. C. Blood, İn. "Veterinary Medicine A Text Book Of The Diseases Of Cattle, Sheep, Pigs, Goats And Horses". 7. Ed., Baillere Tindall, Lo

Büyükpamukçu, M. (1980). Meme Hastalıkları. "Veteriner Patoloji". Cilt 3, 5. Bölüm, A. Ü. Basımevi, Ankara.

Cloos W. E. Tornebene T.G. Schleifer K. H. Isolation and Caracterization of Micrococci From Human Skin, Including Two New Species(1974) Int. Syst. Bacteriol Manuel of Clinical Microbiology 5. Ed.

Crass, B. And Bergdoll, M.(1986) J. Clinic Microbiol. 23;43

Demirci,M.,Şimşek,O.(1996) Sağım Makinalarının Temizlik ve Dezenfeksiyonu. Süt Deveci, H., Apaydın, A.M., Kalkan, C. ve Öcal, H. (1994) Evcil Hayvanlarda Meme Hastalıkları. F.Ü. Basımevi, Elazığ.

Domoracki, J.K. Costain, C. Coruh, A. Ludman, Medical Service, San Francisco General Hospital, and Department of Medicine, University of California San Francisco, San Francisco, California 94143 (1998)

Dündür, A., Dündar B. (2002). Sığır Mastitisi. Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Enstitüsü Yayınları No. 5. Milli Eğitim Basımevi.

Eberhatr, R.J. (1986). Management Of Drycows Reduce Mastitis. J. Dairy Sci. 75 1007-1014.

Ergün, H., Mert, N. (1984). Sütte Mastitis Nedeniyle Meydana Gelen Biyokimyasal Değişimler. I. Mastitis Semineri. Lalahan Veteriner Zootekni Araştırma Enstitüsü Yetiştirme Ve Deneme Çiftliği Müd'lüğü Ofset Tesislen, Ankara, S.: 49-61.

Ergün, H., Mert, N. (1989). Sütte Mastitis Nedeniyle Meydana Gelen Biyokimyasal Değişimler. Ankara, S.: 49-61.

Erk, H., Doğanelli, M., Akkayan, C. (1972). Veteriner Doğum Bilgisi ve Jinekoloji. A.Ü. Vet. Fak. Yay. 175. 569-595.

European Commission Dg Env. E3 Project Env.E.3/Etu/2000/0058, "Heavy Metals in Waste" February 2002, Danimarka

Fthenakis G., Lapapharm G., Menandrou 73, 10437 Athens, Greece (1999).

Geçgil, A. (1987). Sığır Mastitisi. Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Enstitüsü Yayınları No. 5. Milli Eğitim Basımevi

Guidry, A. J. (1985). Mastitis And The Immun System Of The Mammary Gland. 229-258. Ed. B. L. Larson. İn: "Lactation" . The Iowa State Universty Press /Ames

Güngör, M., Balcı, O., Çorlu, M., Serpek, B. (1995). Konya Yöresindeki Mastitisli İneklerden Elde Edilen Süt Örneklerinin Mikrobiyel Florası ve Ldh Aktivitesi. Doğa. Türk Vel. Hay. Derg., 16: 19-29

Harmon, R. J. (1994). Physiology of Mastitis And Factors Affecting Somatic Cell Counts. J. Dairy. Sci., 77, 7, 2103-2112.

Heinzelman, D. C.; Cırino, V. O.; Murray, M. D. Milk, Dairy Product, Bovine Research Fund. , 2 nd Ed. Vol.2., Elsevier Applied Science, London and New York, (1997)

Holleman F., E. Wiberg, "Lehrbuch der Anorganischen Chemie", Walter De Gruyter Verlag, NewYork, 1995, ISBN 3-11-012641-9

Holmberg SD, Blake PA (1984): Staphylococcal food poisoning in the United States. New facts and old misconceptions. J Am Med Assoc, 251, 487-489.

[http:// www.mikrobiyoloji.org/](http://www.mikrobiyoloji.org/) *S. aureus* İzolasyon Metodları

Isenberg H.D. , Clinical Microbiology Procedures M. Louhi, T. Ali-Vehmas,

1992: Comparison of methods of staphylococci isolated from bovine mastitis Veterinary Medicine. Eight Edition 563-627.

Jain, N. C. (1979). Common Mammary Pathogens and Factors In Infection And Mastitis. J. Dairy Sci., 62, 1, 128-134.

