

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI



**SIĞIR, KOYUN VE KEÇİLERDE MİKOTİK MASTİTİSLERİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Melek DEMİR

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Zafer CANTEKİN

HATAY – 2016

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

**SIĞIR, KOYUN VE KEÇİLERDE MİKOTİK MASTİTİSLERİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Melek DEMİR

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Zafer CANTEKİN

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
10840 nolu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY – 2016

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

**SİĞİR, KOYUN VE KEÇİLERDE MİKOTİK MASTİTİSLERİN
ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Melek DEMİR

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 26/02/2016 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri başkanı: Yrd. Doç. Dr. Zafer CANTEKİN

Üye: Doç. Dr. Yaşar ERGÜN

Üye: Prof. Dr. Hasan SOLMAZ

Bu tez enstitümüz Mikrobiyoloji (Vet) Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Doç. Dr. Yaşar ERGÜN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezimin belirlenmesinde, araştırma aşamasında, ve tez tamamlama aşamasında; bana inanan, gerek örnek toplama, gerek laboratuvar çalışmaları gerek tez yazımında bana klavuzluk eden, bildiklerini paylaşan bana haddinden daha fazla maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen, yanında çalışmaktan büyük onur duyduğum ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Zafer CANTEKİN'e bana ayırdığı değerli zamanı ve sağladığı destek için minnettarım ve sonsuz saygı ve hürmetlerimi sunarım.

Tez aşamasındaki çalışma süresince gerek süt örneklerinin temininde gerekse tecrübelerinden yararlandığım Doç. Dr. Yaşar ERGÜN'e, uzakta olmasına rağmen bana yol gösterip yardımlarını esirgemeyen hocam Prof. Dr. Hasan SOLMAZ'a, ayrıca yardımlarını esirgemeyen hocam Prof. Dr. Özkan ASLANTAŞ'a, manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli arkadaşlarımım Sezen TURNA ve Tuğçe BÜYÜKÖZER'e ve kıymetli zamanlarını bana ayırarak gerek çalışmalarımda gerek normal hayatta hakkı ödenmez dostum Gamze Özge ÖZMEN'e birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli arkadaşlarım, Zeynep YILMAZ ER'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca varlarını yoklarını bana adayan, benim ömür boyu mutlu olmamı isteyen, desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen, maddi manevi hep yanımda olan ve beni yüreklendiren fedakar babam Ahmet DEMİR'e, dualarını hiç esirgemeyen canım annem Sultan DEMİR'e, hayatım boyunca bana destek olan ve her zaman örnek aldığım başta Osman abim olmak üzere abilerime ve ablamlara sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT	X
1. GİRİŞ	1
1.1. Mastitis	2
1.1.1. Mastitis Formları	2
1.1.2. Mastitislerin tanısı	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Mastitise Duyarlılık Oluşturan Faktörler	5
2.2. Mastitisin Ekonomik Açıdan Önemi	5
2.3. Mastitiste Bulaşma Yolları	5
2.4. Mastitislerin Patogenezi	6
2.5. Mastitise Neden Olan Mikroorganizmalar	7
2.5.1. Kontagiyöz Mikroorganizmalar	7
2.5.2. Çevresel Mikroorganizmalar	7
2.5.3. Diğer Mikroorganizmalar	8
2.5.4. Maya ve Mantarlara Bağlı Mastitisler	9
2.5.5. Algilere (Prototheca) Bağlı Mastitisler	10
2.6. Mastitislerin Tedavisi	11
2.7. Mastitis Tedavisinde Başarısızlık Nedenleri	14
2.8. Antifungal duyarlılık testi	14
2.9. Antifungaller	16
2.10. E test	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Gereç	19
3.1.1. Örnekler ve örneklerin alınması	19
3.2. Yöntem	20
3.2.1. California Mastitis Test (CMT)	20
3.2.2. Mikolojik Kültür amacıyla süt numenelerinin alınması	20

3.2.3. Mikrobiyolojik Kùltür	26
3.2.4. Disk Diffüzyon Yöntemiyle Antifungal Direncinin Belirlenmesi	26
3.2.5. E-Test ile Minimal İnhibitör Konsantrasyonların Belirlenmesi.....	27
3.3. Moleküler Analizler	28
3.3.1. DNA İzolasyonu.....	28
3.3.2. İzolatların PCR ile Konfirmasyonu.....	29
3.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme.....	30
4. BULGULAR.....	32
5. TARTIŞMA.....	37
6. SONUÇ	43
7. KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

- Şekil 3.1.** Mueller-Hilton Agar(% 2 dektroz+0,6 µg metilen mavisi)'la yapılan antifungal disk difuzyon zonlarının görünümü..... **27**
- Şekil 3.2.** Mueller-Hilton Agar (% 2 dektroz+0.6 µg metilen mavisi)'la yapılan E Test zonlarının görünümü..... **28**
- Şekil 4.1.** *C. Albicans*'a ait 180 bp'lik bantların agaroz jelde görüntülenmesi.(M; Marker, 1000 bp plus, 1-5 ve 5-6; Agaroz Jelde *C. Albicans*'a özgül bantlar (180 bp)).
..... **33**
- Şekil 4.2.** *Aspergillus spp*'a ait 363 bp'lik bantların agaroz jelde görüntülenmesi.(M; Marker, 1000 bp plus, 2-11; Agaroz Jelde *Aspergillus spp.*'ye özgül bantlar (363 bp). **34**

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan örneklerin alındığı bölgeler ve örnek sayıları.....	19
Çizelge 3.2. Koyunlardan alınan örneklere verilen numaralar, alındığı mevkiler, meme lobları, CMT sonuçları ve verilen örnek numaraları	21
Çizelge 3.3. Keçilerden alınan örneklere verilen numaralar, alındığı mevkiler, meme lobları, CMT sonuçları ve verilen örnek numaraları	22
Çizelge 3.3. Keçilerden alınan örneklere verilen numaralar, alındığı mevkiler, meme lobları, CMT sonuçları ve verilen örnek numaraları (devam)	23
Çizelge 3.4. İneklerden alınan örneklere verilen numaralar, alındığı mevkiler, meme lobları, CMT sonuçları ve verilen örnek numaraları	24
Çizelge 3.4. İneklerden alınan örneklere verilen numaralar, alındığı mevkiler, meme lobları, CMT sonuçları ve verilen örnek numaraları (devam)	25
Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan primer dizileri ve özellikleri	30
Çizelge 4.1. İzole edilen maya ve mantar kolonilerinin türlere göre dağılımı.	32
Çizelge 4.2. Antifungal disk diffüzyon sonuçları.....	34
Çizelge 4.3. Mayalar için E-Test duyarlılık sonuçları.....	35
Çizelge 4.4. Mantarlar için E-Test duyarlılık sonuçları	35

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ark.	Arkadaşları
CMT	California Mastitis Test
DEPC	Dietil Pirokarbonat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetraacetik Asit
MHA	Mueller Hinton Agar
MIC	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
mg	Milligram
ml	Millilitre
NaCl	Sodyum Klorür
SDA	Sabouraud Dextroz Agar
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SHS	Somatik Hücre Sayısı
TBE	Tris Borat Etilendiamin Tetraacetik Asit Buffer
TES	Tris Etilendiamin Tetraacetik Asit Sodium
Ph	Asitlik sabiti
>	Büyüktür
<	Küçüktür
°C	Santigrad Derece

ÖZET

Sığır, Koyun Ve Keçilerde Mikotik Mastitislerin Araştırılması

Bu çalışmada, Hatay yöresinde sığır, koyun ve keçilerde mikotik mastitis etkenlerinin belirlenmesi ve bu etkenlerin antimikotik ajanlara karşı duyarlılıklarının araştırılması amaçlandı. Etkenlerin izolasyon ve identifikasyonları klasik kültür metodu ile yapıldı ve identifikasyonları yaygın mikotik mastitis etkenleri için moleküler analizler ile teyit edildi. İdentifikasyonlara ek olarak, izolatların antimikotik ajanlara karşı duyarlılıkları disk diffüzyon ile belirlendi. Ayrıca bu ilaçların minimal inhibitör konsantrasyonları E-test ile belirlendi.

Çalışmada 100 sığır, 100 koyun ve 100 keçiden alınan toplam 800 süt örneği kullanıldı. CMT testi pozitif olan 24 koyun süt örneğinden 2 (% 8,34) maya ve 7 (% 29,17) mantar kolonisi, 48 keçi süt örneğinden 3 (% 6,25) maya ve 15'inden (% 31,25) mantar kolonisi ve 94 sığır süt örneğinden 7 (% 7,45) maya ve 19 (% 20,22) mantar kolonisi izole edildi. İdentifikasyon ve moleküler analizlerin sonucunda, izole edilen 12 mayanın tamamının *Candida* spp. olduğu, ayrıca izole edilen mantarlardan 30'unun *Aspergillus* spp. olduğu belirlendi. Disk diffüzyon ve E-test sonucunda etkenlerin antimikotik ajanlara karşı sırasıyla Voriconazol, Ketocanazole, Posakonazole, Amphotericin B, Flucytosine, ve Itrakonazol duyarlı oldukları bulundu. Tüm etkenlerin Fluconazole karşı dirençli oldukları belirlendi.

Sonuç olarak, bu çalışmada Hatay bölgesinde sığır, koyun ve keçilerde mikotik mastitislerin yaygınlığı ve antimikotik ajanlara karşı duyarlılıkları belirlendi. Bu çalışma ile elde edilen veriler bölgede mikotik mastitislerin tedavisinde yararlı olabilir.

Anahtar Sözcükler: Mikotik mastitis, duyarlılık, E-Test, Hatay,

ABSTRACT

Investigation of Mycotic Mastitis Agents in Cattle, Sheep and Goats

In this study were aimed investigation of mycotic mastitis agents in cattle, sheep and goats in Hatay region and detection of their susceptibility against to antimycotic agents. Isolation and identification of agents were made by the classical culture method and the identifications were confirmed by molecular analyses for widespread mitotic mastitis agents. In addition to identification, susceptibility to antimycotic drugs of isolated agents was determined by disk diffusion method. And also Minimal Inhibitory Concentration against these agents was determined by the E-test.

For the sampling, totally 800 milk samples from 100 cattle, 100 sheep and 100 goats were checked for somatic cell counts. Then, 2 (% 8,34) yeast and 7 (% 29,17) fungal colonies from 24 milk samples of sheep, 3 (% 6,25) yeast and 15'inden (% 31,25) fungal colonies from 48 milk of goats and 7 (% 7,45) yeast and 19 (% 20,22) fungal colonies from 94 milk of cattle were isolated. In the result of identification and molecular analyses, all of 12 yeast isolates were identified *Candida* spp. and 30 isolates of fungi were detected *Aspergillus* spp. In the antifungal resistance test with disc diffusion and E-test, susceptibility was detected against to Voriconazol, Ketocanazole, Posaconazole, Amphotericin B, Flucytosine, and Itraconazole, respectively.

The all of isolates were resistant to Fluconazole. As conclusion, in this study were detected disturbance of mycotic mastitis in cattle, sheep and goats in Hatay region and their susceptibility against to antimycotic agents. The findings obtained with this project might be useful to treat of the mycotic mastitis for this region.

Key Words: Mycotic mastitis, susceptibility, E-Test, Hatay

1. GİRİŞ

Mastitis; meme bezinin bakteriyel, kimyasal, termal veya mekanik etkilere karşı gösterdiği yangısal reaksiyon olarak tanımlanır. Mastitis kelimesi Yunanca mastos meme, itis yangı kelimelerinden türemiştir (Philpot ve Nickerson, 2000; Biggs 2009). Genel olarak patojen bakteri, maya-mantar ve virüslerin meme bezlerini etkilemesi sonucu gelişir. Meme bezlerindeki ortamın mikroorganizmaların gelişimine fazlasıyla uygun olmasında dolayı etkenler burada hızla üreyerek çoğalırlar ve sonuçta iltihaplanma ve mastitis gelişir. İnfeksiyona bağlı olarak meme bezi ve süt kanallarında nötrofil artışı ve serum proteinlerinin artışı olur. İnfeksiyona bağlı olarak gelişen doku harabiyeti vücut tarafından tolere edilmeye çalışılır. İnfeksiyon etkenini uzaklaştırma ve yok etmeye ve ayrıca harabiyete uğrayan dokuyu onarmaya yönelik reaksiyonlar şekillenir. Etkenlerin meme içerisine girişi çoğunlukla memebaşını kullanarak dışardan olmakta, çok az bir kısmı ise vücutta bulunan sistemik bir infeksiyon etkeninin memeye geçmesiyle şekillenmektedir (Özalp 1984).

Mastitis genel olarak; etkenlerin meme dokusuna girdiği, meme dokusunda ürettiği ve meme dokusunda yangı ve harabiyete neden olduğu dönem olmak üzere üç aşamada gerçekleşmektedir. Uygun ortamda üreyen mikroorganizmalar salgıladıkları toksin ve enzimler aracılığı ile meme dokusunda yoğun harabiyete neden olurlar. Bunun sonucunda meme bezi dokusunda yangı, iltihaplanma ve meme kanallarında bozukluklar meydana gelir. Meydana gelen infeksiyon sonucunda tedavi edilmediği takdirde meme lobunun kaybı ve sütün bu lobta kesilmesi dışında tüm meme loblarında sütün kesilmesi ya da ainfeksiyonun generalize olarak sistemik bir infeksiyon şekillenmesi sonucunda hayvanın ölümüyle dahi sonuçlanabilmektedir.

Mastitislerin en önemli nedeni enfeksiyöz ajanlardır. Genel olarak mikroorganizma kaynaklı mastitisler enfeksiyöz, fiziksel travmalar sonucu oluşanlar ise non-enfeksiyöz mastitis olarak sınıflandırılmaktadır. Ancak mastitis etkenleri arasında en önemlileri sık karşılaşılması ve yüksek kayıplara neden olmaları açısından enfeksiyöz mastitislerdir. İnfeksiyöz mastitisler de etkenin kaynağına göre, kontagiyöz (bulaşıcı) ve çevresel mastitis olarak sınıflandırılmıştır (Blowey 1999).

Kontagiyöz (bulaşıcı) mastitis etkenleri ifadesi genellikle hayvanın bir meme lobundan diğerine geçerek veya hayvandan hayvana bulaşma yeteneğine sahip olan ve

bu şekilde bulaşarak mastitislere neden olan mikroorganizmaları tanımlar. Kontagiyöz etkenler; *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Arcanobacterium pyogenes* ve *Mycoplasma spp.* dir.

