

İneklerin Süt, Meme Başı Derisi ve Burun Mukozalarından İzole Edilen Stafilokok Türlerinin Antibiyotik Direnç Profilleri

Nilgün ÜNAL * 

Murat YILDIRIM *

* Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 71451 Kırıkkale - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2009-833

Özet

Bu çalışmada, sağmal ineklerden alınan süt, meme başı derisi ve burun mukozası sürüntü örneklerinden izole ve tanımlanmış stafilokok türlerinin küçük ve orta ölçekli işletmelerdeki dağılımı ve çeşitli antibiyotiklere direnç profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Kırıkkale ve çevresinde bulunan ve rastgele seçilen 14 adet küçük ölçekli ve 5 adet orta ölçekli süt sığırcılığı işletmesinde bulunan 109 baş sağmal inekten örnekler alınmıştır. Alınan örneklerden stafilokokların izolasyon ve tanımlanması için biyokimyasal testler ve ticari kit (Kristal Gram-Pozitif İdentifikasyon Kiti, Becton Dickinson, USA) kullanılmıştır. Stafilokokların çeşitli antibiyotiklere direnç özellikleri disk difüzyon metodu ile belirlenmiştir. Tüm izolatların metisilin direncini belirlemek için sefoksitin diski ve oksasilinli agar tarama plakları kullanılmıştır. Penisilin dirençli izolatların beta-laktamaz enzimlerinin varlığı β -laktamaz (nitrocefim) identifikasyon çubukları (Oxoid) ile belirlenmiştir. Süt örneklerinden her iki işletme tipinde de %48 oranında *Staphylococcus aureus* izole edilmiştir. Elle sağımın yapıldığı küçük ölçekli işletmelerde ineklerin meme başı derisinden ve burun mukozalarından *S. aureus* izole edilirken makinalı sağımın yapıldığı orta ölçekli işletmelerde meme başı derisinden ve burun mukozalarından *S. aureus* izole edilememiştir. Farklı antibiyotik gruplarına ait 11 adet antibiyotik kullanılarak yapılan direnç analizlerinde kaynağa bağlı olarak oransal farklılık (burun-süt, %19.5-49.5) göstermesine rağmen en yüksek oranda direncin penisiline olduğu tespit edilmiştir. Metisilin dirençli *S. aureus* izole edilememiştir. Penisilin dirençli izolatların %92.7'sinde (12) β -laktamaz enziminin varlığı ortaya konulmuştur.

Anahtar sözcükler: Antibiyotik direnci, Burun mukozası, β -laktamaz, Mastitis, Meme başı derisi, Stafilokok

Antibiotic Resistance Profiles of *Staphylococci* Species Isolated from Milks, Teat Skins and Noses Mucous of Cows

Summary

The purposes of this study were to determine antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus spp.* from isolated from milks, swabs from teat skins and noses mucosas of bovine in small and middle scale dairy farms. The samples were obtained from 109 head cows, randomly selected, reared in 14 small scale and 5 medium scale dairy farms in Kırıkkale province. Isolation and identification of *Staphylococci* was made using biochemical tests and commercial micromethods (Crystal Gram-Positive Identification Kit, Becton Dickinson, USA). Resistance of *Staphylococci spp.* to various antibiotics were tested using disc diffusion test. Methicillin resistance of *Staphylococci* were determined using cefoxitin disc and oxacillin agar. Creature of β -lactamase enzyme was detected using β -lactamase (nitrocefim) identification stics (Oxoid). Forty-eight percent *Staphylococcus aureus* were isolated from bovine's milk samples in both small and medium scale dairy farms. *S. aureus* were isolated from in bovine's teat skin and noses mucosa swabs samples in small scale dairy farms, while *S. aureus* were not isolated from those of in middle scale dairy farms. It was applied to determine resistance by using 11 antibiotics which were blank to different antibiotic groups. Although the levels of resistance differed in origin of bovine samples (noses mocosa- milk, between 19.5-49.5%), the highest percentage for resistance was obtained for penicillin. Methicillin resistant *S. aureus* was not isolated in this study. Of penicillin resistant *Staphylococci*, 92.7% (12) were found to be β -lactamase positive.

Keywords: Antibiotic resistance, β -lactamase, *Staphylococci*, Mastitis, Nasal mucosa, Teat skin

GİRİŞ

Stafilokoklar, süt sığırcılığı yapılan işletmelerdeki ineklerde mastitislere neden olmakta ve önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Mastitis kontrol programlarının uygulanmadığı süt sığırcılığı işletmelerinde

stafilokokların neden olduğu mastitislere prevalansı %50'lere kadar yükselebilmektedir ¹. Mastitis, hayvan sağlığını ve süt verimini olumsuz etkilediği ve insan sağlığını da ilgilendirdiği için hastalığın etiyolojisi ve



İletişim (Correspondence)



+90 318 3573301/3328



nilkarakaya@hotmail.com

kontrolü üzerindeki çalışmalar iki yüzyılı aşkın bir süreden beri devam etmektedir ^{1,2}.