Javier Oviedo-Boyso, Juan J. Valdez-Alarcon, Marcos Cajero-Juarez, Alejandra Ochoa-Zarzosa, Joel E. Lopez-Meza, Alejandro Bravo-Patino, Victor M. Baizabal-Aguirre C.P. 58262 Morelia, Michoacan, Mexico

Jeffrey L. Watts and Robert J. Yancey, JR. Animal Health Therapeutics Research, The Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan 490, 1994

Kalmus P., Arvo V., Birgit A. and Kask K. (2006) Kalmus ; licensee BioMed Central Ltd

Kısa Ö, Albay A, Erol , Sırıken B, Esin N, Gün H, Yurtyeri A (1996): Kremalı pastalardan izole edilen koagulaz pozitif stafilokokların enterotoksin oluşturma özelliklerinin Vidas yöntemiyle belirlenmesi. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 43, 405-411.

Kitchen , B.J.-. Review Of The Progress Of Dairy Science: Bovine Mastitis: Milk Compositional Changes and Related Diagnostic Tesis , Journal Of Dairy Research, 48:167-188), 1981.

Koneman, E. W., S. D. Allen, M. W. Janda, C. S. Paul, W. C. Winn (1997): Color of Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Fifth Edition

Leloglou, N. (1997). Gram Pozitif Koklar. Özel Mikrobiyoloji. M. Arda, A. Minbay Leloğlu, N. Aydın, M. Kahraman, O. Akay, M. İzgur, S. Ülker. Medisan Yayınları. No:26. Ankara, S.:3139.

Leotsinidis M, Alexopoulos A, Kostopoulou-Farri E. Toxic and essential trace elements in human milk from Greek lactating women: Association with dietary habits and other factors. Chemosphere 2005; 61: 238–247

Malinowski E, Klossowskka A, Kaczmarowski M, Lassa H, Kuzma K. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from affected with mastitis cows. Bull Vet Inst 2002, 46:289-294

Mcdonald, J. S. (1979). Bovine Mastitis: Introductory Remarks. J. Dairy sci.,62, 1, 19-24

Mulden J. S. (1997). Bovine Mastitis: Introductory Remarks. J. Dairy sci.,64, 1, 117-121

Murray P.R., Baron E.J. Jorgensen J.H. Phaller M.A.,Yolken R.H. Manuel of Clinic Microbiology 8. Ed. (2003)

Nagahata H., Ito N., Hiroshi M., Yuzo N., Hiromi S.,Susumu M., Hidetoshi H., Takeshi O. and Akira A. Department of Animal Health, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069–8501, Japan

Nihat Ş., Oktay K., Halil S., Hasan S., Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Şanlıurfa.(2002)

Nizamlioğlu M, Kalaycioğlu L, Dinç DA, Erganiş O, Özeren F (1992): İneklerde subklinik mastitislerin erken teşhisi amacıyla sütte N-asetil B-D glukozaminidaz (Nagase) enzim aktivitesinin tayini. S.Ü. Vet. Fak. Derg., 8, 2: 60-63.

Normanno G., La Salandra G., Dambrosio A., N.C. Quaglia , CorrenteM. , Parisi A., Santagada G. , Firinu A., Crisetti F., G.V. Celano a Department of Health and Animal Welfare, Faculty of Veterinary Medicine, 70010 Valenzano (Bari) Italy(2006)

Oliver S., Barbara E. G., Susan J. H., Mark J. L., Henry H. D., Department of Animal Science and the Food Safety Center of Excellence The University of Tennessee,2005

Philpot, W. N. And Nickerson, S. C. (1991). Mastitis: Counter Attack. First Ed., Babson Bros. Co., Illinois.

Philpot, W.N. , Nickerson, S.C. (1991). Mastitis: Counter Attack. Bobson Bros Co.,

Illinois, Usa. P.: 3-21.

Radostitis, O.M., Blood, D.C. And Gay, C.C. (1995) Veterinary Medicine. Eight Edition 563-627.

Rişvanlı A, Kalkan C. (2002): Sütçü İneklerde Yaş ve Irkın Subklinik Mastitisli Memelerin Sütlerindeki Somatik Hücre Sayıları ile Mikrobiyolojik İzolasyon Oranlarına Etkisi. YYÜ. Vet. Fak. Derg. 13 (1-2):84-87.

Rişvanlı A. Elazığ Bölgesi Süt ineklerinde klinik ve subklinik mastitislerin dağılımı, mastitislere sebep olan mikroorganizmaların izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıkları üzerine çalışma. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Elazığ, 2001

Robinson R.K ,1990. Dairy Microbiology-The Microbiology of Milk Products. 2 nd Ed. Vol.2., Elsevier Applied Science, London and New York, 1981.