Çevresel mastitis etkenleri ise; toprak, su ve gübre gibi hayvanın yaşadığı ortamda bulunan etkenleri ifade etmektedir. Bunlar arasında en iyi bilinenleri Enterobacteriaceae (*E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.*), *Pseudomonas spp.*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactia* ve *Enterococcus faecalis*'tir (Baştan A;Cengiz M; 2010)

1.1. Mastitis

Mastitis süt ineği yetiştiriciliğinde en önemli ekonomik kayıp nedenlerindedir. Tedaviye yönelik girişimler ancak zararı azaltmaya yarayan uygulamalardır. Klinik mastitis tanısı meme bezi ve sekresyonunun muayenesi ile kolay olmasına rağmen, akut seyrettiği için tedavi başarısı sınırlı kalmaktadır Subklinik mastitislerin tanısı ise ancak özel bir takım testlerin düzenli aralıklarla uygulanması ile yapılabilmektedir. Düzenli olarak takip edilmeyen işletmelerde gizli seyrettiğinden, az ama sürekli oluşundan dolayı önemli miktarda ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Baştan 2002, Berkin 1984). Sağlıklı bir sığırın meme bezinden elde edilen süt somatik hücreleri ihtiva eder. Bunların sayıları genellikle <250.000 hücre/ml süttür. Mastitis olduğunda somatik hücre sayısı artar. Subklinik enfekte memelerden alınan sütlerde genellikle sayı >250.000 hücre/ml'dir. Klinik olgularda hücre sayısı >5.000.000 hücre/ml'dir. Hücre sayılarının indirekt tahmini CMT (California Mastitis Test) veya Whiteside gibi testlerle yapılabilir. Ancak bu testlerle tanısı konulmuş subklinik mastitis vakalarında direkt olarak genel bir tedavi yerine yapılacak mikrobiyolojik incelemelerle spesifik mikroorganizmanın belirlenmesi ve yapılacak duyarlılık testleri verilerine göre tedavi ve korunma stratejilerinin belirlenmesi başarı şansını artırmaktadır (Blowey 1999; Alpan 1984).

1.1.1. Mastitis Formları

Meme dokusunun etkenlere karşı gösterdiği tepkinin şiddeti, hayvanın bağışıklık sisteminin gücü, infeksiyona neden olan etkenin virülens özellikleri ile sıkı bir ilişki içindedir. Meme dokusunun etkene verdiği cevaba göre mastitisler, subklinik ve klinik

mastitisler olarak iki grupta sınıflandırılmaktadır (Kılıçoğlu 1984;Baştan 2002;Oral ve ark. 2004; Osteras ve Solveras, 2007).

Suklinik Mastitislerde meme dokusu içerisinde etkenler bulunmasına rağmen infeksiyon ve buna verilen cevabın niteliği gözle görülebilir durumda değildir. Ancak süt kalitesi ve süt verimi düşmüştür. Hastalığın bu tipinde sütte ve memede gözle görülebilir bir değişiklik olmadığından dolayı hastalık fark edilmemekte ve sürü içerisinde gizlice yayılmakta, önemli düzeyde ekonomk kayıplara neden olabilmektedir. Mastitisin bu tipi araştırmacılar tarafından buz dağının görülmeyen kısmı şeklinde tabir edilmekte ve klinik mastitislere kıyasla 20-40 kat daha sık karşılaştığı bildirilmektedir (Foster 2006).

Klinik mastitislerde ise; hem süt bileşiminde hem de meme dokusunda gözle görülebilir değişiklikler meydana gelmektedir. Sütte pıhtı, renk ve akışkanlığın değişmesinin yanı sıra meme dokusunda şişlik, ısı artışı, kızarıklık ve ağrı gibi yangısal belirtiler meydana gelir. Ciddi klinik mastitis olgularında ise beden ısısında artış, iştahta azalma ve septisemi gibi belirtilerin yanında bazen ölüm de görülebilmektedir (Biggs 2009).

Klinik mastitisler, ortaya çıkan değişik klinik septomlara göre perakut, akut, subakut ve kronik olmak üzere 4 alt gruba ayrılmaktadır (Alaçam E. 2010).

1.1.2.Mastitislerin tanısı

Genel olarak klinik mastitislerde tanı gözle görülebilen çeşitli özelliklerin muayenesi ile yapılırken, subklinik mastitislerde çeşitli yangı indikatörlerinin özel yöntemler ile ortaya konulmasına dayanmaktadır. Bunlar arasında en çok kabul gören ve yaygın olarak kullanılanları süt içerisinde somatik hücre sayısının artışı ortaya koymaya yönelik testlerdir. Somatik hücre sayımında kullanılan yöntemler indirek yöntemler ve direkt yöntemler olarak ikiye ayrılır. İndirekt yöntemler arasında en çok uygulananı California Mastitis Test (CMT)'dir. Direkt yöntemler ise; otomatik somatik hücre sayımı, boyama ve mikroskopik sayım yöntemleridir. Ayrıca mastitislerin tanısında, süütün elektriksel iletkenliğinin ölçülmesi, iyon konsantrasyonlarının belirlenmesi ve biyokimyasal yöntemler de kullanılmaktadır.

Tüm bu muayene ve analizlere rağmen mastitislerin tanısında enfeksiyona neden olan mikroorganizmanın izolasyonu hastalığın tanısında altın standart olarak kabul edilmektedir (Baştan 2002).

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Mastitise Duyarlılık Oluşturan Faktörler

Koyun, keçi ve ineklerdeki mastitis vakalarının oluşmasında etkili olan çeşitli hazırlayıcı faktörler önemli rol oynamaktadır. Bu faktörler; sağım metotları, sağım makinaları, memenin anatomik yapısı, hayvanın yaşı, ırkı, hijyenik olmayan ahırlar, hayvanların hormonal durumu, soğuk, havadaki ani sıcaklık değişimleri, iklim, travmalar, bakıcının hastaya yaklaşımı, düzensiz sağım, hastalığa karşı duyarlılık, rasyon ve beslenme durumu, doğal koruma mekanizmasının baskılanması ayrı ayrı mastitisi meydana getiren veya hazırlayan sebeplerdir. Hastalıktan korunulması açısından çok önemli olan bu faktörler düşünüldüğünde bu sebeplerin hepsini ortadan kaldırmak oldukça zor bir yönetim ve korunma programı olacaktır. Ancak korunma programları kapsamında bu faktörlerin önlenmesi veya azaltılması mastitis insidensini oldukça düşürebilecek uygulamalardır (Öncel 1984; Alaçam 2002; Oviedo-Boyso ve ark. 2007).

2.2. Mastitisin Ekonomik Açıdan Önemi

Mastitis, süt hayvancılığı işletmelerinin en maliyetli hastalığı olarak nitelendirilmektedir. Dünyada tüm ülkelerde ve ülkemizde tüm bölgelerde mastitisle bağlı süt verim kayıpları oldukça fazladır. Mastitisin neden olduğu ekonomik kayıplar arasında ilaç ve veteriner hekim masrafları ile antibiyotik kalıntısı nedeniyle imha edilen sütler örnek verilebilir. Ayrıca meme yangısından kaynaklanan süt verimindeki azalma, laboratuvar çalışmaları için gerekli harcamalar, mastitisli hayvanları sürüden çıkarma işlemi ve karşılığında yerine yenisini koymak için yapılan harcamalar ve ölümler örnek olarak verilebilir (Blowey ve Edmondson, 1995; Hogeveen ve Osters, 2007; Borne ve ark. 2008).

2.3. Mastitiste Bulaşma Yolları

Mastitise neden olan bakteri, maya ve mantarların hayvanlara bulaşması genellikle sağım sırasında olmaktadır. Bu mikroorganizmaların diğer hayvanlara bulaşmasında genellikle sağımcılar, süt makinaları, meme temizliğinde kullanılan bez,

havlu veya kurulama kâğıtları etkin rol oynamaktadır. Meme bezine sağım sırasında bulaşan mikroorganizmaların başında *S. aureus*, *S. agalactiae* ve *Mycoplasma* gibi kontagiyöz mastitis etkenleri gelmektedir. Mastitis vakalarında bazı bulaşmalar da sağımlar arasındaki dönemde kontamine çevrede bulunan etkenlerden kaynaklanmaktadır. Sağımlar arasındaki dönemde en çok Streptokok ve Koliformlar gibi çevresel mastitis etkenleri meme bezine bulaşmaktadır. Danimarka'da yapılan bir çalışmada, mastitisten sorumlu unsurların yüzdesel dağılımı şu şekilde tespit edilmiştir: Sağım makinaları (%6), barınak ve çevre (%25), genetik (%20), sürü idaresi (%47) (Philpot ve Nickerson, 2000).

2.4. Mastitislerin Patogenezi

Mastitisin şekillenebilmesi için en önemli faktör patojenik bir mikroorganizmanın meme dokusu içerisine girerek yerleşmesidir. Bunu takiben mikroorganizma üreyerek doku içerisinde tahribat yapmaya başlar. Normal sütte bakterilerin çoğalması için uygun bir besin ortamı olmasının yanı sıra mastitis patojenlerinin yangılı sütte normal süttekinden çok daha hızlı çoğalabildiği belirlenmiştir (Ali-Vehmas ve Sandholm, 1995).

Mastitis, tek bir odaktan başlamasına rağmen meme bezi içerisinden ve ayrıca süt kanalları yoluyla yayılırken meme lobunun farklı bölgelerine ulaşarak enfeksiyona devam eder. Ancak meme dokusundan invaze olamayan etkenler sadece o meme lobunda sınırlı kalmakta ve meme başı aracılığıyla diğer meme loblarına zaman içerisinde bulaşabilmektedir. İnvaze olan mikroorganizmalar ise sistemik septisemik bir enfeksiyon tablosu ve ölüme neden olabilirler. Genel olarak meme bezi enfeksiyonu kontaminasyon, kolonizasyon, invazyon, enfeksiyon ve yangı şeklinde seyretmektedir. Bu yol meme başından giren mikroorganizmalar için geçerlidir. Bunun dışında tüberküloz, brusella etkenleri meme dokusuna kan ya da lenf yoluyla ulaşarak enfeksiyona neden olabilirler. Bu şekildeki endojen mastitisler genel olarak sistemik septisemik bir enfeksiyonun takibinde şekillenmektedir. Normalde ekzojen mastitislerde karşılaşılmasına rağmen zaman zaman koliform etkenlerde septisemi sonrasında endojen mastitislere neden olabilmektedirler (Berkin ve Milli 1984; International Dairy Federation 2003).

2.5. Mastitise Neden Olan Mikroorganizmalar

Günümüze kadar yapılan birçok çalışmayla sütçü hayvanlarda mastitise 140'ın üzerinde farklı etkenin neden olduğu bildirilmiştir (Philpot ve Nickerson, 2000). Her ne kadar çok çeşitli mikroorganizma grupları bildirilse de mastitislere neden olan etkenlerin büyük bir bölümü bakteriyel etkenlerdir. Bakteriler dışında mastitise neden olan mikroorganizmalar arasında mikoplazma, maya, mantar ve virusler gelmektedir (Berkin ve Milli 1984; Gruet ve ark. 2001).

Mastitise yol açan önemli etkenler arasında *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *E. coli*, *S. zooepidemicus*, *S. faecalis*, *S. pyogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Histophilus somnus*, *S. pneumonia*, *Corynebacterium pyogenes*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter aerogenes*, *Mycobacterium bovis*, *Nocardia asteroides* türleri ile birlikte bazı mantar etkenleri (*Trichosporon spp.*, *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans*), maya etkenleri (*Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces spp.* ve *Torulopsis spp.*) ve bir alg türü olan *Prothotcha zopfii* sayılabilir. Mastitise neden olan patojenler kontagiyöz ve çevresel olarak ikiye ayrılır (Akers 2002; Baştan 2002; Schukken ve ark. 2007).

2.5.1. Kontagiyöz Mikroorganizmalar

Kontagiyöz mikroorganizmalar genellikle yangılı memedeki mikroorganizmaların sağlıklı memeye bulaşmasıyla veya mastitisli inekten sağlıklı ineğe bulaşarak meydana gelir. Mastitislere neden olan kontagiyöz mikroorganizmalar; *S. aureus*, *S. agalactiae*, *Mycoplasma spp.* ve *Arcanobacterium pyogenes*'tir. Kontagiyöz patojenler, meme içerisine çoğunlukla sağım sırasında girmektedir. Ayrıca meme temizliğinde kullanılan süngerler, sağım başlıkları ile sağımcının eli ile inekler arasında yayılır (Honkanen-Buzalski ve Pyörala 1995; Honkanen-Buzalski ve Seuna 1995; Dodd ve Booth 2000; Pinho ve ark, 2008). Enfekte hayvanların birçok meme lobunda klinik semptomlar aynı anda görülür ve sürü tank sütü somatik hücre sayısı (SHS) 500.000 hücre ml'nin üzerindedir (Biggs 2009).

2.5.2. Çevresel Mikroorganizmalar

Çevresel mikroorganizmalar, hayvanların yaşam alanlarında bulunan su, toprak, gübre ve çamurda bulunan mikroorganizmalardır. Bu nedenle çevresel

mikroorganizmalara bağlı olarak Şekillenen mastitislerin sıklığı iŐletmedeki barınma ve bakım koŐullarıyla yakından ilgilidir. Bu gruptaki etkenler genellikle fırsatçı bakterilerdir (Honkanen-Buzalski ve Pyörala 1995; Honkanen-Buzalski ve Seuna 1995). Bu fırsatçı bakteriler koliformlar ve çevresel streptokoklar diye iki grupta incelenmektedir. Çevresel streptokok olarak *Streptococcus uberis* (*S. uberis*) ve *Streptococcus dysgalactiae* (*S. dysgalactiae*) bilinmektedir. Koliformlar ise *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*) ve *Enterobacter aerogenes* (*E. aerogenes*)'tir. Streptokoklar sıklıkla kısa süreli klinik mastitislere, *E. coli* ve *K. pneumoniae* ise sıklıkla akut toksik mastitislere neden olmaktadır (Schukken ve ark. 2007; Pinho ve ark. 2008).

Klebsiella infeksiyonları, tipik olarak tedavisi çok güç olan ve enfekte hayvanın sürüden çıkarılmasını gerektiren infeksiyonlardır. Çevresel mikroorganizmalara bağlı gelişen mastitislerde sürü tank sütü SHS genellikle 200,000 hücre/ml'nin altındadır. SHS nadiren 400,000 hücre/ml'yi aşmaktadır (Philpot ve Nickerson 2000; Akers 2002; Foster 2006).

Ayrıca *S. aureus* dışında bulunan stafilokoklar çevresel mastitis etkenleri arasında değerlendirilmektedir. Aynı zamanda bu etkenlere stafilokok türleri veya koagülaz negatif stafilokok lar (KNS) denmektedir (Philpot ve Nickerson 2000; Akers 2002; Baştan 2002). Bu etkenler her ne kadar her sürüde sıklıkla izole edilse de, bunlara bağlı Şekillenen infeksiyonlar genellikle hafif seyretmektedir. En çok izole edilen KNS türleri *Staphylococcus chromogenes* (*S. chromogenes*) ve *Staphylococcus hyicus* (*S. hyicus*)'dur (Honkanen-Buzalski ve Seuna 1995; Dodd ve Booth 2000; Schukken ve ark. 2007).

2.5.3. Diğer Mikroorganizmalar

Pseudomonas spp., *Pasteurella spp.*, *Proteus spp.*, *Serratia spp.* ve *Nocardia spp.* yanı sıra özellikle mayalar, algler (prototheca) ve mantarlar bu grupta yer almaktadır. Bu mikroorganizmalara bağlı Şekillenen mastitislerin nedeni, daha çok bakteriyel mastitislerde yanlış antibiyotik uygulamalarına bağlı geliŐtikleri ya da çevresel kontmainasyonun fazlalığından kaynaklandığı Şeklinde açıklanmıŐtır (Akers 2002; Biggs 2009).

2.5.4. Maya ve Mantarlara Bağlı Mastitisler

Mastitise neden olan diğer etkenlerden olan maya ve mantarların büyük çoğunluğu komensal veya saprofit olarak toprak, su ve bitki gibi çevrede bulunan ortamlarda yaşarlar. Mayalar genellikle oval şekilde tomurcuklanma gösteren ve kıyaslama yapıldığında Stafilokoklardan 2-3 kat daha büyük mikroorganizmalardır (Dodd ve Booth 2000).

Mayalar meme içine, meme içi tedavi için kullanılan enfekte enjektör veya kanüller aracılığıyla girer. Özellikle maya ve mantarlara bağlı mastitisler uzun süreyle meme içi antibiyotik kullanımından sonra şekillenir. Ayrıca kontamine infüzyonlar ile de bulaşma olabilmektedir. Bu etkenlere bağlı mastitis çevresel mastitis sınıfında incelenir.

İneklerde mayalardan ileri gelen mastitis çok nadir görülmesine rağmen bazen epizootik oranlarda ortaya çıkabilir. Genellikle, maya nedenli mastitis süt sığırlarındaki mastitis vakalarının %2-3'ünü oluşturur (Yeh 1988).

Mikotik mastitis olgularında en sık izole edilen maya cinsleri *Candida* ve *Criptococcus* cinsleridir. En çok izole edilen maya türleri ise *Candida albicans* ve *Criptococcus neoformans*'tır. Maya nedenli mastitis vakaları klinik, subklinik, kronik ve bazende akut mastitis olarak ortaya çıkabilir. Klinik belirtilerde bakteriyel mastitis ve maya nedenli mastitis arasında belirleyici bir fark yoktur. Sadece mikrobiyolojik inceleme ile kesin tanısı yapılabilir. Maya nedenli mastitisin tedavisi olmasına rağmen bazen hasta hayvanın kendiliğinden iyileşmesi de mümkündür. Maya nedenli mastitis tedavisi, uzun süreler boyunca antimikotik ilaçların kullanılması ile mümkündür. İyileşme dönemi haftalar ve aylar sürebilen uzunluktadır.

İneklerin memelerinde mastitise neden olan mayalar *Candida* ve *Criptococcus* cinsleridir (Yeh S. ve ark. 1988). *Candida* özellikle bağırsak ve genital yollar ile deri ve mukoza alanlarında bulunurken, *Criptococcus* toz, cilt, mukoza zarları ve normal hayvanların bağırsak sisteminde bulunur. Bu mayalar, genellikle hayvan sağlığı için tehdit değildir. Bazı durumlarda mayalar memeye nüfuz eder ve mastitise neden olabilirler. Genellikle kontamine şırıngalar, kontamine antibiyotik preparatları ve kanüller ile bulaşır (Kirk 1992). Ayrıca meme başı yaralanmaları bir mantar enfeksiyonunun bulaşması için zemin hazırlayabilir (Tucker 1954). İneklerde mikotik mastitis oranı oldukça düşüktür (Blood ve ark. 1983). Mantar enfeksiyonlarının, tüm

linik mastitis vakalarının % 2-3'den sorumlu olduğu bildirilmektedir (VanDamme 1983.). Vakaların çoğunluğu hafif olmasına rağmen, bazı durumlarda hastalanan hayvanların öldüğü de görülmektedir.

Günümüzde mantar infeksiyonlarının tedavisi büyük bir sorun oluşturmaktadır. Antifungal ajanların kullanımı, toksisitesi veya uygun olmayan farmakokinetik özelliklerine bağlı olarak çeşitli ilaçlarla etkileşimleri nedeniyle oldukça kısıtlıdır.

2.5.5. Algler (Prototheca) Bağlı Mastitisler

Algler, su yosunları olarak bilinmektedir ve genellikle nemli toprak, su birikintisi ve çamurlarda yaşamaktadırlar. Bazı alg çeşitleri hayvan yemi ve gübre olarak, ayrıca alkol, ilaç, kozmetik ve kâğıt sanayilerinde kullanılmaktadır. Ökaryotik algler, bitkiler aleminin en ilkel temsilcileri olarak kabul edilmektedir. İlk olarak, Zopf ve Kuhn (1980) bir ıhlamur ağacının mukus salgısından izole ettikleri iki farklı mikroorganizmayı *Tillia spp.* ve *Ulmus spp.* olarak isimlendirmişlerdir. Daha sonra bu etkenlerin morfolojik ve fizyolojik karakterizasyonu Kruger (1894) tarafından yapılmıştır. Prototheca'nın taksonomik konumu uzun süre tartışılmıştır. Şu anda ince yapısı, plazmid benzeri granül oluşumu ve eşeysiz üreme şekliyle alt yosun içindeki Chlorophyceae'da yer almaktadır. Genel tanıda mantar olduğu belirtilmemesine rağmen Saccharomyces ya da alt fikomisetler ile bağlantısı vardır. 1913 yılında Chodat yosun olarak sınıflandırmıştır (Pore RS 1985).

Prototheca'nın tanımlanmasından bu yana bu cinsin içinde başka türlerde tanımlanmış ve bunlardan bazılarının patojen karakterde olduğu tespit edilmiştir. Günümüze kadar Prototheca cinsine ait yedi tür tespit edilmiştir. Bunlar; *Prototheca moriformis* 1894, *Prototheca zopfii* 1894, *Prototheca wickerhamii* 1959, *Prototheca stagnora* 1985, *Prototheca ulemaea* 1986, *Prototheca blaschkeae* 2006 ve *Prototheca cutis* 2010. Bu yedi türden *P. zopfii*'nin patojen özellik gösterdiği ilk kez 1952 yılında tespit edilmiş ve o zamandan beri süt sığırlarında mastitise neden olduğu bilinmektedir (Jánosi F 2001). Son bir kaç yıl içinde yapılan çalışmalarda *Prototheca spp.* cinsi bir algin süt ineklerinde mastitise neden olduğu saptanmış, dolayısıyla insan sağlığı açısından da önemi yapılan çalışmalarla irdelenmeye başlanmıştır (Osumi T ve ark. 2008).

Prototheca cinsi algler kanalizasyon çevresinde, göl ve nehirlerde yaygın şekilde bulunmakta, hayvanlara bu ortamlardan bulaşabilmektedir. *Prototheca spp.* türlerinin inek ve sığırlarda mastitise neden olduğu saptandıktan sonra, hayvanların sütü aracılığıyla insanlara da buluşarak ve gastroenteritidise neden olabileceği bildirilmiştir. Mastitis süt sığırı sürülerinde büyük ekonomik kayıplara neden olur. Yıllardır mastitis patojeni olarak kabul edilen, bakterilerin yanı sıra ve bazı tek hücreli algleri de içeren mikroorganizmalar, çeşitli diğer gruplarda da meme içinde inflamatuvar değişikliklere neden olabilir (Hodges 1985). Algler tanımlanmasından bu yana dünya çapında ve özellikle ılıman ve tropikal iklim bölgelerine mastitise neden olduğu bildirilmiştir (Jonosi ve ark. 2001).

Prototheca'nın Avrupa, Kuzey Amerika ve Asya'da sporadik mastitis vakaları rapor edilmiştir (Furuoka H. ve ark 1989; Jagielski T, Lagneau P. 2007). Ayrıca, endemik *Prototheca spp.* nedenli mastitisten etkilenen inek sayısının fazlalığı ile ilgili çeşitli raporlar vardır (Lagneau PE 1996). Yüksek nemin ve sıcaklığın olduğu coğrafi bölgelerde patojenler hızla çoğalır (Costa ve ark. 1996). Mevcut yayınlarda *Prototheca zopfii* nedenli mastitisler hakkında çok fazla rapor olmamasına rağmen gerçek hastalık sıklığının rapor edilenlerden çok daha yüksek olduğu tahmin edilmektedir. *P. zopfii* nedenli mastitislerde infeksiyon genellikle subklinik mastitis tarzında ve çoğunlukla süt üretiminde azalma ve süt salgısında sulanma şeklinde görülür (Schlenstedt R 1997). *P. zopfii*'nin biyokimyasal ve serolojik olarak 2 genotipi bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda daha çok *P. zopfii* genotip II'nin sığırlarda mastitise neden olduğu görülmüştür (Linguist WE 1981; Costa ve ark. 1996; Buzzini 2004).

Prototheca spp. nedenli mastitis vakalarının tedavisinde ketokonazol, itrakonazol, flukonazol ve amfoterisin B gibi antifungaller bugüne kadar en sık kullanılan ilaçlardır (Van Damme 1983; Mc Donald 1984; Shahan 1991). *Prototheca spp.* bunlar arasında, amfoterisin B'ye karşı iyi duyarlılık gösterdiği rapor edilmiştir (Carey ve ark. 1997).

2.6. Mastitislerin Tedavisi

Mastitislerin sağaltımında antibiyotikler en çok ve sık kullanılan maddelerdir. Belirtilen ilaçlar etki şekillerine göre, bakterisid ve bakteriyostatik olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Bakterisid olanlar in vivo ortamda doğrudan bakterileri öldürmelerine karşın, bakteriyostatik olanlar bakterilerin çoğalma ve gelişmelerini durdurmak suretiyle

konakçı humoral ve hücrel savunma unsurları tarafından yok edilmelerini sağlamaktadırlar (Sekkin ve Kum 2010). Mastitis vakalarında antibiyotik tedavisinin avantajları; Özellikle gram pozitif etkenlere bağılı şekillenen mastitislerde başarı şansının artması, perakut olgulara bağılı kayıpların azalması, sütle atılan bakteri sayısının dolayısıyla etkenin sürü içinde yayılımının azalması, klinik iyileşmenin daha hızlı şekillenmesi, eski süt verimine daha kısa bir süre içerisinde ulaşılması, üretilen süt kalitesinin artması ve devam eden ya da sonraki laktasyonda enfeksiyonun nüks etme olasılığının azalması olarak özetlenebilir. Dezavantajları ise; tedavinin maliyeti, sağımcının tedavi için harcadığı zaman, değerlendirilemeyen sütün değeri, sütün kontaminasyon riski, teorik olarak antibiyotiğe karşı direnç şekillenebilme ihtimalinin artması ve Gram negatif etkenlere bağılı gelişen özellikle şiddetli seyretmeyen mastitis vakalarında tedavideki başarı şansında belirgin bir fark şekillenmemesi şeklinde sıralanmaktadır (Biggs 2009).

İnfeksiyonları elimine etmekte başvurulan temel yöntem antibiyotik tedavisidir. Başarılı bir antibiyotik tedavisi için uygulanan ilacın; enfekte meme lobundaki tüm bölgelere ulaşması, yeterli süre ve miktarlarda enfeksiyon bölgesinde etkisini göstermesi, enfeksiyona neden olan mikroorganizmayı elimine etmesi gerekmektedir (Philpot ve Nickerson 2000).

Yapılan antibiyotik tedavisinin amaçlarının başında süt verimi ve kompozisyonunu normale döndürmek gelir. Bunun dışında mevcut olan enfeksiyonların daha kötü bir duruma gelmesini engellemek, enfeksiyöz mikroorganizmaları elimine etmek, gelişebilecek yeni enfeksiyonları engellemek, süt ve ette ilaç kalıntısını engellemek, mevcut enfeksiyonların diğer hayvanlara bulaşma riskini azaltmak, sürünün genel sağlık durumunu iyileştirmektir (Philpot ve Nickerson 2000). Sağaltım yalnız başına mastitis sorununu çözemez. Ancak çözüm yolları arasında önemli bir yeri vardır.

Mastitise neden olan etkenlerin çeşitliliği ve hastalık belirtilerinin, klinik olarak farkedilemeyecek kadar hafif olgulardan perakut ve toksik seyrederek hayvanın ölümüne neden olabilecek kadar şiddetli olgulara kadar, farklı formlar göstermesi sağaltım için kullanılacak antimikrobiyel ilaçlar ve yöntemlerinde farklılığa neden olmaktadır (Alaçam 1984). Hastalık etkeni ve duyarlılık durumu bilinen mastitis olgularında hızla etkileyen ve dar spektrumlu kemoterapötikler seçilmesine karşın, kesin

tanısı konulmamış infeksiyonlarda geniş spektrumlu ilaçlar daha fazla tercih edilmektedir (Sekkin ve Kum 2010).

Mastitislerin sağaltımına başlanılmadan önce uygulanacak en güvenilir yol, etkenin identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılık testinin yapılmasıdır. Antibiyotik duyarlılık testi; agar difüzyon, agar dilüsyon, broth dilüsyon veya bakterilerin beta-laktamaz üretebilme yeteneklerini direkt olarak tespit etme gibi bazı fenotipik karakteristiklerle yapılabilmektedir. Testin sonucu bakteriyel çoğalmayı engelleyen en düşük antibiyotik konsantrasyonunu göstermekte ve MIC (minimum inhibitör konsantrasyon) değeri olarak ifade edilmektedir. Klinik kullanım için sonuçlar genellikle duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak belirtilmektedir. Agar difüzyon metodu, ucuz ve uygulamasının kolay olmasından dolayı Avrupa'daki klinik laboratuvarlarda en çok tercih edilen antibiyotik duyarlılık testlerinden birisidir. Fakat bu metodun en büyük dezavantajı MIC değerlerini vermemesi ve sonucu etkileyen tüm faktörlerin standardize edilmesinin zorluğudur. Antibiyotik duyarlılık testi, hafif ya da kronik seyreden olgularda ve özellikle uzun süreli kontrol programlarında çok yararlı olmaktadır. Ancak, akut ve perakut olgularda hayvanın yaşamını kurtarmak ve memeyi normal fonksiyonlarına döndürebilmek için diagnostik yöntemlerin tamamlanmasını bekleyecek zaman olmadığından, bu tip olgularda sağaltıma erkenden başlamak en uygundur. Antibiyotik duyarlılık testi bulguları her zaman in vivo uygulamalarla tam olarak uyumlu olmamaktadır. Diğer bir deyişle, laboratuvar ortamında bir antibiyotiğe karşı duyarlı olan bir mikroorganizma, aynı antibiyotiğe karşı meme dokusunda direnç gösterebilmektedir.

Bakteri, yangından dolayı antibiyotik etkisinden korunabilmekte ve meme sekresyonunun asiditesine bağlı olarak antibiyotik etki etmemektedir. Kombine antibiyotik kullanımına bağlı olarak antibiyotikler inaktif hale gelebilmektedir. Enfeksiyon bölgesindeki antibiyotik konsantrasyonunun çok düşük olması veya antibiyotiğin etkisini uzun süre gösterememesi nedeniyle antibiyotik meme lobunda proteinler tarafından bağlanabilmektedir. Bakteriyel çoğalma, meme lobundaki irin benzeri sekresyonlar nedeniyle yavaşlamakta, fakat kullanılan antibiyotiğin etkisini gösterebilmesi için hızlı bakteriyel çoğalmaya ihtiyacı olmaktadır. Ayrıca fizyolojik konsantrasyondaki kalsiyum gibi, bazı elementler bazı antibiyotiklerin aktivitesini antagonize edebilmektedir (Alaçam 1984, Blowey 1999, Philpot ve Nickerson 2000).

2.7. Mastitis Tedavisinde Başarısızlık Nedenleri

Koyun, keçi ve ineklerdeki mastitis vakalarında; yanlış tanı, tedavi süresi, antibiyotiğe karşı direnç, tedaviye geç başlanması, tedaviyi yeterli süre sürdürmeme, uygun olmayan ilaç veya doz seçimi, meme içine ilaç verilen kanüllerin steril olmaması, bakterilerin "L" formlarının şekillenmesi, klinik iyileşmenin şekillenip bakteriyolojik iyileşmenin olmaması, bakterilerin akyuvarlarda korunması, ilaç infüzyonunun enfekte meme lobundaki yetersiz dağılımı tedavideki başarısızlığın nedenleri şeklinde sıralanabilir (Philpot ve Nickerson 2000, Baştan (2010a)).

2.8. Antifungal Duyarlılık Testi

Günümüzde mastitis vakalarında mantar infeksiyonlarının sıklığının ve öneminin artması tedavide kullanılan antifungallerin sıklıkla kullanılmasına neden olmaktadır. Ayrıca alternatif antibiyotik veya ilaçların arayışında, mastitis tedavi yöntemlerinin düzenlenmesinde ve fazla ve yanlış antibiyotik kullanımından kaynaklanan direnç problemi nedeniyle standart antifungal duyarlılık testlerinin önemi gün geçtikçe artmaktadır. Antifungal duyarlılık testlerinin kullanım alanlarının başında yeni geliştirilen antifungallerin veya antibiyotiklerin in vitro etki spektrumunu belirlemek gelir. Ayrıca antifungal duyarlılık testleri, ilaçların direnç oranlarına ilişkin epidemiyolojik veriler elde etmek ve antifungallerle klinik izolatların in vitro duyarlılıklarını inceleyerek klinik yanıtla ilişkin öngöründe bulunmak için kullanılmaktadır (Espinell-Ingroff A, Pfaller M. 2007). Bu testlerin geliştirilmesi ve standardizasyonu klinik mikoloji alanında çok önemli olmuştur. Bu amaçla 1992'den bugüne eski adıyla NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) yeni adıyla CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) hem maya hem de küflerde standart yöntemleri tanımlamak için raporlar yayınlamışlardır (Wayne PA 2008).

İnfeksiyonlarda etken olarak saptanan mantarların antifungal ilaçlara duyarlılıklarını belirlemek amacıyla standart yöntemlerin geliştirilmesi, mikoloji alanındaki önemli ilerlemelerden biri olmuştur. Şu anda mevcut olan referans yöntemler, CLSI ("Clinical and Laboratory Standards Institute") tarafından maya (CLSI, M27-A2) (Koc AN, 2000) ve küfler (CLSI, M38-A) (Arendrup MC, 2011) için geliştirilen mikrodilüsyon yöntemi, CLSI tarafından Candida (flukonazol, vorikonazol)

için geliştirilen disk difüzyon yöntemi ile EUCAST ("European Confederation of Antifungal Susceptibility Testing") tarafından CLSI yöntemi modifiye edilerek mayalar için geliştirilen mikrodilüsyon yöntemidir (Arıkan 2007). Referans mikrodilüsyon yöntemlerinin, uzun sürede sonuç verme ve bazı *Candida* suşları ve azoller için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK, µg/ml) sonuçlarının okunmasının zor olması gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bunun dışında, MİK direnç sınır değerleri flukonazol, itrakonazol, vorikonazol ve flusitozin'de henüz sadece *Candida* için belirlenmiş olup, diğer mantar-ilaç kombinasyonları için direnç sınırlarının ne olduğu kesin bilinmemektedir. In vitro amfoterisin B direncinin saptanmasındaki zorluklar ve mevcut yöntemlerle amfoterisin B için elde edilen in vitro sonuçlarla in vivo yanıt arasında korelasyon kurulamayışı, konu ile ilgili diğer sorunları oluşturmaktadır (Arıkan 2007).

Artan mastitis sorunlar ışığında, antifungal duyarlılık testleri ile ilgili çalışmalar, mastitiste direnci en aza indirgeyecek, hızlı ve pratik yöntem arayışlarına ve bu alandaki çalışmalara odaklanmıştır. Bu konu ile ilgili yapılan bazı çalışmalar, E test ve ticari olarak mevcut olan kolorimetrik bir sistem olan "Sensititre Yeast One"[®] (TREK Diagnostic Systems) referans yöntem ile karşılaştırmayı hedeflemiştir. Bu çalışmaların sonuçları, referans yöntem ile bu yöntemler arasındaki uyum oranlarının genelde iyi düzeyde olduğunu göstermekle birlikte, özellikle *C. glabrata* gibi flukonazole azalmış duyarlılık ya da direnç saptanan ve MİK değeri sınır değerlere yakın olabilen türlere ait suşlarda uyum oranlarının düşük düzeylerde olabileceğine işaret etmektedir. Tetrazolyum tuzunun (XTT) indirgenmesi esasına dayanan ve bir kolorimetrik metabolik test olan XTT testi ise, *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus spp.* ve *Zygomycetes* sınıfındaki mantarların antifungal ilaçlara duyarlılığını belirlemek amacıyla denenen testlerden biridir. XTT testi, standart yöntemle göre daha kısa sürede sonuç verme avantajını sunmakta ise de, bu konu ile ilgili veriler henüz sınırlı ve araştırma aşamasında olup, daha ayrıntılı çalışmalara gereksinim mevcuttur (Davey ve ark. 1998).

Antifungal duyarlılık testleri alanında, hem mevcut referans yöntemlerini hemde yeni pratik ve hızlı yöntemlerin mevcut referans yöntemlerle uyum oranlarını inceleyen çalışmalar devam etmektedir. Bugüne kadar antifungal duyarlılık testlerinden elde edilen sonuçlara bakıldığında, özellikle *Candida* infeksiyonlarında, flukonazol ve bazı triazol

bileşikleri için elde edilen in vitro duyarlılık sonuçlarının, tedaviyi başarı oranını arttırıp başka çalışmaların yapmaya yönlendirmede faydalı olabileceğini göstermektedir. Elde edilecek yeni verilerin ve geliştirilen yeni yöntemlerin, antifungal duyarlılık testlerinin antifungal tedaviyi yönlendirmedeki rolünü devam ettirmektedir. Ancak, antifungal duyarlılık, özellikle bağışıklığı baskılanmış konakta, klinik yanıtı etkileyen faktörlerden sadece birisidir ve konak faktörleri başta olmak üzere diğer faktörlerin etkisi, göz ardı edilemeyecek kadar önemlidir (Pfaller MA 2006).

2.9. Antifungaller

Maya ve küflerin yol açtığı fungal infeksiyonlar bağışıklığı baskılanmış bireylerde yüksek derecede morbidite ve mortaliteye yol açmaktadır. Bu maya ve mantarların yol açtığı infeksiyonlar yayılcı ve yüzeysel infeksiyonları kapsar. En sık karşılaşılan fungal enfeksiyon etkenleri arasında da Candida ve Aspergillus türleri gelir. Bu fungal infeksiyonların neden olduğu hasarın tedavisi; kullanılan ilaçların dar spektrumlu oluşu, toksisitesi, tolere edilebilme güçlüğü ve dirençli suşların ortaya çıkması nedeniyle oldukça zordur (Akan 2010).

Özellikle tek ilaç tedavisine cevap vermeyen hastalarda ya da dirençli suşların varlığında uzun süreli fungal ilaç tedavisi düşünülebilir. İnsan hücrelerinden farklı olarak mantarların hücre duvar yapısı bulunmaktadır. Son yıllarda gündeme gelen ekinokandin grubu antifungaller hücre duvarı sentezi üzerine etkilidirler. Bu grupta yer alan kaspofungin, klinik kullanıma yeni giren bir antifungaldir (Akay 1984). Ekinokandin sınıfındaki antifungallerin duyarlılık testleri için standart bir metod hala geliştirilememiş, polien ve triazol grubu antifungal ilaçlar ise ergosterol yapı üzerinden etkilidirler. Bunun yanı sıra ekinokandin sınıfındaki antifungal kombinasyonları ile ilgili in vitro test yöntemlerine yönelik ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda bazı kandida türlerinin in vitro duyarlılığının saplanması broth mikrodilasyon, disk difüzyon ve E-testlerinden yararlanılmaktadır (Caston ve ark. 2007).

2.10. E test

E-test mikroorganizmanın üremesinin engellendiği en düşük ilaç konsantrasyonudur (AB Biodisk, Solna, Sweden) ve agar baz dayalı plastik striplerden antimikrobiyel ajanların gradient konsantrasyonlarında difüze olduğu antibiyotik duyarlılık testidir. Günümüzde antifungal çalışmalarında katı besiyerinde difüzyon yoluyla MİK (minimum inhibitör konsantrasyon) değerlerinin saptanmasına olanak sağlayan yöntemler de bulunmaktadır. E-test bu prensibe dayanan bir yöntemdir. MİK bir mikroorganizmanın üremesini önleyen en düşük ilaç konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. Dilüsyon testleri sonucunda elde edilen MİK değerleri klinisyene, enfeksiyona neden olan mikroorganizmayı inhibe etmek için gerekli olan antimikrobiyal ilaç konsantrasyonunu vermektedir. Elips şeklindeki inhibisyon alanının stripi kestiği nokta MİK değerini vermektedir. Flukonazol, Amfoterisin B, kaspofungin, flusitozin, itrakonazol, posakonazol ve vorikonazol için ticari stripler vardır. Bunlar arasında sadece itrakonazol, flukonazol ve flusitozin için (ABD Gıda ve İlaç Dairesi) FDA onayı alınmıştır. Endpoint belirleme bazı suşlarda zor olmakla birlikte birçok Candida suşu için standart yöntemlerle uyumlu olduğu kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalarda Candida suşlarının amfoterisin B, ketokonazol, itrakonazol ve flukonazol duyarlılığı E-test ile antifungal duyarlılık testi ile referans yöntemine göre uyum sırasıyla % 93,1; % 85,2; % 82,3 olduğunu göstermişlerdir (Koc AN 2000). E-test, Agar difüzyon esasına dayanan, MİK değerini kantitatif olarak belirleyen bir çok direnç mekanizması hakkında fikir veren, her klinik mikrobiyoloji laboratuvarında uygulanabilen, klinikte birçok hastalığın sağaltımı için yönlendirici olan bir yöntemdir. Aspergillus türlerini içeren tıbbi önemi olan küflerle yapılan çalışmada amfoterisin B ve itrakonazol duyarlılıklarının karşılaştırılmasında E-test yönteminin referans yöntemine göre uyumun yüksek olduğu bildirilmektedir (Posteraro 2000). Candida türlerine karşı ekinokandin CLSI ve EUCAST ve % 2 glikozlu ve Müller-Hinton besiyeri kullanılarak Etest ve disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi referans yöntemine göre her üç yönteminde yüksek uyumluluk gösterdiği ve yöntemin pratik olduğunu vurgulamışlardır. Ayrıca antifungallere karşı mikroorganizmaların dirençlerini belirlemek için ve direnç mekanizmalarını ortaya çıkarmak için moleküller yöntemlerden yararlanılmaktadır (Posteraro ve ark. 2000; Lee 2009).

Bu alışmada Hatay ve ilçelerinde bulunan süt sığırı, koyun ve keçi işletmelerinde mikotik mastitlerin varlığı, yaygınlığı ve izole edilen etkenlerin antifungal ajanlara karşı duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlandı.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Örnekler ve Örneklerin Alınması

Çalışma materyalini oluşturan örnekler Aralık 2013-Mayıs 2014 tarihleri arasında Hatay İlindeki sütçü sığır, koyun ve keçi işletmelerinden toplandı. Çalışma amacıyla her bir hayvan türü için rastgele 100'er baş hayvan seçildi ve 300 adet hayvandan süt örneği toplandı. Örneklerin alındığı bölgeler ve hayvan türlerine göre örnek sayıları Çizelge 3.1.'de gösterildi.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan örneklerin alındığı bölgeler ve örnek sayıları

İlçe Adı	Koyun Sayısı	Keçi Sayısı	İnek Sayısı
Paşa köyü	100	25	40
Derince köyü	-	-	20
Altınözü	-	75	-
Serinyol	-	-	40
Toplam	100	100	100

3.2. Yöntem

3.2.1. California Mastitis Test (CMT)

Ziyaret edilen çiftliklerde sağılan hayvanlardan süt numeneleri alınarak California Mastitis Testi (CMT) yapıldı ve veriler kaydedildi (Schalm 1971, Baştan 2002).

3.2.2. Mikolojik Kültür Amacıyla Süt Numunelerinin Alınması

Klinik mastitis bulunan ve CMT analizleri sonucunda şüpheli ve pozitif sonuç veren memelerden mikolojik muayene amacıyla süt örnekleri alındı. Meme başları %70'lik Etil alkol içeren mendille silindi, kurumayı takiben 45 derecelik açı yapacak şekilde tutmak suretiyle 50 mililitrelik steril plastik tüplere 15 ml süt örneği olacak şekilde örnekler alındı. Örnekler +4 °C'lik termoslar içine yerleştirilerek en geç bir saat laboratuvara nakledildi.

Bu kapsamda örnekleme yapılan 100 baş koyuna ait 200 memeden 19 koyundan 24 süt örneği alınarak mikrobiyolojik muayene için laboratuvara getirildi. Yüz baş keçiye ait 200 meme lobundan 27 keçiye ait 48 süt örneği alındı. Aynı şekilde örnekleme yapılan 100 baş ineğe ait 400 memeden 36 ineğe ait 94 süt numunesi alınarak mikrobiyolojik analizler yapıldı. Hayvanlardan mikrobiyolojik analizler için alınan her bir numune koyunlar için Çizelge 3.2, keçiler için Çizelge 3.3 ve sığırlar için Çizelge 3.4'de gösterildi.

Çizelge 3.2. Koyunlardan alınan örneklere verilen numaralar, alındığı mevkiiler, meme lobları, CMT sonuçları ve verilen örnek numaraları

Koyun No su	İlçe Adı	Sol Meme(A) CMT	Sağ Meme(B) CMT
3	Paşa Köyü	-	+ (ÖN 1)
9	Paşa Köyü	? (ÖN 2)	-
18	Paşa Köyü	-	+ (ÖN 3)
24	Paşa Köyü	? (ÖN 4)	-
28	Paşa Köyü	? (ÖN 6)	++ (ÖN 5)
33	Paşa Köyü	+ (ÖN 8)	? (ÖN 7)
34	Paşa Köyü	+++ (ÖN 10)	K (ÖN 9)
35	Paşa Köyü	+ (ÖN 11)	-
41	Paşa Köyü	+ (ÖN 12)	-
47	Paşa Köyü	-	+ (ÖN 13)
49	Paşa Köyü	? (ÖN 14)	-
58	Paşa Köyü	-	? (ÖN 15)
70	Paşa Köyü	K (ÖN 16)	K (ÖN 17)
74	Paşa Köyü	-	? (ÖN 18)
76	Paşa Köyü	-	? (ÖN 19)
77	Paşa Köyü	K (ÖN 20)	K (ÖN 21)
78	Paşa Köyü	-	? (ÖN 22)
79	Paşa Köyü	-	? (ÖN 23)
80	Paşa Köyü	? (ÖN 24)	-

Çizelge 3.3. Keçilerden alınan örneklere verilen numaralar, alındığı mevkiler, meme lobları, CMT sonuçları ve verilen örnek numaraları

Keçi No su	İlçe Adı	Sol Meme(A) CMT	Sağ Meme(B) CMT
1	Paşa Köyü	+++ (ÖN 1)	+++ (ÖN 2)
3	Paşa Köyü	++ (ÖN 3)	-
9	Paşa Köyü	+++ (ÖN 4)	++ (ÖN 5)
18	Paşa Köyü	+++ (ÖN 6)	++ (ÖN 7)
24	Paşa Köyü	++ (ÖN 8)	++ (ÖN 9)
25	Paşa Köyü	++ (ÖN 10)	+ (ÖN 11)
34	Altınözü	? (ÖN 13)	+++ (ÖN 12)
35	Altınözü	+ (ÖN 14)	+ (ÖN 15)
41	Altınözü	++ (ÖN 16)	+ (ÖN 17)
47	Altınözü	K (ÖN 18)	+++ (ÖN 19)
49	Altınözü	++ (ÖN 20)	++ (ÖN 21)
58	Altınözü	K (ÖN 22)	K (ÖN 23)
70	Altınözü	? (ÖN 24)	+ (ÖN 25)
74	Altınözü	+ (ÖN 26)	? (ÖN 27)
76	Altınözü	++ (ÖN 28)	+ (ÖN 29)
77	Altınözü	-	K (ÖN 30)
78	Altınözü	? (ÖN 31)	? (ÖN 32)
80	Altınözü	+ (ÖN 33)	? (ÖN 34)
82	Altınözü	++ (ÖN 35)	+ (ÖN 36)

Çizelge 3.3. Keçilerden alınan örneklere verilen numaralar, alındığı mevkiler, meme lobları, CMT sonuçları ve verilen örnek numaraları (devam)

Keçi No su	İlçe Adı	Sol Meme(A) CMT	Sağ Meme(B) CMT
84	Altınözü	K (ÖN 37)	K (ÖN 38)
86	Altınözü	K (ÖN 39)	+ (ÖN 40)
87	Altınözü	+ (ÖN 41)	-
88	Altınözü	-	? (ÖN 42)
90	Altınözü	+ (ÖN 43)	-
93	Altınözü	++ (ÖN 44)	? (ÖN 45)
96	Altınözü	? (ÖN 46)	-
98	Altınözü	+ (ÖN 47)	? (ÖN 48)

Çizelge 3.4. İneklerden alınan örneklere verilen numaralar, alındığı mevkiiler, meme lobları, CMT sonuçları ve verilen örnek numaraları

Örnek Sayısı	Mevki Adı	SOL ÖN CMT	SOL ARKA CMT	SAG ÖN CMT	SAG ARKA CMT
1	Derince Köyü	+ (ÖN 1)	++ (ÖN 2)	? (ÖN 3)	++ (ÖN 4)
2	Derince Köyü	+ (ÖN 5)	? (ÖN 6)	+ (ÖN 7)	? (ÖN 8)
3	Derince Köyü	? (ÖN 9)	+ (ÖN 10)	? (ÖN 11)	+++ (ÖN12)
4	Derince Köyü	+ (ÖN 13)	? (ÖN 14)	++ (ÖN 15)	+ (ÖN16)
5	Derince Köyü	? (ÖN 17)	? (ÖN 18)	+++ (ÖN19)	? (ÖN 20)
6	Derince Köyü	K (ÖN 21)	+++ (ÖN 22)	K (ÖN 23)	? (ÖN 24)
7	Derince Köyü	-	-	K (ÖN 25)	-
8	Derince Köyü	+++ (ÖN 26)	++ (ÖN 27)	+++ (ÖN 28)	K (ÖN 29)
9	Derince Köyü	++ (ÖN 30)	+ (ÖN 31)	? (ÖN 32)	+++ (ÖN 33)
10	Serinyol	++ (ÖN 34)	? (ÖN 35)	? (36)	++ (ÖN 37)
11	Serinyol	? (ÖN 38)	? (ÖN 39)	? (ÖN 40)	? (ÖN 41)
12	Serinyol	-	-	-	+ (ÖN 42)
13	Serinyol	? (ÖN 43)	? (ÖN 44)	-	-
14	Serinyol	++ (ÖN 45)	+ (ÖN 46)	++ (ÖN 47)	+ (ÖN 48)
15	Serinyol	-	+ (ÖN 49)	+ (ÖN 50)	++ (ÖN 51)
16	Serinyol	-	-	+++ (ÖN52)	+++ (ÖN 53)
17	Serinyol	-	-	? (ÖN 54)	K (ÖN 55)

Çizelge 3.4. İneklerden alınan örneklere verilen numaralar, alındığı mevkiiler, meme lobları, CMT sonuçları ve verilen örnek numaraları (devam)

Örnek Sayısı	Mevki Adı	SOL ÖN CMT	SOL ARKA CMT	SAG ÖN CMT	SAG ARKA CMT
18	SERİNYOL	+ (ÖN 56)	++ (ÖN 57)	++ (ÖN 58)	++ (ÖN 59)
19	SERİNYOL	-	-	+ (ÖN 60)	-
20	SERİNYOL	+++ (ÖN61)	++ (ÖN 62)	+++ (ÖN63)	+++ (ÖN64)
21	Paşa Köyü	K (ÖN 65)	+ (ÖN 66)	-	-
22	Paşa Köyü	-	? (ÖN 67)	? (ÖN 68)	-
23	Paşa Köyü	-	-	-	+++ (ÖN69)
24	Paşa Köyü	++ (ÖN 70)	-	-	? (ÖN 71)
25	Paşa Köyü	-	-	-	+ (ÖN 72)
26	Paşa Köyü	-	-	? (ÖN 73)	-
27	Paşa Köyü	-	-	+++ (ÖN74)	-
28	Paşa Köyü	-	+ (ÖN 75)	-	+ (ÖN 76)
29	Paşa Köyü	++ (ÖN 77)	-	-	-
30	Paşa Köyü	+ (ÖN 78)	+ (ÖN 79)	-	-
31	Paşa Köyü	-	+ (ÖN 80)	-	-
32	Paşa Köyü	+ (ÖN 81)	+ (ÖN 82)	? (ÖN 83)	? (ÖN 84)
33	Paşa Köyü	+ (ÖN 85)	++ (ÖN 86)	+ (ÖN 87)	++ (ÖN 88)
34	Paşa Köyü	-	-	-	? (ÖN 89)
35	Paşa Köyü	-	-	-	+ (ÖN 90)
36	Paşa Köyü	+++ (ÖN91)	+++ (ÖN92)	++ (ÖN 93)	++ (ÖN 94)

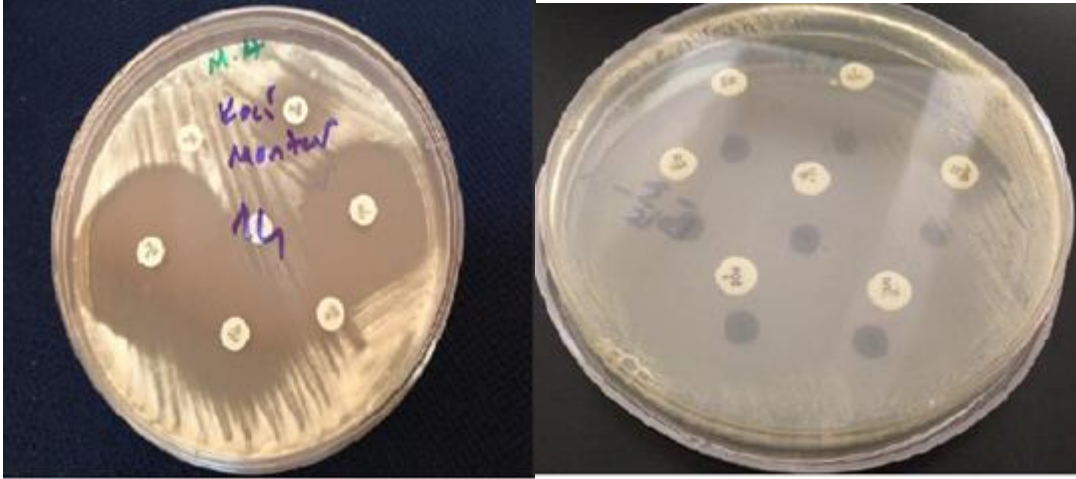
3.2.3. Mikrobiyolojik Kùltür

Laboratuvara getirilen sùt numunelerinden 100 µl ikişer seri olacak şekilde litresinde 20.000 Unite Penisillin G içeren Sabouraud Dextrose Agar'a ekimleri yapıldı. Petriler 25 ve 35°C'de 7-10 gün süreyle aerobik ortamda inkübe edildi, üreyen koloniler mikolojik yönden değeriendirildi. Ayrıca Kanlı agara ekimler yapılarak bakteriyolojik üremeler de belirlendi. İzole edilen mantar kolonileri Laftofenol Pamuk Mavisini ile boyanarak mikroskopta incelendi. Ayrıca maya kolonileri de basit boyama yöntemi kullanılarak Metilen Mavisini ile boyandıktan sonra mikroskopta değeriendirildi. İzole edilen maya ve mantarlar daha sonra antifungal duyarlılık testleri ve PCR analizlerinin yapılması amacıyla %20 oranında gliserin içeren Trypticase Soy Broth'a aktararak -20°C'de saklandı (Quinn ve ark. 1994, Rajala-Schultz ve ark. 2004).

3.2.4. Disk Diffüzyon Yöntemiyle Antifungal Direncinin Belirlenmesi

Antifungal direncinin belirlenmesi amacıyla disk diffüzyon testi NCCLS M44A dökümanında bildirilen prosedüre göre %2 oranında glikoz ve litresinde 0,5 miligram Metilen Mavisini içeren Müller Hinton Agar kullanılarak yapıldı. Antifungal direncin belirlenmesi amacıyla; Amphotericin B (20µg, Bioanalyse), Ketocanazole (10-50ug, Bioanalyse), Itracanazole (10ug-50ug, Bioanalyse), Flucanazole (25ug, Bioanalyse), Voricanazole (1ug, Bioanalyse), Fluorocytosine (1ug, Bioanalyse) ve Posacanazole (5ug, Bioanalyse) kullanıldı.

Aktive edilmiş olan izolatlar steril PBS (pH7,2) içerisinde MacFarland 0,5'e göre süspansiyon edildi. Steril pamuklu svaplar ile 100 µl hacminde süspansiyon besiyeri yüzeyine yayıldı. Besi yerleri 10 dakika süre ile oda sıcaklığında kurutulduktan sonra antifungal diskler besiyeri üzerine yerleştirildi ve mayalar için 35°C'de 24 saat süreyle, mantarlar için ise 35°C'de 48 saat süreyle inkübe edildi. Duyarlılıkları disk etrafında oluşan etkenin üremediği alanın çapı ölçülerek değerlendirildi (Şekil 3.1).

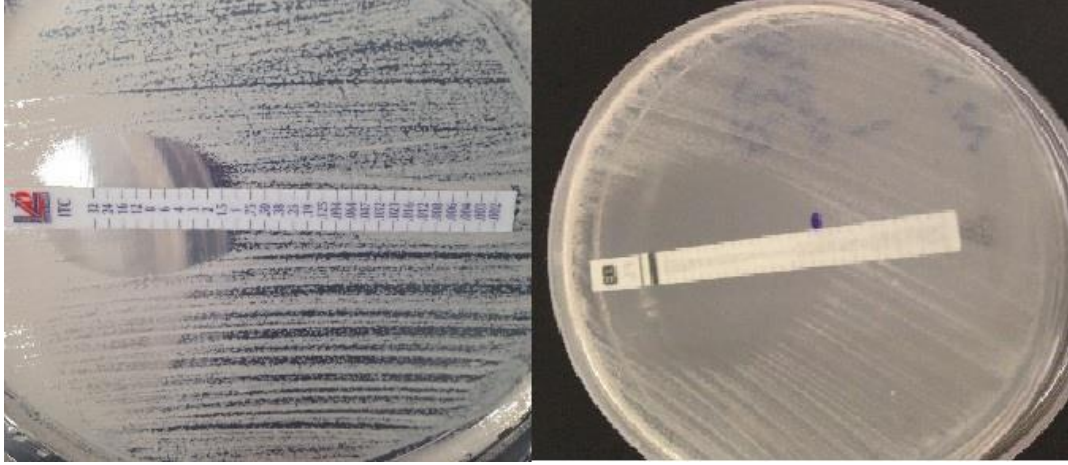


Şekil 3.1. Mueller-Hilton Agar(% 2 dektroz+0,6 µg metilen mavisi)'la yapılan antifungal disk difüzyon zonlarının görünümü.

3.2.5. E-Test ile Minimal İnhibitör Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

İzole edilen maya ve mantarlara antifungal etkili maddelerin minimal inhibitör konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla Müller Hinton Agar kullanıldı. Bu amaçla, Amphotericin B (E test 0.002 to 32 mg/L E test, Liofilchem), Ketoconazole (E test 0.002 to 32 mg/L E test, Liofilchem), Itraconazole (E test 0.002 to 32 mg/L E test, Liofilchem), Fluconazole (0.16 to 256 mg/L E test, Liofilchem), Voriconazole (E test 0.002 to 32 mg/L, Liofilchem), 5-Fluorocytosine (E test 0.002 to 32 mg/L E test, Liofilchem) ve Posaconazole (E test, Liofilchem) şeritleri kullanıldı. Steril PBS (pH 7,2) içerisinde MacFarland 0,5'e göre süspansiyon edilen 100 µl etken, steril pamuklu svaplar ile besiyeri yüzeyine yayıldı.

Ekim yapılan besi yerleri 10 dakika süre ile oda ısısında kurtulduktan sonra E-Test şeritleri yerleştirildi ve etüve kaldırılarak mayalar için 35°C'de 24saat süreyle, mantarlar için ise 35°C'de 48 saat süreyle inkübe edildi ve sonuçlar süre sonunda değerlendirildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Mueller-Hilton Agar (% 2 dektroz+0.6 µg metilen mavisi)'la yapılan E Test zonlarının görünümü.

3.3. Moleküler Analizler

3.3.1. DNA İzolasyonu

Çalışma kapsamında izole edilen maya ve mantar kültürlerinden DNA izolasyonu fenol/kloroform yöntemi kullanılarak yapıldı (Sambrook ve ark. 2001).

Sabouraud Dextrose Agar'da pasajı yapılan maya ve mantar kültürlerinden bir öze dolusu alınarak 1 ml steril PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4) içeren ependorf tüplere aktarıldı ve vortekslenerek süspansiyon edildi. Tüpler 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atılarak dipteki pellet 1ml TES buffer (10 mM Tris-HCL [pH 8], 1 mM EDTA, 1 mM NaCl) eklenerek süspansiyon edildikten sonra tekrar santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra pellet, lizozim (12.5 µg/ml) içeren 500 µl TES buffer ile süspansiyon edilerek 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Ardından 20 µl %10'luk Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) ve 10 µl Proteinaz K (10 µg/µl) ilave edilip 65°C'de 20 dakika inkübe edildi. Protein ve diğer hücre artıklarının bağlanması için karışım üzerine, eşit miktarda fenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) ilave edilip vortekslendikten sonra 10 000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Üst tabaka dikkatlice yeni

bir tüpe alınarak üzerine 0.1 hacim 3 M sodium acetate ve 1 hacim absolut etanol ilave edilerek -20°C'de bir gece bekletildi. Karışım 13 000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Pellet önce % 90, sonra % 70'lik etanol ile yıkandı. Pellet kurutulduktan sonra 100 µl DEPC su (Dietil pirokarbonat ile muamele edilmiş distile su) ile süspanse edildi. Bu süspanسیون PCR analizlerinde kullanılmak üzere -20°C'de saklandı. Bu sıvıdan alınan 2 µl hacminde örnek PCR'de kalıp DNA olarak kullanıldı.

3.3.2. İzolatların PCR ile Konfirmasyonu

Çalışmada izole edilen mantarlar (*Apergillus spp.*) ve mayalar (*Candida spp.*, *C. neoformans* ve *Prototheca zopfii*), daha önceki çalışmalarda bildilen genuslar ve türler yönünden spesifik primerler kullanılarak PCR ile belirlendi. Çalışmada kullanılan primerlere ve kaynaklarına ilişkin bilgiler Çizelge 3.5'de gösterildi.

Her bir örnek için PCR karışımı; 2,5 µl 10x PCR tamponu, 3 mM MgCl₂, 200 µM dNTP (10 mM), 20 pmol primer forward, 20 pmol primer reverse ve 1U Taq DNA polimeraz katıldı ve toplam hacmi 23 µl olacak şekilde distile su eklenerek tamamlandı.

Bu ana karışımdan 23'er µl dağıtıldı ve her tüpe 2 µl örnek DNA'sı eklenerek toplam reaksiyon hacmi 25 µl'ye tamamlandı. Tüm PCR karışımları aynı oranda hazırlandı. Bu karışıma göre hazırlanan örnekler çoğaltma için önceden programlanmış Thermal Cycler cihazına yerleştirildi. PCR analizleri sırasındaki hata ve kontaminasyonları belirlemek için pozitif ve negatif kontrol kullanıldı.

Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan primer dizileri ve özellikleri

Etken	Primer dizisi	AT	Ürün uzunluğu	Kaynak
<i>C. neoformans</i>	Cap1 5'-GAGTGTCTCCGCAACCCGCA-3'	60 °C	600 bp	Kano Niesters HGM (2001)
	Cap2 5'-CCTACTCTGCCAAATCAACTC-3'			
<i>Candida spp.</i>	Cab15'-TATTAAGTTGTTGCAG-3'	52 °C	180 bp	Niesters HGM Niesters HGM 1993
	Cab2 5'-CCTGCTTTGAACACTCTAATTT-3'			
<i>Aspergillus spp.</i>	ASP1 5'-CGGCCCTTAAATAGCCCGGTC-3'	55 °C	363 bp	W J Melchers ve ark 1994
	ASP2 5'-ACCCCCCTGAGCCAGTCCG-3'			
<i>P. zopfii</i>	18 PZF1 5'- ACAATACGTAGCGATGCCGAACT-3'	55 °C	233 bp	Onozaki, M ve ark 2009
	18 PZR1 5'- GCCAGCCAGAGGACGCCGAA-3'			

Amplifikasyon işlemi, 94°C'de 3 dakika ön denatürasyon, 94°C'de 45 saniye DNA sarmalındaki zincirlerin ayrılması (denatürasyon), herbir primer çiftine özel olarak seçilen ısı derecelerinde (Çizelge 3.5) 45 saniye primer bağlanması (annealing temperatures, AT), 72°C'de 90 saniye tutularak yeni DNA zincirinin sentezlenmesi (ekstensiyon) protokolü uygulanarak gerçekleştirildi. Bu protokol kullanılarak toplam 30 döngü yapıldı. En son aşamada 72°C'de 7 dakika bekletilerek reaksiyon tamamlandı.

3.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme

Yapılan amplifikasyon işleminden sonra Agaroz jel elektroforezi için %1,5'lik 200 ml jel hazırlandı. Hazırlama sırasında 3 g agaroz (Vivantis) 200 ml 0,5X TBE buffer (Tris Borat EDTA Buffer) ile karıştırıldı. İyiye eritildikten sonra içerisine 10 µl ethidium bromür ilave edilerek soğuması beklendi. Daha sonra kalıp içine döküldü ve taraklar yerleştirildi. Jelin katılaşmasının ardından jel kalıbı ile beraber elektroforez tankına yerleştirilerek amplifikasyon ürünleri taraklar tarafından oluşturulan çukurlara

10 µl olacak şekilde 6X Gel Loading Dye ile karıştırılarak yüklendi. Yüklenen PCR ürünleri jel elektroforezinde 180 V'da 60 dakika boyunca koşturuldu. Çıkan sonuçlar UV ışık altında incelenerek fotoğrafları çekildi. Değerlendirmede, marker (Vivantis, 100 bp plus) kullanıldı.

4. BULGULAR

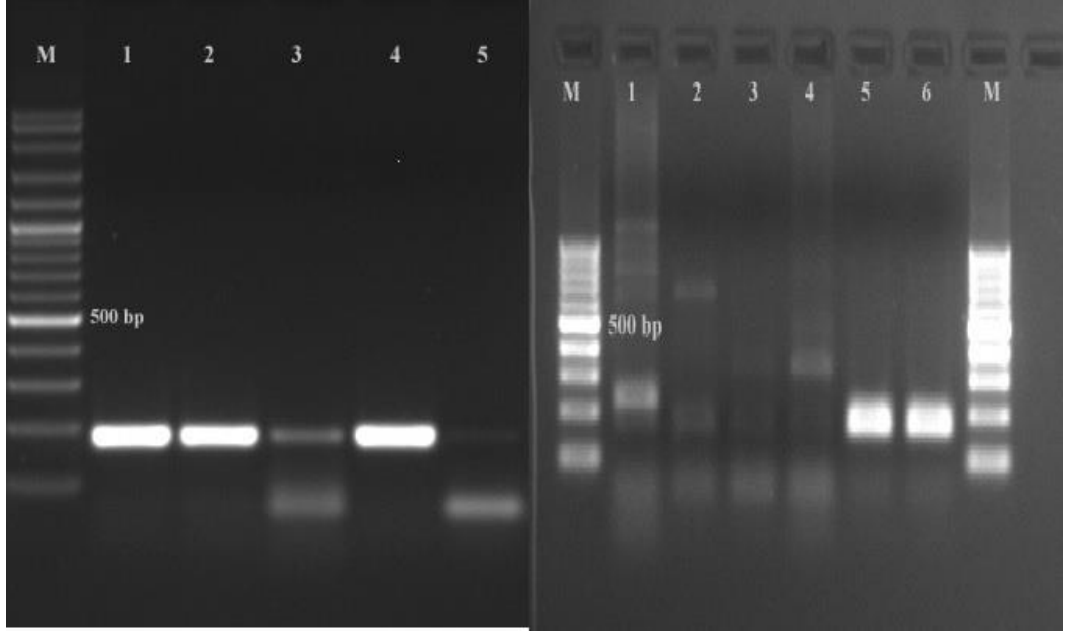
Çalışma kapsamında yapılan klinik muayene ve CMT analizleri sonucunda 200 koyun süt örneğinden 24 (%12), 200 keçi süt örneğinden 48 (% 24), 400 inek süt örneğinden 94 (% 23,5) adedi CMT+ olarak belirlendi. Örnekleme sadece CMT+ süt örneklerinden yapıldı.

Çalışma kapsamında sığır, koyun ve keçi mastitislerinden yapılan ekimler neticesinde Sabouraud Dextrose Agar (20.000 Unite Penisillin G /L)'da üreyen kolonilerin mikolojik değerlendirmeleri sonucunda 24 koyun süt örneğinin 2 (% 8,34)'sinden maya, 7 (% 29,17)'sinden mantar izole edildi. Toplam 48 keçi süt örneğinin üçünden (% 6,25) maya ve 15'inden (% 31,25) mantar izole edildi. İneklerden alınan 94 süt örneğinden ise 7 (% 7,45) maya ve 19 (% 20,22) mantar izolasyonu gerçekleştirildi. Böylelikle 3 türe ait süt örneklerinden toplam 12 maya 41 de mantar izole edildi.

Çizelge 4.1. İzole edilen maya ve mantar kolonilerinin türlere göre dağılımı.

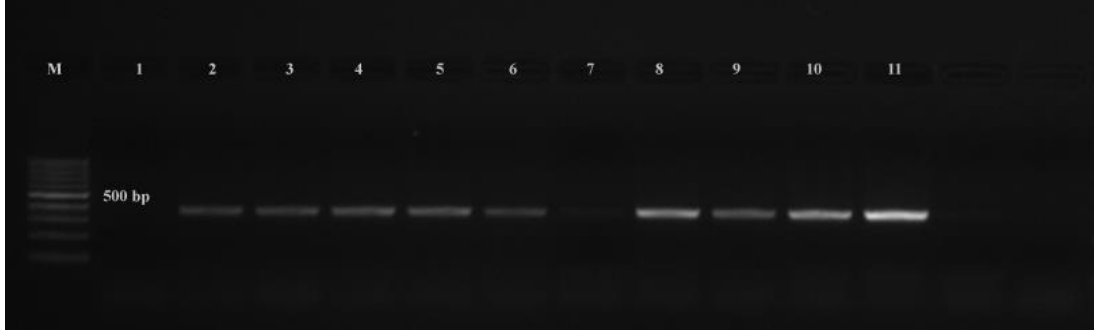
Hayvan türü	Koyun	Keçi	İnek
Süt örnek sayısı	200	200	400
CMT+ örnek sayısı	24	48	94
Maya izolasyonu	2 (% 8,34)	3 (% 6,25)	7 (% 7,45)
Mantar izolasyonu	7 (% 29,17)	15 (% 31,25)	19 (% 20,22)

İzole edilen toplam 12 maya isolatının mikolojik muayeneleri sonucunda tamamının *Candida spp.* olduğu belirlendi. Yapılan PCR analizleri bu izolatların *Candida spp.* oldukları teyit edilirken (Şekil 4.1), mayalarda yapılan PCR analizleri sonucunda *C. neoformansa* ve *Prototheca zopfii*'ye rastlanmadı.



Şekil 4.1. *C. Albicans*'a ait 180 bp'lik bantların agaroz jelde görüntülenmesi.(M; Marker, 1000 bp plus, 1-5 ve 5-6; Agaroz Jelde *C. Albicans*'a özgül bantlar (180 bp)).

İzole edilen toplam 41 mantar izolatının mikolojik incelemelerinde 7 koyun izolatının 6'sı, 15 keçi izolatının 10'u ve 19 inek izolatının 14'ü *Aspergillus spp.* olarak tanımlanmıştır (Şekil 4.2). *Aspergillus spp.* spesifik primerlerin kullanıldığı PCR analizleri ile de bu tanımlamalar doğrulanmıştır.



Şekil 4.2. *Aspergillus spp.*'a ait 363 bp'lik bantların agaroz jelde görüntülenmesi. (M; Marker, 1000 bp plus, 2-11; Agaroz Jelde *Aspergillus spp.*'ye özgül bantlar (363 bp).

Mantarlar ve mayalar için disk difüzyon yöntemiyle yapılan antifungal duyarlılık sonuçları Çizelge 4.2. de gösterildi.

Çizelge 4.2. Antifungal disk difüzyon sonuçları.

	Fluconazole (25µg)	Posaconazole (5µg)	Ketoconazole (10-50µg)	Itraconazole (10µg-50µg)	Voriconazole(1µg)	Amphotericin B (20µg)	Flucytosine (1µg)
Maya izolatları (12 örnek)	% 100 R (12 örn)	% 91,66 R (11 örn)	% 50 R (6 örn)	% 91,66R (11 örn)	% 83,33 R (10 örn)	% 83,33 R (10 örn)	% 91,66R (11 örn)
	0	% 8,34 S (1 örn)	% 50 S (6 örn)	% 8,34 S (1 örn)	% 16,67 S (2 örn)	% 16,67 S (2 örn)	% 8,34 S (1 örn)
Mantar izolatları (30 örnek)	% 100 R (30 örn)	% 13,33R (4 örn)	% 13,33R (4 örn)	% 93,33R (28 örn)	% 10 R (3 örn)	% 40 R (12 örn)	% 96,66R (29 örn)
	0	% 86,67 S (26 örn)	% 86,67S (26 örn)	% 6,67 S (2 örn)	% 90 S (27 örn)	% 60 S (18 örn)	% 3,34 S (1 örn)

Ayrıca izole edilen maya ve mantarlar için E test yöntemiyle her bir etken madde için duyarlılık alt limitlerinin dağılımı belirlendi. Mayalar için dağılım Çizelge 4.3'te mantarlar için dağılım ise Çizelge 4.4'te gösterildi.

Çizelge 4.3. Mayalar için E-Test duyarlılık sonuçları

E-test Stripleri	Duyarlılık alt limitleri
Fluconazole (0.16-256mg/L)	0.50-50 <
Posaconazole(0.002-32 mg/L))	1-8 <
Ketoconazole (0.002-32 mg/L)	0,047-1 <
Itraconazole (0.002-32mg/L)	1 <
Voriconazole (0.002-32 mg/L)	0.125-19 <
Amphotericin B (0.002-32 mg/L)	0.38-25 <
Flucytosine (0.002-32 mg/L)	0.064-38 <

Çizelge 4.4. Mantarlar için E-Test duyarlılık sonuçları

E-test Stripleri	Duyarlılık alt limitleri
Fluconazole (0.16-256mg/L)	216 <
Posaconazole(0.002-32 mg/L))	1.5-3 <
Ketoconazole (0.002-32 mg/L)	3-8 <
Itraconazole (0.002-32mg/L)	6 <
Voriconazole (0.002-32 mg/L)	0.19-0.38<
Amphotericin B (0.002-32 mg/L)	0.19-0.38<
Flucytosine (0.002-32 mg/L)	0.75-1<

Çalışmada mayaların antifungal duyarlılıklarını belirlemek için yaptığımız E-Testi sonucunda Flukonazolün candida türlerine karşı etkisiz olduğu görülmüştür. Çalışmamızda izole edilen tüm maya (Candida) suşlarının fluconazole (0.16-256mg/L) ait E-test ile 48 saatte MİK değerleri 50-50 < mg/L olarak saptanmıştır. Ayrıca diğer antifungallere ait E-test mik degerleri şöyledir. Posaconazole (0.002-32 mg/L) için E-test ile MİK değeri 48 saatte 1-8 mg/L< arasında; Ketoconazole (0.002-32 mg/L) için E-test ile MİK değeri 48 saatte 0,047-1 mg/L< arasında; Itraconazole (0.002-32mg/L) için E-test ile MİK değeri 48 saatte 1 mg/L < arasında; Voriconazole (0.002-32 mg/L) için E-test ile MİK değeri 48 saatte 0,125-19 mg/L < arasında; Amphotericin B (0.002-32 mg/L) için E-test ile MİK değeri 48 saatte 0,38-0,25 mg/L < arasında; Flucytosine (0.002-32 mg/L) için E-test ile MİK değeri 48 saatte 0,064-38 mg/L < olarak tespit edildi.

5. TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında Hatay'da bulunan sütçü inek, koyun ve keçi işletmelerindeki mikotik mastitislerin varlığı, yaygınlığı ve izole edilen etkenlerin antifungal ajanlara karşı duyarlılıkları ile ajanların minimal inhibitör konsantrasyonları belirlendi. Çalışmada izole edilen maya ve mantarların PCR ile identifikasyonları teyit edildi.

Örneklenen işletmelerde, çalışma kapsamından yapılan klinik muayene ve CMT analizleri sonucunda 200 koyun süt örneğinden 24 (%12)'ü, 200 keçi süt örneğinden 48'i (% 24), 400 inek süt örneğinden 94'ü (% 23,5) olmak üzere toplam 166 (% 20,75) süt örneği CMT+ olarak belirlendi.

İki yüz koyun süt örneğinin 2 (% 1)'sinden maya, 7 (% 3,5)'sinden mantar izole edildi. Bu 2 mayanın *Candida spp*, 7 mantar izolatının 6 tanesinin *Aspergillus spp*. olduğu tespit edildi. Diğer mantar izolatının ise *Mucor spp*. olduğu belirlendi. Keçilerden alınan 200 süt örneğinden 3 (% 1,5) maya ve 15 (% 7,5) mantar izole edildi. Bu 3 maya kolonisinin *Candida spp*. 15 mantar izolatınının 10 tanesinin *Aspergillus spp*. olduğu diğerlerinin ise, 2 tanesinin *Mucor spp*. 3 tanesinin *Trichosporon spp*. olduğu tespit edildi. İneklerden alınan 400 adet süt örneğinden 7 (% 1,75) maya ve 19 (% 4,75) mantar izole edildi. İzole edilen 7 maya kolonisinin tamamı *Candida spp*, 19 mantar kolonisinin 14'ü *Aspergillus spp*. diğerlerinin ise *Trichosporon spp*. olduğu belirlendi.

Çalışmada 2 koyun, 3 keçi ve 7 inek süt örneklerinden olmak üzere toplam 12 maya izolatu elde edildi. Maya izolatlarının tamamı *Candida spp*. (12 adet) olduğu PCR ile teyit edildi. Aynı şekilde 7 koyun, 15 keçi ve 19 inek süt örneğinden olmak üzere toplam 41 mantar izolatının 30 *Aspergillus spp*. olduğu tespit edildi. Böylelikle koyunlardaki mikotik mastitis oranı % 4,5; keçilerdeki % 9; sığırlardaki ise % 6.5 olarak bulundu. Üç türe ait toplam mikotik mastitis oranı % 20 olarak bulundu.

Ülkemizde mastitisler üzerinde yapılan ilk araştırmalardan birinde Öktem ve Anteplioğlu'nun (1962) 100 sağmal inekten toplanan 400 örnekle yaptıkları çalışmada, bu ineklerin 185'inde mastitis tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Arda ve İstanbulluoğlu'nun 1277 adet süt ineğinde yaptıkları çalışmada (1980), mastitislere

neden olan aerob, anaerob, mikoplazma ve mantarların izolasyonu, identifikasyonu, bunlara karşı etkili olan antibiyotik ve fungusitlerin saptandığı çalışmada *Candida albicans* (% 8.8) izole ve identifiye edildiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada yapılan in vitro duyarlık testlerinde *Candida albicans*'a karşı en etkili etken maddelerin nystatin veya kristal violet olduğu bildirilmiştir.

Ergün ve ark. (2004), Hatay yöresinde 11 farklı belde ve ilçede, her birinde 3 ila 10 baş inek bulunan aile tipi süt sığırı işletmelerinde yaptıkları bir çalışmada 160 inekten alınan 640 adet süt numunesi almışlar ve bunların CMT ile yapılan analizlerinde mastitis oranını % 40,9 (262 adet süt örneği) olarak belirlemişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada araştırmacılar CMT pozitif bu örneklerin mikrobiyolojik analizlerinde örneklerin % 1,7 (6 adet)'sinde *Candida spp.* izole edildiğini bildirmişlerdir.

Cantekin ve ark (2015), Hatay yöresinde 50 baş ve üzeri hayvan bulunan, iyi bakım ve besleme prosedürlerinin sağım öncesi ve sonrası meme daldırma ve dezenfeksiyon işlemlerinin düzenli yapıldığı on farklı süt sığırcılık işletmesinde yaptıkları çalışmada, 540 inekten 79 adedinde (14,6%) subklinik mastitis belirlemişlerdir. Araştırmacılar klasik kültür ve süt örneğinden direkt olarak yaptıkları PCR analizlerini karşılaştırdıkları bu çalışmalarında ve bu 79 örneğin mikrobiyoloji analizleri neticesinde 2 adedinde (2,5%) *Candida spp.* belirlediklerini bildirmişlerdir.

Ergün ve ark. (2009), Hatay yöresinde halk elinde yetiştirilmekte olan 16 farklı ivesi ırkı koyun işletmesinde toplam 729 ivesi koyununa ait 1458 sut örneği ile yaptıkları çalışmada subklinik mastitislerin prevalans ve etiyolojisinin belirlenmeyi amaçlamışlardır. Araştırmacılar bu çalışma sonucunda CMT ile koyunların 135'inde (% 18,5) ve meme yarımalarının 170'inde (% 11,7) CMT pozitif sonuç elde ederek subklinik mastitis düzeyini belirlemişler ancak yaptıkları kültür analizlerinde maya ya da mantar izolasyonu olmadığını bildirmişlerdir.

Doğruer ve ark (2013) yılında Hatay yöresinde yetiştirilen Keçilerde subklinik mastitislerde prevalans, etiyoloji ve mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılıkları araştırmış, bu çalışma ile 505 adet keçiye ait 1010 meme başından aldıkları örneklerde CMT ile mastitis oranının %20,9 olduğunu bildirmişlerdir. Ancak araştırmacılar bu çalışmada maya veya mantar izolasyonu olmadığını bildirmişlerdir.

Sunulan çalışmada maya örneğiyle yapılan antifungal disk difüzyon yöntemi sonucunda, Fluconazole'e %100; Posaconazole'e %91,66; Ketoconazole'e %50;

Itraconazole'e %91,66; Voriconazole'e %83,33; Amphotericin B'ye %83,33; Flucytosine % 91,66 dirençli olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca mantar örnekleriyle yapılan antifungal disk difüzyon yöntemi sonucunda, Fluconazole'e %100; Posaconazole'e %13,33; Ketoconazole'e %13,33; Itraconazole %93,33; Voriconazole'e %10; Amphotericin B'ye %40; Flucytosine %96,66, dirençli olduğu gözlemlenmiştir.

Lassa ve Malinowski (2007), sığır mastitislerinden izole ettikleri 319 maya ve 168 alg izolatında yaptıkları bir çalışmada, bu etkenlerin çeşitli antimikrobiyellere karşı direnç ve duyarlılıklarını belirlemişlerdir. Yaptıkları analizler neticesinde mayaların en çok %75 dolayında amphotericin B'ye, %66'sının fluconazole'e, %40'ının pimaricin ve itrakonazole dirençli olduğunu belirlemişler, alglerin ise çoğu etken maddeye tamamen dirençli olduklarının sadece nystatin, amphotericin B, ve pimaricin'e karşı duyarlılık belirlediklerini bildirmişlerdir.

Pachauri ve ark (2013), sığır ve mandalarda mikotik mastitislerin varlığı ve yaygınlığı konusunda yaptıkları bir çalışmalarında 80 adedi subklinik, 20 adedi de klinik mastitislerden olmak üzere toplam 100 süt örneğinin mikolojik kültürleri sonucunda 64 (%64) adedinde mikolojik üreme olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar izole ettikleri mayalardan 26 adedinin *Candida albicans* ve 38 adedinin *Aspergillus spp.* (17 adedi *A. fumigatus*, 21 adedi *A. niger*) olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu denli bir yüksek oranda mikotik mastitis sıklığının, işletmelerin kötü hijyen koşulları, maya ve mantar etkenlerinin çevrede yaygınlığı ve ayrıca özellikle bakteriyel mastitis vakalarında yoğun ve bilinçsiz antibiyotik kullanımına bağlı olarak gelişmiş olabileceğini vurgulamışlardır. Ayrıca bu çalışma neticesinde mastitislerden izole edilen mikotik etkenlerin çeşitli antifungallere karşı duyarlılıklarının belirlenmesinin yararlı olabileceğini bildirmişlerdir.

Çiftci ve ark (1996), Konya ve Beyşehir'de mezbahada kesilen 500 keçide yaptıkları çalışmada, kesim öncesinde süt alarak CMT analizleri yapmışlar ve bu analiz sonucunda pozitif buldukları 55 baş keçiden 66 adet meme lobundan süt örneği alarak mikrobiyolojik kültür amacıyla ekimler yapmışlardır. Ayrıca araştırmacılar bu çalışmada kesim sonrasında meme dokusu ve supra mammar lenf düğümlerinden örnek alarak patolojik incelemeler de yapmışlardır. Araştırmacılar yaptıkları bu çalışma neticesinde ekim yaptıkları süt numunelerinin 34'ünde üreme olduğunu, 26'sında ise

her hangi bir üreme olmadığını belirtmişlerdir. Üreyen 34 etkenin 2 (%5,9) adedinin maya olduğunu bildirmişlerdir.

El-Razik ve ark (2011), Mısırda yaptıkları bir çalışmada, 71'i inek ve 52'si de mandalardan olmak üzere toplam 123 adet süt örneğini mikotik mastitisler yönünden incelemişler ve bunun sonucunda 24 örnekte *Candida albicans* 7 örnekte ise *Aspergillus fumigatus* ürediğini bildirmişlerdir.

Spanamberg ve ark (2008), Brezilya'da süt sığırlarında yaptıkları bir çalışmada 54'ü klinik mastitis 194'ü subklinik olmak üzere toplam 242 adet süt örneğinden yaptıkları ekimler sonucunda 43 (% 17,3) adedinde maya kökenli mastitis belirlemişlerdir. Üreyen etkenler arasında ise yaygın olarak sırasıyla *Candida spp.* (%37.9), *Pichia spp.* (%19.1), *Cryptococcus spp.* (%10.3) ve *Rhodotorula spp.* (%10.3) belirlemişlerdir.

Sunulan çalışmada izole edilen tüm maya (*Candida spp.*) suşlarının fluconazole (0.16-256mg/L) ait E test ile 48 saatte MİK değerleri 50-50 < mg/L olarak saptanmıştır. Ayrıca diğer antifungallere ait E test mik degerleri şöyledir. Posaconazole (0.002-32 mg/L) için E-test ile MİK değeri 48 saatte 1-8 mg/L < arasında; Ketoconazole (0.002-32 mg/L) için E-test ile MİK değeri 48 saatte 0,047-1 mg/L < arasında; Itraconazole (0.002-32mg/L) için E-test ile MİK değeri 48 saatte 1 mg/L < arasında; Voriconazole (0.002-32 mg/L) için E-test ile MİK değeri 48 saatte 0,125-19 mg/L < arasında; Amphotericin B (0.002-32 mg/L) için E-test ile MİK değeri 48 saatte 0,38-0,25 mg/L < arasında; Flucytosine (0.002-32 mg/L) için E-test ile MİK değeri 48 saatte 0,064-38 mg/L < olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamızda mantarların (*Aspergillus spp.*) antifungal duyarlılıklarını belirlemek için yaptığımız E Testi sonucunda Flukonazolün *Aspergillus* türlerine karşı etkisiz olduğu görülmüştür. Çalışmamızda izole edilen tüm mantar (*Aspergillus spp.*) suşlarının fluconazole (0.16-256mg/L) ait E test ile 48 saatte MİK değerleri 216 < mg/L olarak saptanmıştır. Ayrıca diğer antifungallere ait E test mik degerleri şöyledir. Posaconazole (0.002-32 mg/L) için E-test ile MİK değeri 48 saatte 1,5-3 mg/L < ; Ketoconazole (0.002-32 mg/L) için E-test ile MİK değeri 48 saatte 3-8 mg/L < ; Itraconazole (0.002-32mg/L) için E-test ile MİK değeri 48 saatte 6 mg/L < ; Voriconazole (0.002-32 mg/L) için E-test ile MİK değeri 48 saatte 0,19-0,38 mg/L < ; Amphotericin B (0.002-32 mg/L) için E-test ile MİK değeri 48 saatte 0,19-0,38 mg/L <

; Flucytosine (0.002-32 mg/L) için E-test ile MİK değeri 48 saatte 0,75-1 mg/L < olarak tespit edilmiştir.

Serrano ve ark (2004), Toplam 77 *Aspergillus spp.* izolatıyla yaptıkları çalışmada etkenlerin Voriconazole karşı dirençlerini belirlemede disk diffüzyon metodu, E test ve mikrodilüsyon yöntemlerini karşılaştırmışlar ve disk diffüzyon metodunun da antifungal direncinin belirlenmesinde etkin olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Matar ve ark (2003), 400 adet *Candida spp.* izolatıyla yaptıkları bir çalışmada Fluconazole ve Voriconazole'e karşı direncin belirlenmesinde disk diffüzyon, E test ve mikrodilüsyon yöntemlerini karşılaştırmışlar ve E test ve disk diffüzyon yönteminin en az mikrodilüsyon kadar başarılı ve kullanılabilir teknikler olduğunu bildirmişlerdir. Antibiyotiklerde olduğu gibi antifungal maddeler için de referans yöntemlerinin ve buna bağlı olarakta antifungal duyarlılık yöntemlerinin geliştirildiğini vurgulamışlar ve bu alanda yapılacak çalışmaların klinisyen ve hastalar için oldukça yararlı veriler sağlayabileceğini öne sürmüşlerdir. Ayrıca antifungal direncine yönelik çalışmaların da yapılması ve devam ettirilmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Ülkemizde yapılan araştırmalar arasında mikotik mastitis etkenlerinin antifungal duyarlılıklarının belirlenmesine yönelik bir araştırmaya ulaşılamamış, bu konudaki araştırmaların genelinin insan hekimliği ve insan klinik örneklerinden izole edilen maya ve mantarların antifungal duyarlılıklarının belirlenmesine yönelik çalışmalar olduğu görülmüştür.

Dikerel ve ark (2012), insanlarda çeşitli vakalardan izole edilen *Aspergillus* başta olmak üzere *Fusarium*, *Scedosporium* ve *Zygomycetes* cinsi mantarlar ile yaptığı çalışmada etkenlerin antifungal duyarlılıkları, amfoterisin B, vorikonazol, flukonazol, kaspofungin ve posakonazole E-test ile, vorikonazol ve fluconazole disk difüzyon testiyle belirlenmiştir. E-test ile flukonazol minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri, *Scedosporium spp.* hariç, bütün suşlarda >256 mg/L, vorikonazol MİK değeri tüm *Aspergillus* türlerinde <0.38 mg/L, kaspofungin MİK değeri *Fusarium*, *Scedosporium*, *Rhizopus* ve *Bipolaris* suşlarında >32 mg/L, *Aspergillus* türlerinde ≤ 0.006-0.125 mg/L olarak saptanmıştır. Posakonazolun MİK değeri üç suşta (*Fusarium equiseti*, *Cylindrocarpon lichenicola* ve *Rhizopus oryzae*) >32 mg/L olarak bulunurken, diğer suşlarda <1.5 mg/L olarak tespit edilmiştir. Amfoterisin B MİK değeri *Fusarium*, *Scedosporium*, *Rhizopus* ve tüm *A.terreus* suşlarında >32 mg/L iken, diğer suşlarda <2

mg/L olarak bulmuşlardır. E-test ve disk difüzyonla yapılan antifungal duyarlılık sonuçlarının birbiriyle uyumlu olduğu vurgulanmıştır.

6. SONUÇ

Sunulan bu çalışma ile bölgemizde inek, koyun ve keçi sütlerinde mikotik mastitislerin varlığı ve yaygınlığı ortaya konuldu. Ayrıca, izolatların antimikotik duyarlılık testleri yapıldı ve E-test ile antimikotik ajanların minimal inhibitör konsantrasyonları belirlendi.