Son yıllarda, bakterilerde antimikrobiyal direncin arttığı ve bu artışın antibiyotik öncesi çağa dönüşe ve tedavi edilemeyen hastalıklara yol açabileceği bildirilmektedir. Bu durum daha pahalı antibiyotiklerin kullanılmasını gerektireceği için ekonomik kayıpları daha da artıracaktır. Dünya Sağlık Örgütüne bağlı bilimsel gruplar ve çok sayıda diğer organizasyonlar, bakterilerde antibiyotiklere karşı gelişen direnci, halk sağlığını tehdit eden önemli tehlikelerden biri olarak tanımlamaktadır. Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç oluşumunun önlenmesi ve kontrol programlarının geliştirilmesinin hayati önemi vurgulanmaktadır ³.

Hayvanlarda tedavi ya da koruyucu amaçlı kullanılan antibiyotikler, patojen ve normal flora bakterilerinde seleksiyon baskısı oluşturarak antimikrobiyal direncin oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Bu nedenle sağlıklı hayvanların florasındaki bakteriler, direnç genleri için taşıyıcı rol almaktadır. Direnç genleri taşıyan patojen ve flora bakterileri doğrudan temas ya da gıdalarla insan florasına kolonize olabilmekte ve direncin insan patojenlerine geçmesine aracılık edebilmektedir. Sonuç olarak, hayvanlardan izole edilen bakterilerdeki antibiyotik direncinin giderek artması hayvan enfeksiyonlarının tedavisinde oluşacak başarısızlıklar yanında halk sağlığı açısından da oldukça önemlidir ⁴.

İnek mastitislerinin tedavisinde penisilin, tetrasiklin ve aminoglikozid grubu antibiyotiklerin yaygın olarak kullanıldığı ve mastitisli inek sütlerinden izole edilen stafilocok suşlarında bu antibiyotiklere karşı direncin arttığı bildirilmektedir ⁵.

Bu çalışmada küçük ve orta ölçekli süt sığırcılığı işletmelerindeki ineklerin süt, burun mukozası ve meme başı derilerinden izole ve tanımlanmış stafilocok türlerinin dağılımı ile çeşitli antibiyotiklere direnç profillerinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Örneklerin Toplanması

Bu çalışmada Kırıkkale ili ve çevresinde bulunan rastgele seçilen 14 adet küçük ölçekli (1-9 baş arası sağmal inek) ⁶, 5 adet orta ölçekli (10 ve 20 baş arası sağmal inek) ⁶ toplam 19 adet süt sığırcılığı işletmesi Nisan 2005-Ocak 2006 tarihleri arasında ziyaret edildi. Küçük ölçekli işletmelerde elle sağım, orta ölçekli işletmelerde makineyle sağım uygulanmaktaydı. Bu işletmelerde bulunan laktasyonun çeşitli evrelerindeki değişik ırk ve yaşlarda bulunan küçük ölçekli işletmelerden 49 ve orta ölçekli

işletmelerden 60 baş olmak üzere toplam 109 sağmal ineğin sağ ve sol burun mukozasından 218 adet sürüntü örneği steril swaplarla alınarak Cary-Blair transport medium içinde aynı gün laboratuvara buz sandıkları içinde nakledildi. Burun sürüntü örneği alınan hayvanların memeleri su ve sünger yardımıyla temizlenip kurulandıktan sonra ilk önce her meme başı derisinden steril swaplarla 436 sürüntü örneği alındı. Daha sonra her meme başı %70'lik alkollü bez yardımıyla silindikten sonra 429 meme lobuna Uluslararası Sütçülük Federasyonu kriterlerine göre California Mastitis Testi (CMT) uygulandı ve 429 meme lobundan 10 ml miktarında süt örnekleri alındı ⁷.

Mikrobiyolojik İncelemeler

Laboratuvara getirilen süt örneklerinden 10 µl miktarında alınıp %5 koyun kanlı agara stafilocok izolasyonu için ekildi ve 37°C'de aerobik şartlarda 24 saat inkübe edildi. İneklerden alınan burun mukozası ile meme başı derisi sürüntü örnekleri stafilocok izolasyonu için "Stafilocok Medium 110" (Oxoid) agara ekilerek aerobik şartlarda 35°C' de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra stafilocok şüpheli koloniler kanlı agarda (%5 koyun kanı içeren) saflaştırıldı. Gram özellikleri, hemoliz oluşumu, katalaz testi ve modifiye oksidaz testi yapılarak stafilocok cinsi olarak tanımlandı ⁸. Stafilocokların tür ayırımı için tavşan plazması ile tüp koagülaz testi yapıldı. Hayvan suşları arasında tüp koagülaz pozitif olan *S. aureus*, *S. intermedius* ve *S. hyicus* türlerinin ayırımı için asetoin testi (Voges-Proskauer test) ile mannitolün anaerobik kullanımı testleri yapıldı. Tüp koagülaz testi, asetoin testi pozitif olan mannitolü anaerobik olarak kullanan suşlar *S. aureus* olarak tanımlandı ⁹. Asetoin ve tüp koagülaz testi negatif olan stafilocoklar (KNS)'in tanımlanması için Kristal Gram-Pozitif İdentifikasyon Kiti (Becton Dickinson - USA) kullanıldı.

Stafilocokların Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi

İzole ve tanımlanmış stafilocok suşlarının β-laktam [penisilin (10 U), sefalotin (30 µg)], makrolid [eritromisin (15 µg)], aminoglikozid [gentamisin (10 µg)], fluorokinolon [enrofloksasin (5 µg)], tetrasiklin (30 µg), trimetoprim-sulfametaksazol (1.25/23.75 µg), rifampin (5 µg), sefoksitin (30 µg), vankomisin (30 µg) ve linezolid (30 µg) (Bioanalyse) antibiyotiklerine direnç özellikleri disk difüzyon testi ile Mueller-Hinton (Oxoid) agarda Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)) kriterlerine göre yapılarak değerlendirildi ¹⁰. Testin yapılmasında kalite kontrol olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşu kullanıldı.