Sakız, H., Doğanelli, M., Akkayan, C. (1973). Veteriner Doğum Bilgisi ve Jinekoloji. A.Ü. Vet. Fak. Yay. 175. 569-595.

Sanchez D., A. Contreras, J.C. Corrales Departamento de Patologa Animal (Enfermedades Infecciosas), Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia. Campus Universitario de Espinardo 30071, Murcia, Spain Received 1997

Schallm, O. W., Carroll, E. J. and Jain, N. C. (1971). Bovine Mastitis. First Ed., Lea-Febiger, London

Sokari T (1991): Distribution of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in ready to eat foods in eastern Nigeria. Int J Food Microbiol, 12, 275-280.

Sönmez, R., AlpbazA., Kızılay E., (2000) Doğu Friz Kıvırcık Melezlerinde Verim Özellikleri Üzerine Bir Araştırma. E.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları 285, Bornova-İzmir.

Şahin M., Çolak A., Otlı S., ve ark. Kars yöresi ithal simental ineklerinde subklinik ve klinik mastitislerin görülme oranları ve etkili antibiyotiklerin belirlenmesi. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 1999, 3:49-5

Şimşek H., Aksakal H. Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Elazığ/Türkiye Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Teknolojisi Dergisi 1(3).

Tormod M., Steinar W., Tore T., Bjorg K. and Stale S., Animal Clinical Sciences, Norwegian School of Veterinary Science, PO Box 8146 Dep, N-0033 Oslo, Norway(2007)

Trinidad P, Nickerson SC, Luther DG. Antimicrobial susceptibilities of staphylococcus species isolated from mammary glands of unbred and primigravid dairy heifers. J Dairy Sci 1990, 73:357-362.(2001)

Tripathi R.M, Raghunath R, Sastry V.N, Krishnamoorthy T.M. Daily intake of heavy metals by infants through milk and milk products. The Science of the Total Environment 1999; 227:229-23580. Trombetta D, Cristanib M, Giofre F,(1999)

Trombetta D., Cristanib M, Giofre F, Martino D, Calo M, Naccaria F. Levels of “toxic” and “essential” metals in samples of bovine milk from various dairy farms in Calabria, Italy. Environment International 2004; 30: 1– 6(2004)

TSI ISO 13366-1 Sütte Direkt Somatik Hücre Sayımı Metodu

Ulusoy, E, İzgür, M., Akay, Ö., Diker, K. S., Aydın, N., Arda, M. (1986). Mastitisli İnek Sütlerinden İzole Mikroorganizmaların İdentifikasyonları ve Antibiyotiklere Duyarlılıkları Üzerinde Bir Araştırma, A. U. Vet. Fak. Derg., 32: 385 - 370.

Vidovic M, Sadibasic A, Cupic S, Lausevic M. Cd and Zn in atmospheric deposit, soil, wheat, and milk. Environmental Research 2005; 97: 26–31.

Walter Mertz, “Trace Elements in Human And Animal Nutrition-15th Edition”Volume 1 1987 Academic Press

Watts, J. L. (1988). Etiological Agents of Bovine Mastitis, Vet. Microbiol, 16: 41-66

Wilson DJ, González RN, Hert J, Schulte HF, Bennett GJ, Schukken YH, Gröhn YT: Effect of clinical mastitis on the lactation curve: a mixed model estimation using daily milk weights. J Dy Sci 87:7:2073-2084, 2004

Yıldırım N., Sezen İ.Y., Ardıç N., İleri Ç., GYTE, GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Mikrobiyoloji ve Kl. Mik. Servisi/ İSTANBUL

Yıldız A., Fırat Üniversitesi Sağlık Bil. Dergisi 2003, 17 (1), s. 65-69

ÖZGEÇMİŞ

Özcan BUDAK 1979’da GEBZE-KOCAELİ’de doğdu. İlkokul eğitimini Darıca İlkokulunda, ortaokul eğitimini Darıca Ortaokulunda tamamladı. Lise öğrenimini Neşet Yalçın Süper Lisesinde 1997-1998 de tamamladı. 1998 yılında Marmara Üniversitesi Sağlık Hizmetleri M.Y.O. kazandı ve 2000 yılında mezun oldu. 2000 yılında Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü kazandı, 2004’de lisans eğitimini bitirdi. Aynı yıl G.Y.T.E. Fen Fakültesi Biyoloji ana bilim dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı.