

KURU DÖNEM BAŞLANGICINDA SUBKLİNİK MASTİTİSLİ İNEKLERDEN İZOLE EDİLEN STAFİLOKOK SUŞLARINDA METİSİLİN DİRENCİ

Ekrem KİREÇCİ*

Armağan ÇOLAK**

Geliş Tarihi : 30.04.2002

Özet: Bu çalışmada, subklinik mastitisli süt ineklerinden izole edilen stafilocok suşlarındaki metisilin direnci araştırıldı. 82 adet inekten alınan 328 süt numunesi, California Mastitis Test (CMT) ile subklinik mastitis yöntünden incelendi. CMT pozitif bulunan 140 (%42.7) süt örneğinde yapılan bakteriyolojik incelemelerde 122 (%87.1)'sinde mikroorganizma izole edildi. İzole edilen toplam 168 mikroorganizmadan 86 (%51.2)'sı stafilocok ve 82 (%48.8)'si diğer mikroorganizmalar olarak tanımlandı. İzole edilen toplam 86 stafilocok suşunun 23 (% 26.7)'ü koagülaz pozitif *Staphylococcus aureus*, 63 (% 73.3)'ü ise koagülaz negatif stafilocok (KNS) suşu olarak tespit edildi. İncelenen *Staphylococcus aureus* suşlarının 2 (% 8.7)'si metisiline dirençli iken, 19 (%82.6)'u metisiline duyarlı bulundu. Buna karşılık KNS suşlarının 1 (%1.6)'inin metisiline dirençli, 62 (%98.4)'sinin ise metisiline duyarlı olduğu tespit edildi. 2 (%8.7) *Staphylococcus aureus* suşunda metisiline orta derece duyarlılık saptarken, KNS'lerde orta derece duyarlılık görülmedi.

Anahtar sözcükler: Subklinik mastitis, inek , metisilin direnci

Methicillin Resistance in Staphylococci Strains Isolated from Dairy Cows with Subclinical Mastitis the Onset of the Dry Period

Summary: In this study, the resistance of methicillin in staphylococci strains isolated from dairy cows with subclinical mastitis were investigated. 328 milk samples collected from 82 dairy cows were examined for subclinical mastitis with California Mastitis Test (CMT). 140 (42.7%) milk samples were found positive by CMT. In bacteriological examination of CMT positive milk samples, 122 (87.1%) were found positive. Of total 168 microorganisms isolated from 122 milk samples, 86 (51.2%) Staphylococci and 82 (48.8%) other microorganisms were identified. Of the isolated staphylococci, 23 (26.7%) were coagulase positive *Staphylococcus aureus* and 63 (73.3%) coagulase negative staphylococci (CNS). Two of the 23 *Staphylococcus aureus* strains (8.7%) were found resistant to methicillin while 19 of the *Staphylococcus aureus* strains (82.6%) were found sensitive. On the other hand, 1 of the 63 (73.3%) CNS strains were found resistant to methicillin (1.6%) while 62 (98.4%) of the CNS strains were found sensitive. In addition, 2 of the 23 *Staphylococcus aureus* strains (8.7%) were found intermediate to methicillin while CNS strains were not found intermediate sensitive to methicillin.

Key words: Subclinical mastitis, dairy cow, methicillin-resistance.

GİRİŞ

Kuru dönem, memenin enfeksiyona en duyarlı olduğu dönemdir. Kuru dönemde meme içi enfeksiyon görülme riskinin laktasyona oranla oldukça fazla olmasının nedeni; laktasyon sonunda sağlımdan memede bırakılan sütün meme içi basıncını artırması ve sonuçta meme başlarında kısmi genişlemelere yol açmasıdır. Bu nedenlerden ötürü kuru dönem, mastitis kontrolü açısından son derece önemlidir^{1,2}. Kuru dönemdeki enfeksiyonlara genellikle; stafilocok, streptokok veya miks kültürleri neden olmaktadır. Tedavide sürüde dominant bakteriler saptanarak, antibiyogram sonucuna göre antibiyotik verilmelidir. Antibiyotik duyarlılık testleri özellikle penisilinaz üreten stafilocoklar için son derece önemlidir^{2,3}.

Günümüzde stafilocokların yapmış olduğu enfeksiyonların sağaltımında en önemli sorunlardan biri de metisilin direncidir. Metisiline direnç mekanizmaları oldukça karmaşıktır. Stafilocoklardaki metisilin direnci sıklıkla β -laktam antibiyotiklere çok

düşük affinitesi olan PBP_{2a} aracılığıyla meydana gelir. Metisilin direnci ilk olarak 1960' lı yıllarda ortaya çıkmış ve direncin yayılımı nisbeten yavaş olmuştur. Ancak 1970'lerden sonra hızla artmıştır. Stafilocok suşları, özellikle de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) bu direnç mekanizması ile penisilinlere, sefalosporinlere ve diğer tüm beta laktam antibiyotiklere de direnç göstermektedir^{4,5}.

Bu çalışmada kuru dönemin başlangıcında, mastitisli ineklerin sütlerinden izole edilen, *S.aureus* ve koagülaz negatif stafilocok (KNS) suşlarının metisiline in-vitro duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Çiftliğinde bulunan Holstein ve Montafon ırkı 4-9 yaşlı ve en az bir doğum yapmış 82 adet inek çalışmanın materyalini oluşturdu. İnekler kuruya çıkartılmadan önce memeler mastitis açısından klinik olarak ve California Mastitis

* Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum-TÜRKİYE

** Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Erzurum-TÜRKİYE

Test(CMT) ile⁶ muayene edildi. CMT'ye pozitif sonuç veren hayvanlardan bakteriyolojik izolasyon ve identifikasyon için aseptik şartlarda süt örnekleri alındı. Süt örneklerinden etken izolasyonu için %5 koyun kanı ilave edilmiş Blood agar (Oxoid), Mannitol Salt agar (Acumedia) ve EMB (Oxoid) gibi genel ve selektif besiyerleri kullanıldı. Çalışmada izole edilen Gram negatif etkenler dikkate alınmadı. Stafilocok şuşlarının identifikasyonu; koloni morfolojisi, üreme ve Gram boyanma özelliklerinin yanı sıra, pigment yapısı, katalaz ve koagulaz testleri gibi klasik yöntemler kullanılarak gerçekleştirildi^{7,8}.

Metisilin direnci, National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) kriterlerine göre, disk-difüzyon yöntemi ile yapıldı. Mueller Hinton agar (Oxoid) besiyerine 0.5 Mc Farland eşeline uygun (10^8 bakteri/ml) serum fizyolojik içinde süspansiyon hazırlanan bakterilerin ekimi yapıldı. 1 µg oksasilin (Oxoid) diski konularak 35°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra 11 mm altında zon çapı oluşturanlar dirençli, 11-12 mm orta derece duyarlı, 13 mm üstündekiler dirençli olarak değerlendirildi⁹.

BULGULAR

35 adet CMT pozitifliği saptanan inekten alınan 140 adet süt örneğinden 86 stafilocok şuşu izole edildi. Bu stafilocok şuşlarının 23 (% 26.7)'ü *S. aureus*, 63 (% 73.3)'ü ise koagulaz negatif stafilocok (KNS) şuşu olarak tespit edildi. İzole edilen *S.aureus* şuşlarının 2 (% 8.7)'si, KNS şuşlarının 1 (%1.6)'i metisiline dirençli, buna karşılık KNS şuşlarının 62 (%98.4)'si, *S.aureus* şuşlarının 19 (%82.6)'u metisiline duyarlı bulundu. Ayrıca, 2 (%8.7) *S.aureus* şuşunda metisiline orta derece duyarlılık saptanırken, KNS'lerde orta derece duyarlılık görülmedi (Tablo1).

Tablo 1. İzole edilen stafilocok şuşlarının metisiline duyarlılıkları.

Table 1. The methicillin sensitivity of isolated staphylococci strains

Mikroorganizma	Duyarlı		Orta duyarlı		Dirençli	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Metisiline duyarlı <i>S. aureus</i>	19	82.6	-	-	-	-
Metisiline dirençli <i>S. aureus</i>	-	-	-	-	2	8.7
Metisiline orta duyarlı <i>S. aureus</i>	-	-	2	8.2	-	-
Metisiline duyarlı KNS*	62	98.4	-	-	-	-
Metisiline dirençli KNS*	-	-	-	-	1	1.6

*KNS: Koagulaz negatif stafilocok

TARTIŞMA ve SONUÇ

Ülkemiz ve dünyada yapılan çalışmalara göre ineklerde mastitise neden olan mikroorganizmaların başında stafilocoklar ve özellikle de *S. aureus* gelmektedir¹⁰⁻¹³. Kuru dönemde subklinik mastitise neden olan en önemli patojen etkenin *S.aureus* olduğu ve sürülerde bu etkenden kaynaklanan subklinik mastitişin %25-75 oranında gözlemlendiği ifade edilmektedir^{14,15}.

Stafilocokların neden olduğu mastitislerin tedavisinde istenilen sonuçların alınmaması, stafilocoklara karşı yeni, etkili antibiyotiklerin gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır¹⁶. Stafilocok enfeksiyonlarına karşı β-laktam (penisilin ve sefalosporin) grubu antibiyotikler kullanılmaktadır. Ancak, bu etkenler β-laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç kazanmakta ve antibiyotiği etkisiz hale getiren β-laktamaz enzimi sentezlemektedirler^{16,17}. Mastitisli sütlerden izole edilen stafilocoklarda yüksek oranda β-laktamaz enzim aktivitesi tespit edilmiştir¹⁸.

Stafilocok enfeksiyonlarının tedavisinde, penisilin ve sefalosporinler gibi β-laktam antibiyotiklere göre β-laktamazlara dayanıklı olan antibiyotikler (ok-sasilin, metisilin, kloksasilin) geliştirilerek hem beşeri hem veteriner sahada klinik kullanıma girmiştir^{5,19}. Fakat son 30 yılda metisiline (ok-sasilin) dirençli olan şuşlar gelişmesi, stafilocokal enfeksiyonların tedavisinde tüm dünyada önemli sorun olmuştur²⁰.

Sunulan çalışmada kuru dönem subklinik mastitislerden izole edilen 86 stafilocok şuşunun metisiline duyarlılık ve dirençlilikleri incelenmiş, şuşların 5 (%5.8)'inin dirençli, 81 (%94.2)'inin ise duyarlı olduğu belirlenmiştir. Devriese ve ark.²¹ 20 farklı sürü üzerinde yaptıkları epidemiyolojik çalışmada, mastitisli sütlerden 68 metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) şuşu izole etmişlerdir. Yapılan çalışmalarda MRSA'ların yanı sıra, koagulaz negatif stafilocok (KNS) şuşlarının da metisiline direnç ve duyarlılıkları incelenmiştir. Bu amaçla, Mork ve ark.²² akut, subklinik ve kronik mastitisli sütçü ineklerden 1600 adet penisiline dirençli stafilocok izole ettiklerini, ancak 2 vakada metisiline dirençli koagülaz negatif stafilocok (MRKNS) bulduklarını bildirmektedirler. Aynı çalışmada izole edilen 2 MRKNS şuşu *Staphylococcus haemolyticus* (*S. haemolyticus*) olarak tanımlanmış ve bu şuşların insan hastalıklarında rol alan *S. haemolyticus* ile genetik yakınlığı olduğu tespit edilmiştir²². Yoshida ve ark.²³ mastitis vakalarından elde ettikleri 80 stafilocok şuşunun 4'ünün MRKNS olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, araştırmacılar aynı çalışmada izole ettikleri MRKNS'lerin 2'sini *Staphylococcus epidermidis*, 1'ini

Staphylococcus xylosum ve 1'ini ise *Staphylococcus lentus* olarak tiplendirmişlerdir.

Çalışmamızda metisilin direnci düşük oranda bulunmuş olup, β -laktamaza dayanıklı antibiyotiklerin (metisilin, kloksasilin, oksasilin) stafilokokal mastitislere etkili bir tedavi seçeneği olarak yerini hala korumakta oldukları saptanmıştır.

Sonuç olarak, metisiline dirençli olan suşların tüm β -laktamlara dirençli kabul edilmesi nedeniyle, stafilokokal mastitislere yapılan in-vitro duyarlılık testlerinde metisilin dirençliliğinin araştırılması gerekmektedir. Bir çok ülkede beşeri hekimlikte stafilokok suşlarında metisilin direncinin tespiti tedavide önemli bir kriter olarak ele alınmaktadır. β -laktamlara dayanıklı olan antibiyotiklere direnç gelişimi, veteriner hekimliğinde henüz bir sorun teşkil etmezken, kullanımının artmasıyla birlikte direnç gelişimi görülecektir. Bu nedenle mastitis tedavisinde metisilin direncinin önemli bir faktör olarak dikkate alınmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- 1 Alaçam E, Dinç DA, Erganiş O, Tekeli T, Uçan S, Sezen S: Sağlıklı ve subklinik mastitisli ineklerde kuru dönemde antibiyotik uygulamalarının etkisi. *Türk Vet Hay Derg*, 18, 241-250, 1994.
- 2 Baştan A: İneklerde kuru dönem ve mastitis açısından önemi. Süt İneçiliğinde Mastitis Sempozyumu, 4-5 Mayıs, Burdur, 147-152, 2001.
- 3 Sandholm M: A critical view on antibacterial mastitis therapy. In: Sandholm M, Honkanen-Buzalski T, Kaartinen L, Pyörala S (Ed.): *The Bovine Udder and Mastitis*. Gummerus Kirjapaino Oj, Helsinki, 169-186, 1995.
- 4 Çetinkaya Y, Ünal S: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* infeksiyonları: Epidemiyoloji ve kontrol. *Flora*, 1(3,Ek): 3-14, 1996.
- 5 Ünal S: Stafilokoklarda metisilin direnç mekanizmaları ve metisilin direnç tespit yöntemleri. *Flora*, 1:1 4-17, 1996.
- 6 Schalm OW, Carrol EJ, Jain NC: *Bovine Mastitis*. Lea Febiger, Philadelphia, 302-348, 1971.
- 7 Arda M: Temel Mikrobiyoloji. 1. Baskı, Medisan Yayın Serisi, No:25, Ankara, 1997.
- 8 Baron EJ, Finegold SM: *Diagnostic Microbiology*, 8th ed, Mosby Comp, Philadelphia, 1990.
- 9 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS): Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Tests. 5th ed. Approved Standard. Document M2-A5. Villanova, Pa: NCCLS, 1993.
- 10 Arda M, İstanbuloğlu E: Mastitise sebep olan aerobik, mikroaerofilik, anaerobik bakterilerin izolasyonu ve identifikasyonu üzerinde çalışmalar. TÜBİTAK-VHAG-304, Kesin Rapor, 1979.
- 11 Ateş M, Serpek B, Erganiş O, Çorlu M: Konya yöresinde mastitisli ineklerden elde edilen sütlerin mikrobiyal florası ve LDH aktiviteyi üzerinde araştırmalar. *Doğa Türk Vet Hay Derg*, 16: 19-29, 1991.
- 12 Erganiş O, Kaya O, Kuyucuoğlu Y: İnek mastitislerine neden olan mikroorganizmalar ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Vet Hek Bir Derg*, 5(3), 49-50, 1993.
- 13 Francis PG, Carroll PJ: Antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical bovine mastitis. *Vet Rec*, 29, 361-363, 1986.
- 14 Batra TR: Effect of complete dry cow treatment on mastitis control in dairy cattle. *Can J Anim Sci*, 68(2), 553-556, 1988.
- 15 Osteras O, Aursjo J, Gjøl GG, Jorstad A: Effect of dry cow therapy on subclinical mastitis: An evaluation of long acting and short acting intramammary. *J Vet Med B*, 41, 529-540, 1994.
- 16 Watts JL, Salmon AS: Activity of selected antimicrobial agents against of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections that produce β -lactamase. *J Dairy Sci*, 80: 788-791, 1997.
- 17 Craven N, Anderson JC, Jones TO: Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Vet Rec*, 118, 290-291, 1986.
- 18 Jones TO, Heath PJ: β -lactamase production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis milk. *Vet Rec*, 117, 340, 1985.
- 19 Fameree L, Devriese LA: Cloxacillin and veterinary medicine. *Aust Vet J*, 53(5): 245-246, 1977.
- 20 Ögünç D, Çolak D, Sayan M, Ögüt G: S.aureus suşlarında oksasilin direncinin saptanmasında E-test, mikrodifüzyon ve disk difüzyon yöntemlerinin karşılaştırılması. *Ankem Derg*, 15(1): 84-87, 2001.
- 21 Devriese LA, Hommez J: Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds. *Res Vet Sci*, 19(1): 23-27, 1975.
- 22 Mork T, Oppegaard H: Focus on methicillin-resistance in veterinary medicine: demonstration of methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* isolated from dairy cows with mastitis. *Norsk-Veterinaertidsskrift*, 109:8, 508-509, 1997.
- 23 Yoshida M, Kashiwagi Y, Okuda M, Tsumagari F: Differentiation of coagulase negative staphylococci (CNS) from cases of bovine mastitis and their antibiotic sensitivity. *J Vet Med*, 51:11, 893-896, 1998.