Stafilocoklarda metisilin direncini belirlemek için sefoksitin diski ve oksasiline tarama plakları kullanıldı.

Stafilokok kültürlerinden, NaCl (%4 w/v; 0.68 mol/l) ve 6 µg oksasilin/ml içeren Mueller-Hinton agara inokulasyon yapıldı. Kültürler, Mc Farland 0.5'e göre sulandırıldıktan sonra agarın yüzeyine steril swap yardımıyla ekildi ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Ekim hattında bir koloninin bile üremiş olması, test edilen bakteri suşunun oksasiline dirençli olduğunu gösterdi ¹⁰.

Stafilokokların β-laktamaz Aktivitelerinin Belirlenmesi

Stafilokok suşlarında β-laktamaz üretimini tespit etmek için β-laktamaz (nitrocefin) identifikasyon çubukları (Oxoid) kullanıldı. Test, üretici firmanın önerisi doğrultusunda prosedüre göre uygulandı. Çubuklara, Mueller-Hinton agarda üreyen kolonilerden sürülmüş ve çubuklar nemli ortamda 5, 15 ve 30. dakikalarda oluşan renk değişimine göre gözle değerlendirildi. Koyu pembe-kırmızı renk oluşumu pozitif ve rengin değişmemesi negatif olarak kabul edildi.

İstatistik Analizler

Gruplar arası farklılıkların önem kontrolü ki-kare (χ^2) testi ile; gözlem sayısı 5'den az olanlarda ise Fisher'in kesin ki-kare testi ile yapıldı.

BULGULAR

Mikrobiyolojik İncelemeler

İneklerde CMT ile elde edilen bulgular **Tablo 1**'de verildi. Toplam 109 inekten 54'ünde CMT'nin pozitif olduğu saptandı. CMT sonuçlarına göre mastitisli ineklerin oranı küçük ve orta ölçekli işletmelerde sırasıyla %55.1 ve %45.0 olarak belirlendi, ancak aradaki farklılık istatistik olarak önemsiz ($P>0.05$, $\chi^2 = 0.294$) bulundu. CMT +1, +2, +3 değerlerinde küçük ve orta ölçekli işletmelerde toplam 41 ve 33 stafilokok üremesi tespit edildi.

Tablo 1. CMT ile elde edilen bulgular

Table 1. The results of CMT

CMT Bulguları	Süt Sığırcılığı İşletmeleri		Toplam	
	Küçük Ölçekli	Orta Ölçekli		
İnek Sayısı (Alınan Süt Örneği)	49 (194)	60 (235)	109 (429)	
CMT Pozitif İnek Sayısı (Meme Lobu)	27 (69)	27 (52)	54 (121)	
CMT Pozitif İnek %'si	55.1	45.0	49.5	
CMT Test Skorları	+1 (Stafilokok üremesi)	18 (9)	9 (4)	27 (13)
	+2 (Stafilokok üremesi)	29 (17)	26 (17)	55 (34)
	+3 (Stafilokok üremesi)	22 (15)	17 (12)	39 (27)
	Pozitif Toplam (Stafilokok üremesi)	69(41)	52(33)	121(74)
	Negatif (Stafilokok üremesi)	125 (9)	183 (12)	308 (21)

Bakteriyolojik incelemeler sonucunda süt örneklerinden 95 stafilokok suşu izole edildi. İzole edilen stafilokokların 50'si küçük ölçekli işletmelerden 45'i orta ölçekli işletmelerden elde edildi. Küçük ve orta ölçekli işletmelerde süt kökenli örneklerden *S. aureus* oranı sırasıyla %48.0 ve %48.9'dur. Süt örneklerinden en çok izole edilen ikinci stafilokok türü ise küçük ve orta ölçekli işletmelerde sırasıyla %16.0 ve %15.6 oranında *S. haemolyticus*'tur.

Meme başı derisi sürüntü örneklerinden 218 stafilokok suşu izole edilmiştir. Bu izolatların 105 tanesi küçük ölçekli işletmelerden, 113 tanesi orta ölçekli işletmelerden elde edildi. Küçük ve orta ölçekli işletmelerde meme başı derisi kökenli *S. aureus* izolasyon oranı sırasıyla %33.3, %0.0'dır. Küçük ölçekli işletmelerde meme başı derisi örneklerinden en çok izole edilen stafilokok türü *S. aureus*, ikinci sırada ise %19.0 oranıyla *S. haemolyticus* izole edildi. Orta ölçekli işletmelerde meme başı derisi kökenli örneklerden en çok %28.0 oranında *S. haemolyticus* ve ikinci sırada da %18.4 oranında *S. saprophyticus* izole edildi.

Burun sürüntü örneklerinden 87 stafilokok suşu izole edildi. İzole edilen stafilokokların 48 tanesi küçük ölçekli işletmelerden 39 tanesi orta ölçekli işletmelerden elde edildi. Küçük ve orta ölçekli işletmelerde burun mukoza kökenli *S. aureus* oranı sırasıyla %6.3, %0.0'dır. Burun mukoza örneklerinden en çok izole edilen bakteri türü her iki tip işletmede de *S. haemolyticus* olmuştur. Küçük ölçekli işletmede bu türün izolasyon oranı %22.9 olurken orta ölçekli işletmede bu oran %30.7'dir.

Her iki tip işletmede de mastitislere neden olan stafilokoklar arasında ilk sırayı *S. aureus*'un aldığı tespit edildi.

İzole ve identifiye edilen stafilokok izolatlarının küçük ve orta ölçekli süt sığırcılığı işletmelerine göre dağılımları **Tablo 2**'de verilmiştir.

Tablo 2. Küçük ve orta ölçekli süt sağırcılığı işletmelerinden izole edilen stafilocok suşları**Table 2.** *Staphylococci spp. isolated from small and middle scale dairy farms*

Mikroorganizma	Küçük Ölçekli İşletmeler			Orta Ölçekli İşletmeler			Toplam
	Süt n (%)	Memebaşı Derisi n (%)	Burun n (%)	Süt n (%)	Memebaşı Derisi n (%)	Burun n (%)	
<i>S. aureus</i>	24 (48.0)	35 (33.3)	3 (6.3)	22 (48.9)	0 (0.0)	-	84 (21.0)
<i>S. auricularis</i>	-	2 (1.9)	-	-	1 (0.9)	-	3 (0.8)
<i>S. capitis</i>	-	4 (3.8)	3 (6.3)	1 (2.2)	13 (11.4)	1 (2.6)	22 (5.5)
<i>S. cohnii spp. cohnii</i>	1 (2.0)	-	-	1 (2.2)	1 (0.9)	1 (2.6)	4 (1.0)
<i>S. epidermidis</i>	7 (14.0)	-	3 (6.3)	1 (2.2)	-	-	11 (2.8)
<i>S. equorum</i>	-	1 (0.9)	1 (2.0)	-	-	7 (17.9)	9 (2.3)
<i>S. felis</i>	-	-	1 (2.0)	-	-	-	1 (0.3)
<i>S. haemolyticus</i>	8 (16.0)	20 (19.0)	11 (22.9)	7 (15.6)	32 (28.0)	12 (30.7)	90 (22.5)
<i>S. hominis</i>	-	4 (3.8)	-	-	4 (3.5)	-	8 (2.0)
<i>S. hyicus</i>	-	5 (4.7)	-	1 (2.2)	2 (1.7)	3 (7.7)	11 (2.8)
<i>S. intermedius</i>	1 (2.0)	-	-	-	1 (0.9)	-	2 (0.5)
<i>S. kloosii</i>	-	-	1 (2.0)	-	1 (0.9)	1 (2.6)	3 (0.8)
<i>S. lentus</i>	-	-	-	1 (2.2)	-	-	1 (0.3)
<i>S. lugdunensis</i>	4 (8.0)	6 (5.7)	2 (4.1)	2 (4.4)	5 (4.3)	-	19 (4.8)
<i>S. saprophyticus</i>	1 (2.0)	5 (4.7)	3 (6.3)	3 (6.7)	21 (18.4)	2 (5.1)	35 (8.8)
<i>S. schleiferi spp. schleiferi</i>	-	1 (0.9)	1 (2.0)	-	3 (2.6)	-	5 (1.3)
<i>S. simulans</i>	2 (4.0)	7 (6.6)	3 (6.3)	2 (4.4)	8 (7.0)	5 (12.8)	27 (6.8)
<i>S. vitulinus</i>	-	2 (1.9)	-	-	1 (0.9)	-	3 (0.8)
<i>S. warneri</i>	2 (4.0)	7 (6.6)	5 (10.4)	4 (8.9)	16 (14.0)	3 (7.7)	37 (9.3)
<i>S. xylosum</i>	-	6 (5.7)	11 (22.9)	-	4 (3.5)	4 (10.2)	25 (6.3)
Toplam	50 (100)	105 (100)	48 (100)	45 (100)	113 (100)	39 (100)	400 (100)

Antibiyotiklere Direnç Profili

Süt örneklerinden izole edilen stafilocok türlerinin direnci, penisiline %49.5 (47), tetrasikline %34.7 (33), eritromisine %10.5 (10), trimetoprim-sulfametaksazole %10.5 (10), oksasiline %3.1 (3), sefalotine %3.1 (3), gentamisine %3.1 (3) olarak tespit edildi. Tüm suşlar enrofloksasine, rifampine, vankomisine ve linezolid antibiyotiklerine karşı duyarlı bulundu.

İneklerde meme başı deri sürüntü örneklerinden izole edilen stafilocok türlerinin direnci penisiline %46.3 (101), tetrasikline %26.6 (58), eritromisine %0.5 (1), gentamisine %1.8 (4), trimetoprim-sulfametaksazol'e %3.7 (8) olarak tespit edildi. Tüm suşların oksasilin, sefalotin, rifampin, enrofloksasin, vankomisin ve linezolid antibiyotiklerine duyarlı olduğu belirlendi.

İneklerde burun sürüntü örneklerinden izole edilen stafilocok türlerinin direnci penisiline %19.5 (17), tetrasikline %10.3 (9), eritromisine %2.3 (2), trimetoprim-sulfametaksazole %5.7 (5), oksasiline %2.3 (2), sefalotine %2.3 (2) olarak saptandı. Tüm suşların gentamisin, rifampin, enrofloksasin, vankomisin ve linezolid antibiyotiklerine duyarlı olduğu belirlendi.

Çalışmada izole ve tanımlanmış stafilocok suşlarının incelenen antibiyotiklere karşı direnç durumları ile küçük ve orta ölçekli işletmelere göre dağılımları [Tablo 3](#)'te verilmiştir. İneklerin sütlerinden izole edilen stafilo-

kokların penisilin direnci küçük ve orta ölçekli işletmelerde sırasıyla %46.0 (23) ve %53.3 (24); tetrasiklin direnci ise %42.0 (21) ve %26.6 (12) olarak belirlendi. Küçük ve orta ölçekli işletmelerde süt kökenli izolatların antibiyotiklere direnç farklılıkları, trimetoprim-sulfametaksazol hariç ($P < 0.05$) diğerlerinde önemsiz ($P > 0.05$) bulundu. Küçük ve orta ölçekli işletmelerde meme başı derisi kökenli izolatların antibiyotiklere direnç farklılıkları, penisilin hariç ($P < 0.001$) diğerlerinde önemsiz ($P > 0.05$) olurken; burun kökenli izolatlarda ise trimetoprim-sulfametaksazol hariç ($P < 0.01$) diğerlerinde önemsiz ($P > 0.05$) olarak tespit edildi. Tüm izolatlar kökenlerine göre antibiyotiklere direnç bakımından genel olarak karşılaştırıldığında, penisilin, tetrasiklin ve eritromisin bakımından süt, meme başı derisi ve burun kökenli izolatların direnç farklılıkları yüksek düzeyde önemli ($P < 0.001$) bulundu.

Bu çalışmada metisilin dirençli *S. aureus* belirlenmemiştir. Ancak 3 adet süt kökenli KNS ve 2 adet burun kökenli KNS'da metisilin direnci saptandı. Oksasilinli tarama plakları ve sefoksitin diski sonuçları birbirine paralel sonuçlar verdi. Metisilin dirençli olarak belirlenen izolatların penisilin grubu ve sefalotine de dirençli olduğu bildirilmektedir.

Penisiline direnç tespit edilen 47 inek süt, 17 inek burun, 101 inek meme başı derisi kökenli toplam 165 izolatın β -laktamaz üretimi test edildi ve sadece 12 izolat β -laktamaz negatif olarak belirlendi.

Tablo 3. Stafliakok suşlarının antibiyotiklere karşı direnç yüzdelerinin küçük ve orta ölçekli işletmelere göre dağılımları
Table 3. Antibiotic resistant percentages of *Staphylococci* spp. isolated from small and middle scale dairy farms

Antibiyotikler	Süt			Memebaşı Derisi			Burun			Süt n=95	Memebaşı Derisi n=218	Burun n=87	χ ²
	Küçük Ölçekli İşletme n=48	Orta Ölçekli İşletme n=39	χ ²	Küçük Ölçekli İşletme n=48	Orta Ölçekli İşletme n=39	χ ²	Küçük Ölçekli İşletme n=48	Orta Ölçekli İşletme n=39	χ ²				
Penisilin	23 ¹ (46.0) ²	24 (53.3)	0.475	30 (31.4)	71 (62.8)	0.000 ***	6 (12.5)	11 (28.2)	0.066	47 (49.5) ^a	101 (46.3) ^a	17 (19.5) ^b	0.000 ***
Tetrasiklin	21 (42.0)	12 (26.6)	0.117	23 (21.9)	35 (30.9)	0.130	3 (6.3)	6 (15.4)	0.288	33 (34.7) ^a	58 (26.6) ^a	9 (10.3) ^b	0.000 ***
Eritromisin	4 (8.0)	6 (13.3)	0.304	0 (0.0)	1 (0.8)		1 (2.0)	1 (2.5)		10 (10.3) ^a	1 (0.5) ^{bc}	2 (2.3) ^c	0.000 ***
Gentamisin	2 (4.0)	1 (2.2)	0.540	0 (0.0)	4 (3.5)	0.123	0 (0.0)	0 (0.0)		3 (3.2)	4 (1.8)	0 (0.0)	0.265
Enrofloksasin	0 (0.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)		1 (2.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Rifampin	0 (0.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Trimetoprim- Sulfametaksazol	2 (4.0)	8 (17.7)	0.043 *	2 (1.9)	6 (5.3)	0.283	0 (0.0)	5 (12.8)	0.016 **	10 (10.3) ^a	8 (3.7) ^b	7 (5.7) ^a	0.050 *
Sefoksitin	0 (0.0)	3 (6.6)	0.103	0 (0.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	2 (5.1)	0.198	3 (3.1) ^a	0 (0.0) ^b	2 (2.3) ^{ab}	0.042 *
Vankomisin	0 (0.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Sefalotin	0 (0.0)	3 (6.6)	0.103	0 (0.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	2 (5.1)	0.198	3 (3.1) ^a	0 (0.0) ^b	2 (2.3) ^{ab}	0.042 *
Linezolid	0 (0.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	

1: Dirençli suş sayısı, **2:** Yüzde, - : Önemsiz (P>0.05), * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, **a, b, c:** Aynı satırda farklı harf taşıyan yüzdelere arası farklılıklar önemlidir (P<0.05)

TARTIŞMA ve SONUÇ

Mastitis, Türkiye’de ve Dünya’da önemli ekonomik kayıplara neden olan bir enfeksiyondur. Bu çalışmada CMT sonuçlarına göre küçük ve orta ölçekli işletmelerde mastitisli ineklerin oranı %55 ve %45 olarak belirlenmiştir. Aradaki farklılık istatistik olarak önemsiz olmasına rağmen küçük ölçekli işletmelerde mastitis oranı %10 daha fazla olmuştur. Yavuz ve Esenal¹¹ Türkiye’nin farklı bölgelerinden 2726 mastitis şüpheli süt örneğini somatik hücre sayımı ile değerlendirmişler ve %35 (955)’inin mastitisli olduğunu belirtmişlerdir.

Türkiye’de yapılan çalışmalarda mastitisli inek sütlerinden %28-73 arasında değişen oranlarda *S. aureus* izole edilmiştir^{1,12,13}. Bu çalışmada ise mastitisli inek sütlerinden üreyen stafilokokların hem orta hem de küçük ölçekli işletmelerde %48’i *S. aureus* olarak tanımlanmıştır ve KNS’ların izolasyon oranının da %52 olduğu belirlenmiştir. Kırkan ve ark.¹⁴ Aydın bölgesinde yaptıkları bir çalışmada mastitisli inek sütlerinden %20 KNS izole etmişlerdir. KNS’ların oluşturduğu enfeksiyonların sıklığı hem insan hekimliğinde hem de veteriner hekimlikte giderek artmaktadır.

Türkiye’de işletme başına ortalama sığır sayısı 4.7 olup, Türkiye’de büyük baş hayvancılık işletmelerinin %85.3’ü, 1-9 baş arası hayvana sahip olan küçük ölçekli işletmelerden oluşmaktadır. 20 baş ve üzeri sığır bulunan işletme oranı ise sadece %3.5 civarındadır⁶. Yapılan çalışmada küçük ölçekli işletmelerde ineklerin meme başı derilerinden %33.3, burun mukozasından ise %6.3 oranında *S. aureus* izole edilirken orta ölçekli işletmelerdeki meme başı derisinden ve burun mukozasından *S. aureus* izole edilememiştir. Bu çalışmada orta ölçekli işletmelerde sağımın makineyle küçük ölçekli işletmelerde elle yapılmasından dolayı elle sağım sırasında bakıcıların bulaşık sütlerdeki *S. aureus* izolatlarını meme başı derisine ve diğer hayvanlara bulaştırmalarından kaynaklanabileceği düşünülebilir. Bakıcıların el ve burunlarından izole edilen *S. aureus* izolatlarının, inek meme başı derisi ve mastitisli inek sütlerinden izole edilenlerle genetik yakınlıkta olabildiği Türkiye ve dünyada yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur¹⁵⁻¹⁷. Mastitisin kontrolünde her zaman vurgulandığı gibi sağım hijyeninin önemi oldukça fazladır.

Orta ölçekli işletmelerde meme başı derisinden en çok %28.0 (32) oranında *S. haemolyticus*, ikinci sırada %18.4 (21) oranında *S. saprophyticus*, üçüncü sırada ise %14.0 (16) oranında *S. warneri* izole edilmiştir. Bu işletmelerde sütlerden en çok %48.9 (22) oranında *S. aureus*, ikinci sırada ise %15.6 (7) oranında *S. haemolyticus*, üçüncü sırada %8.9 (4) *S. warneri*, dördüncü sırada ise

%6.7 (3) oranıyla *S. saprophyticus* izole edilmiştir. Üreyen izolatlar dikkate alındığında orta ölçekli işletmelerde meme başı derisinden *S. aureus* izole edilememesine rağmen sütlerden en çok *S. aureus* izole edilmiştir. Ancak diğer deri izolatları mastitise neden olan etkenlerle paralellik göstermiştir.

Türkiye’de çeşitli bölgelerde yapılan^{1,18-23} çalışmalarda sığır orijinli stafilokoklarda, ortalama penisilin direnci %78, tetrasiklin direnci %70, eritromisin direnci %40, gentamisin direnci %43 ve enrofloksasin direnci %22 olarak bildirilmiştir. Güler ve ark.²⁴ mastitisli inek sütlerinden izole ettikleri *S. aureus* izolatlarının penisilin ve ampicilin direncini %63.3 olarak belirlerken ikinci sırada yer alan oksitetrasikline direnci ise %27.9 olarak belirlenmişlerdir. Test ettikleri oksasilin, enrofloksasin, trimetoprim-sülfametoksazol, amoksisilin-klavulanik asit, kanamisin-sefaleksim gibi antibiyotiklere çok düşük oranlarda ya da hiç dirençli suş bulamamışlardır. Yapılan bu çalışmada, en yüksek oranda direnç penisiline karşı ve küçük ölçekli işletmelerde %46.0 ve orta ölçekli işletmelerde %53.3 oranlarında tespit edilmiştir. Diğer ülkelerde inek kökenli stafilokok izolatlarında antibiyotiklere direnç profili ülkeden ülkeye değişmektedir. ABD (%50), İngiltere (%67), Tayland (%67) ve İrlanda (%71) gibi ülkelerde bizdeki gibi yüksek penisilin direnci tespit edilirken, Danimarka (%19), Norveç (%2), İzlanda (%35), İsveç (%29), Finlandiya (%29), Almanya (%25), Japonya (%27) gibi ülkelerde penisilin direnci düşük belirlenmiştir^{25,26}. Bu durumun her ülkede antibiyotiklerin kullanımı ile ilgili ulusal politikalarındaki farklılıklarla ilgili olabileceği düşüncesini akla getirmektedir.

Yapılan çalışmada, izolatların penisilin direnci ile β -laktamaz üretimi arasında yakın bir ilişki olduğu ortaya konulmuştur. Güler ve ark.’nın²⁴ ve Yoshimura ve ark.’nın⁵ yaptıkları çalışmalarda benzer sonuçlar elde edilmiş ve penisilin direncini belirlemede β -laktamaz üretiminin ortaya konmasının kullanışlı ve uygulanabilir olduğu sonucunu ortaya çıkarmıştır.

Küçük ve orta ölçekli işletmeler dikkate alındığında, süt kökenli izolatların antibiyotiklere direnç farklılıkları, trimetoprim-sülfametoksazol hariç ($P < 0.05$) diğerlerinde önemsiz ($P > 0.05$) bulunmuştur. Her iki işletme tipinde de mastitislerin sağaltımında antibiyotik kullanımının yaygın olduğu söylenebilir. Küçük ve orta ölçekli işletmelerde meme başı derisi kökenli izolatların antibiyotiklere direnç farklılıkları, penisilin hariç ($P < 0.001$) diğerlerinde önemsiz ($P > 0.05$) bulunmuştur. Bu durumun da penisilin yıllardır kullanılması ve orta ölçekli işletmelerde daha yaygın kullanılabildiği ile açıklanabilir. Tüm izolatlar kökenlerine göre antibiyotiklere direnç bakımından genel olarak karşılaştırıldığında, penisilin, tetrasiklin ve eritromisin bakımından süt, meme başı

derisi ve burun kökenli izolatların direnç farklılıkları yüksek düzeyde önemli ($P < 0.001$) bulunmuştur. Bu üç antibiyotığın en yaygın kullanılan antibiyotikler olması ve meme başı derisi ile burun florası kökenli izolatlar arasında direnç yüzdelerinin süt kökenli izolatların direnç yüzdelerine göre önemli ölçüde düşük olması, flora bakterilerinin patojenlere direnç aktarabildiği düşünülürse, antibiyotik direnç artışı tehlikesi açısından olumlu bir durum olabileceği sonucunu ortaya çıkarmıştır.

Metisilin direnci orta ölçekli işletmelerde süt kökenli KNS'lar arasında %6.6 (3) oranında ve burun mukozası kökenli KNS'larda ise %2.3 (2) oranında tespit edilmesine karşılık küçük ölçekli işletmelerde metisilin dirençli izolata rastlanmamıştır. Bu durum, yine küçük ölçekli işletmelerdeki ineklerde antibiyotik kullanımının daha az olmasından kaynaklanabilir. İneklerde eskiden beri kullanılan penisilin grubu antibiyotiğe direncin yüksek olması ve penisiline göre daha yeni antibiyotik gruplarındaki düşük direncin veya ineklerde henüz kullanılmayan rifampin, sefalotin, vankomisin, linezolid antibiyotik gruplarına ise izolatların hepsinin duyarlı olması direnç ile antibiyotiklerin kullanımı arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır. İnek meme başı derisi ve burun mukozalarından izole edilen stafilokoklarda, mastitisli sütlerden izole edilenlere göre daha düşüğe olsa antibiyotiklere direnç belirlenmiştir. Bu durum, hayvanlarda kullanılan antibiyotiklerin patojenler yanında normal flora bakterilerinde dirençli suşların seleksiyonuna neden olduğu fikrini desteklemektedir ⁴.

Sonuç olarak çalışmada farklı antibiyotik gruplarına ait 11 adet antibiyotik incelenmesi sonucu en yüksek direncin kaynağa bağlı olarak değişmekle birlikte penisiline (burun %19.5, meme başı derisi %46.3 ve süt %49.5), ikinci sırada tetrasikline (burun %10.3, meme başı derisi %26.6 ve süt %37.4) karşı olduğu belirlenmiştir. Metisilin dirençli *S. aureus* izole edilmemesine karşın ikisi inek burun mukozası ve üçü süt kökenli olmak üzere toplam 5 adet metisilin dirençli KNS tespit edilmiştir. Ayrıca elle sağımın yapıldığı küçük ölçekli işletmelerde ineklerin meme başı derilerinden ve burun mukozalarından *S. aureus* izole edilirken makineli sağımın yapıldığı orta ölçekli işletmelerde meme başı derisinden ve burun mukozalarından *S. aureus* izole edilmiştir. Hem insan hem de veteriner hekimlikte direnç sorununun önlenmesi için antibiyotik kullanımında sıkı önlemler alınmalı ve bakterilerdeki antibiyotiklere direnç oranları ulusal ve uluslar arası sörveyans çalışmaları ile düzenli olarak kontrol edilmelidir. Mastitisin tedavisinde gereksiz yere β -laktam grubu antibiyotiklerin kullanımını engellemek için de mutlaka etken izolasyonu ve antibiyotik duyarlılık testleri yapılmalı ve bunun sonucuna göre kontrol ve tedavi uygulamalarına geçilmelidir.

KAYNAKLAR

- Arda M, İstanbulluoğlu E:** Mastitislere neden olan aerob, anaerob, mikoplazma ve mantarların izolasyonu, identifikasyonu, bunlara karşı etkili olan antibiyotik ve fungusitlerin saptanması. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 26, 14-29, 1979.
- Gilot P, Lina G, Cochard T, Poutrel B:** Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. *J Clin Microbiol*, 40, 4060-4067, 2002.
- Rajala-schultz PJ, Smith KL, Hogan JS, Love BC:** Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. *Vet Microbiol*, 102, 33-42, 2004.
- Catry B, Laevens H, Devriese LA, Opsomer G, Kruijff A:** Antimicrobial resistance in livestock. *J Vet Pharmacol Therapy*, 26, 81-93, 2003.
- Yoshimura H, Ishimaru M, Kojima A:** Minimum inhibitory concentrations of 20 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections in Japan. *J Vet Med B*, 49, 457-469, 2002.
- Sakarya E:** Ekonomik Krizin Hayvancılık Sektörüne Etkisi. <http://www.abveteriner.org>, *Erişim Tarihi:* 14.08.2009.
- International Dairy Federation:** Laboratory Methods for Use in Mastitis Work. Document 132, Belgium, Brussels, 1981.
- Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR:** Clinical Veterinary Microbiology. 6th ed., pp. 118-126, Mosby Inter Ltd., Virginia USA. 2000.
- Ruoff KL, Ferraro MJ:** Presumptive identification of *Streptococcus milleri* in 5th. *J Clin Microbiol*, 24, 495-497, 1986.
- Clinical Laboratory Standards Institute:** Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-Second Ed. M31-A2 and M37-A2. Pennsylvania, USA, 2002.
- Yavuz MK, Esendal ÖM:** Mastitisli inek sütlerinden izole edilen stafilokokların tür düzeyinde identifikasyonu ve bazı özelliklerinin belirlenmesi. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*, 13, 19-27, 2002.
- Türütoğlu H, Ateşoğlu A, Salihoglu H, Öztürk M:** Marmara bölgesi süt ineklerinde mastitise neden olan aerobik etkenler. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg*, 26, 125-137, 1995.
- Beytut E, Aydın F, Özcan K, Genç O:** Kars ili ve yöresindeki ineklerde mastitislerin patolojik ve bakteriyolojik olarak incelenmesi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 8, 111-122, 2002.
- Kırkan Ş, Göksoy EÖ, Kaya O:** Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococci* from bovine mastitis in the Aydın region of Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, 29, 791-796, 2005.
- Ünal N, İstanbulluoğlu E:** İnsan ve sığır kökenli *Staphylococcus aureus* izolatlarının fenotipik ve genotipik özelliklerinin araştırılması. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 56, 119-126, 2009.
- Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Gay CC, Besser TE:** Sources of intramammary infections from *Staphylococcus aureus* in dairy heifers at first parturition. *J Dairy Sci*, 81, 687-693, 1998.
- Fox LK, Gershman M, Hancock DD, Hutton CT:** Fomites and reservoirs of *Staphylococcus aureus* causing intramammary

infections as determined by phage typing: The effect of milking time hygiene practices. *Cornell Vet*, 81, 183-193, 1991.

18. Aydın F, Leloğlu N, Şahin M, Çolak A, Otlu S: Kars yöresi süt ineklerinde klinik ve subklinik mastitislere neden olan mikroorganizmaların identifikasyonları ve antibiyotiklere duyarlılıkları üzerine çalışmalar. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg*, 26, 55-65, 1995.

19. Şahin M, Çolak A, Otlu S, Aydın F, Genç O, Güler MA, Oral H: Kars yöresi ithal simental ineklerde subklinik ve klinik mastitislere görülme oranı ve etkili antibiyotiklerin belirlenmesi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 3, 49-55, 1997.

20. Hadimli HH, Ateş M, Güler L, Kav K, Öncel T: Mastitisli süt ineklerinden izole edilen stafilocokların β -laktamaz aktiviteleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Vet Bil Derg*, 17, 21-25, 2001.

21. Kuyucuoğlu Y, Uçar M: Afyon bölgesi süt ineklerinde subklinik ve klinik mastitilerin görülme oranları ve etkili antibiyotiklerin tespiti. *Vet Hek Mikrobiyol Derg*, 1, 19-24, 2001.

22. Uçan US, Aslan E: İnek mastitislere izole edilen koagülaz pozitif stafilocok suşlarının penisilin direnci ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları. *Vet Bil Derg*, 18, 19-22, 2002.

23. Kireççi E, Çolak A: Kuru dönem başlangıcında subklinik mastitisli ineklerden izole edilen stafilocok suşlarında metisilin direnci. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 8, 98-100, 2002.

24. Güler L, Ok Ü, Gündüz K, Gülcü Y, Hadimli HH: Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. *J Dairy Sci*, 88, 3149-3154, 2005.

25. Vintov J, Aarestrup FM, Zinn CE, Olsen JE: Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 Countries. *Vet Microbiol*, 95, 133-147, 2003.

26. Ajariyakhajorn S, Samngannim K: Identification of coagulase-positive Staphylococci causing subclinical mastitis and their resistance to Penicillin and Oxacillin. p. 21, *Proceedings 8th Chula Univ Vet Sci Ann Con*, April 3, 2009.