Çalışma bulguları ışığında aile tipi süt işletmelerinde mikotik mastitis oranının (%5,25) azınsanmayacak bir oranda olduğu görüldü. Bu durum, çalışılan işletmelerde hayvan türüne bağlı olmaksızın mastitisten korunma yöntemlerinin uygulanmadığını sık karşılaşılan mastitis vakalarının ise bilinçsiz ve yetersiz bir şekilde yapılan antibiyotik uygulamaları ile çözülmeye çalışılırken bu bilinçsiz antibiyotik uygulamalarının mikotik mastitis vakalarının artmasına neden olduğunu düşündürdü. Korunma yöntemlerinin uygulanmadığındaki esas sebebin yetiştiricilerin bu konudaki bilgi yetersizliği olabileceğinden hastalıkların varlığının belirlenmesine yönelik çalışmalar kadar yetiştiricilerin eğitilmesi ve bilinçlendirilmesine yönelik çalışmaların ve projelerin de yapılması gerektiği düşünüldü. Ülkemizde özellikle Veteriner Hekimlik alanında mikotik etkenlerin ve bunların duyarlılıklarına yönelik çalışmaların oldukça kısıtlı olması yönünden sunulan bu tez çalışmasının öncü bilgiler içerdiği ve bundan sonraki çalışmalar için yararlı veriler sağlayacağı düşünüldü.

7. KAYNAKLAR

1. **Akan M.** Mastitis patojenlerinde antimikrobiyel direnç. Türkiye Klinikleri J Vet Sci, 2010, s. 1(1): 44-49.
2. **Akay Ö., Aydın N.** Stafilokokal Mastitisler. Alınmıştır: I. Mastitis Semineri , Ed.: M. Arda, N. Aydın, E. Alaçam, Ö. Akay, H. Özgür, S. Diker. Lalahan Veteriner Zootekni Araştırma Enstitüsü Yetiştirme ve Deneme Çiftliği Müdürlüğü Ofset Tesisleri, Ankara, **1984**, s. 136-146.
3. **Akers RM.** Lactation and The Mammary Gland. 1st Ed., Blackwell Publishing, Iowa, **2002**.
4. **Alaçam E.** Mastitisin Sağıtımı. Alınmıştır: I. Mastitis Semineri , Ed.: M. Arda, N. Aydın, E. Alaçam, Ö. Akay, H. Özgür, S. Diker. Lalahan Veteriner Zootekni Araştırma Enstitüsü Yetiştirme ve Deneme Çiftliği Müdürlüğü Ofset Tesisleri, Ankara, **1984** s. 85-92.
5. **Alaçam E.** Meme Hastalıkları. Alınmıştır: Sığır Hastalıkları, Ed.: E. Alaçam, M. Şahal, 2. Baskı. Medisan Yayınevi, Ankara, **2002**, s. 389-425.
6. **Alaçam E., Küçük Ş.** Mastitise karşı aşılama yaklaşımları. Türkiye Klinikleri J Vet Sci, **2010**, s. 1(1): 50-56.
7. **Ali-VehmasT., Sandholm M.** The Balance Between Bacteria and Host-The Bacteria's Point of View. In: The Bovine Udder and Mastitis , Ed.: M. Sandholm, T. Honkanen-Buzalski, L. Kaartinen, S. Pyörala, Gummerus Kirjapaino Oy, Finland, **1995**, s. 49-58.
8. **Alpan O.** Mastitide Kalıtımın Rolü ve Genetik Direnç. Alınmıştır: I. Mastitis Semineri , Ed.: M. Arda, N. Aydın, E. Alaçam, Ö. Akay, H. özgür, S. Diker. Lalahan Veteriner Zootekni Araştırma Enstitüsü Yetiştirme ve Deneme Çiftliği Müdürlüğü Ofset Tesisleri, Ankara, **1984**, s. 30-42.
9. **Arikan S.** Current status of antifungal susceptibi- lity testing, Med Mycol **2007** s. 45(7):569-87. <http://dx.doi.org/10.1080/13693780701436794> PMID:17885947.
10. **Baştan A.** İneklerde Mastitis. Hatiboğlu Yayınevi, Ankara, **2002**.
11. **Baştan A.** İneklerde Meme Sağlığı ve Sorunları. Kardelen Ofset, Ankara, **2010a**.
12. **Baştan A.** Mastitis tedavisinde başarısızlık nedenleri. Türkiye Klinikleri J Vet Sci , **2010b**, s. 1(1): 26-33.
13. **Baştan A, Cengiz M.** Kuru dönemin meme sağlığı açısından önemi ve kuru dönem tedavisi. Türkiye Klinikleri J Vet Sci , **2010**, s. 1(1): 14-21.
14. **Berkin Ş, Milli ÜH.** Mastitislerin Patolojisi. Alınmıştır: I. Mastitis Semineri , Ed.: M. Arda, N. Aydın, E. Alaçam, Ö. Akay, H. Özgür, S. Diker. Lalahan Veteriner Zootekni Araştırma Enstitüsü Yetiştirme ve Deneme Çiftliği Müdürlüğü Ofset Tesisleri, Ankara, **1984**, s. 9-16.
15. **Biggs A.** Mastitis in Cattle. 1st Ed., Times Offset, Malaysia, **2009**.
16. **Blood DC, Radostits OM, Henderson JA, Arundel JH, and Gay CC.** Diseases caused by fungi, Page 860 in Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 6th. ed., Bailyère Tindall, Eastbourne, England, **1983**.
17. **Blowey R, Edmondson P.** Mastitis Control in Dairy Herds. Farming Press, Ipswich, **1995**.

18. **Blowey RW.** Veterinary Book for Dairy Farmers. 3rd Ed., Farming Press, Ipswich, Chapter 7, **1999**.
19. **Borne BHP, Schaik G, Lam TJGM, Nielen M.** A comparison of the occurrence of mastitis in Dutch primi- and multiparous cows. In: Mastitis Control From Science to Practice , Ed.: T. J. G. M. Lam, 1st Ed., Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, **2008**, s. 55-62.
20. **Buzzini P, Turchetti B, Facelli R, Baadino R, Cavarero F, ve ark.** First large-scale isolation of *Prototheca zopfii* from milk produced by dairy herds in Italy. *Mycopathologia*. **2004**, s. 158:427–30.
21. **Cantekin Z, Ergün Y, Doğruer G, Sarıbay MK, Solmaz H:** Comparison of PCR and culture methods for diagnosis of subclinical mastitis in dairy cattle. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*,21, **2015**, s. 277-282.
22. **Carey WP, Kaykova Y, Bandres JC, Sidhu GS, and Brau N.** Cutaneous protothecosis in a patient with AIDS and a severe functional neutrophil defect: successful therapy with amphotericin B. *Clin Infect Dis* **1997**, s. 25: 1265-6.
23. **Caston JJ, Linares MJ, Gallego C, River over ark.** Risk factors for pulmonary *Aspergillus terreus* infection in patients with positive culture for filamentous fungi. *Chest* **2007**; s. 131(1): 230-6.
24. **Costa EO, Ribeiro AR, Melville PA, Prada MS, Carciofi AC, ve ark.** Bovine mastitis due to algae of the genus *Prototheca*. *Mycopathol* **1996**; s. 133 (2): 85-8.
25. **Çiftci MK, Berkin Ş, Erer H, Erganiş O, Kıran MM, ve ark.** Keçi mastitisleri üzerinde patolojik ve bakteriyolojik çalışmalar. *Vet Bil Derg*, 12(2): **1996**, s. 105–114.
26. **Davey KG, Holmes AD, Johnson EM, Szekely A, Warnock DW.** Comparative evaluation of fungi test and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*, *J Clin Microbiol*, 1998, s. 36(4):926-30. PMID:9542910 PMCID:104662
27. **Direkel Ş, Otağ F, Aslan G, Ülger M, Emekdaş G.** Klinik Örneklerden İzole Edilen Filamentöz Mantarların İki Farklı Yöntemle Tanımlanması ve Duyarlılık Sonuçları. *Mikrobiyol Bul*, **2012**, s.46(1): 65-78.
28. **Dodd F H, Booth JM.** Mastitis and Milk Production. In: The Health of Dairy Cattle, Ed.: A. H. Andrews, 1st Ed., Blackwell Science, United Kingdom, **2000**, s. 213-255.
29. **El-Razik KAA, Abdel-Rahman KA, El-Moez SIA, Daniel EN.** New approach in diagnosis and treatment of bovine mycotic mastitis in Egypt. *Afr J Microbiol Res* 5, **2011**, s. 5725–5732.
30. **Ergün Y, Aslantaş O, Doğruer G, Cantekin Z.** Hatay ilindeki aile tipi süt sığırcılığı işletmelerinde subklinik mastitislerin epidemiyolojisi. *Veteriner Bilimleri Dergisi* 20 (4): **2004**, 25-28.
31. **Ergün Y, Aslantaş Ö, Doğruer G, Kireççi E, Sarıbay MK, ve ark.** Prevalence and etiology of subclinical mastitis in Awassi dairy ewes in southern Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*,33, **2009**, s. 477-483.

32. **Espinel-Ingroff A, Pfaller M.** Susceptibility tests methods: yeasts and filamentous fungi “Murray PR, Baron EJ, Jorgensen HJ, Pfaller MA (ed). Manual of 37. Clinial Microbiology, 9. baskı” kitabında s.1972-86, ASM Press, Washinton DC, **2007**, s.1972-86.
33. **Foster RA.** Female Reproductive System. In: Pathologic Basis of Veterinary Disease, Ed.: M. D. McGavin, J. F. Zachary, 4th Ed., Academic Press, New-York, **2006**, s. 1310.
34. **Furuoka H, Anri A, Arita Y, Tuzuki N, Satoh, ve ark.** Protothecal mastitis in a cow. Jap J Vet Sci **1989**; s. 51 (1): 197-9.
35. **Gruet P, Maincent P, Berthelot X, Kaltsatos V.** Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. Advanced Drug Delivery Reviews, **2001**, s. 50: 245-259.
36. **Hodges RT, Holland JTS, Neilson FJA, Wallace NM.** *Prototheca zopfii* mastitis in a herd of dairy cows. New Zeal Vet J. **1985**, s. 33:108–111.
37. **Honkanen-Buzalski, T, Pyorala S.** Monitoring and Management of Udder Health at the Farm. In: The Bovine Udder and Mastitis , Ed.: M. Sandholm, T. Honkanen-Buzalski, L. Kaartinen, S. Pyörälä, Gummerus Kirjapaino Oy, Finland, **1995**, s. 252-260.
38. **International Dairy Federation.** Ruminant mammary gland immunity, Brussels, **2003**, s. 18.
39. **Jagielski T, Lagneau P.** Protothecosis. A pseudofungal infection. Med Mycol. **2007**, s. 17:261–270.
40. **Jánosi F, Ratz G, Szigeti M, Kulcsar J, Kerényi T, ve ark.** Pathophysiology: Review of the microbiological, pathological, and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii* , Veterinary Quarterly, **2001**, s. 23:2, 58-61.
41. **Kano R, Fujino Y, Takamoto N, Tsujimoto H. and Hasegawa A.** PCR detection of the *Cryptococcus neoformans* CAP59 gene from a biopsyspecimenfrom a case of feline cryptococcosis. J VetDiagnInvest, (**2001**), s. 13: 439–442.
42. **Kiliçoğlu Ç.** Mastitiste Klinik Tanı. Alınmıştır: I. Mastitis Semineri , Ed.: M. Arda, N. Aydın, E. Alaçam, Ö. Akay, H. özgür, S. Diker. Lalahan Veteriner Zootekni Araştırma Enstitüsü Yetiştirme ve Deneme Çiftliği Müdürlüğü Ofset Tesisleri, Ankara, **1984**, s. 69-75.
43. **Kirk JH.** Diagnosis and treatment of difficult mastitis cases.Proc. 31st Annual meeting of the National Mastitis Council, **1992**, s. 26-33.
44. **Koc AN, Gokahmetoglu S, Oguzkaya M.** Comparison of E test with the broth microdilution method in susceptibility testing of yeast isolates against four antifungals, Mycoses **2000**; s. 43(7-8):293-7.
45. **Koç AN. (2013).** Antifungal duyarlılık testleri ve klinik önemi, ANKEM Dergi **2012**; 26(Ek 2), s. 270-276.
46. **Lassa H and Malinowski E.** Resistance of yeasts and algae isolated from cow mastitic milk to antimicrobial agentS. *Bull Vet Inst Pulawy* 51, **2007**, s. 575-578.
47. **PE.** First isolation of *Prototheca zopfii* in bovine mastitis in Belgium. J de Mycologie Medicale **1996**; s. 6 (3); 145-8.
48. **Lee S C, et al.** Microbiol Immunol Infect **2009**, s. 42: 148-153.

49. **Linguist WE.** Prototheca mastitis - a case report. 20th Annual Meeting. National Mastitis Council, Inc. **1981**, s. 161-3.
50. **Matar MJ, Ostrosky-Zeichner L, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, ve ark.** Correlation between E-Test, Disk Diffusion, and Microdilution Methods for Antifungal Susceptibility Testing of Fluconazole and Voriconazole. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, **2003**, s. 47(5),1647–1651.
51. **McDonald JS, Richard JL, and Anderson AJ.** Antimicrobial susceptibility of *Prototheca zopfii* isolated from bovine intramammary infections. *Am J Vet Res* **1984** s. 45: 1079-80.
52. **Niesters HGM, Goessens WHF, Meis JFMG, Quint WGV:** Rapid, polymerase chain reaction-based identification assays for *Candida* species. *J Clin Microbiol*, **1993**, s. 31, 904-910.
53. **Onozaki M, Makimura K. and Hasegawa A.** Rapid identification of *Prototheca zopfii* by nested polymerase chain reaction based on the nuclear small subunit ribosomal DNA. *J Dermatol*, 2009, *Sci* 54, 56–59.
54. **Oral H, Gürbulak K, Kaçar C.** Meme Hastalıklarında Acil Yaklaşımlar. Alınmıştır: Veteriner Acil Klinik, Ed.: Ş. Özyaydın. Eser Ofset Matbaacılık, Erzurum, **2004**, s. 338-353.
55. **Osumi T, Kishimoto U, Kano R, et al.** *Prototheca zopfii* genotypes isolated from cow barns and bovine mastitis in Japan. *Vet Microbiol*. **2008** s. 131:419–423.
56. **Osteras O, Solverod L.** Mastitis control systems: The Norwegian experience. In: *Mastitis in Dairy Production*, Ed.: H. Hogeveen, 2nd Ed., Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, **2007**, s. 91-101.
57. **Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarcon JJ, Cajero-Juarez M, Ochoa- Zarzosa A, Lopez-meza JE, ve ark.** Innate immun response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *Journal of Infection*, **2007**, s. 54 : 399-409.
58. **Öncel G.** Mastitis Mücadelesinin Yasal Durumu ve Bu Konuda Uygulanan Projeler. Alınmıştır: I. Mastitis Semineri , Ed.: M. Arda, N. Aydın, E. Alaçam, Ö. Akay, H. Özgür, S. Diker. Lalahan Veteriner Zootekni Araştırma Enstitüsü Yetiştirme ve Deneme Çiftliği Müdürlüğü Ofset Tesisleri, Ankara, **1984**, s. 5-8.
59. **Özalp E.** Mastitisin Sütün Bileşimine Etkisi. Alınmıştır: I. Mastitis Semineri , Ed.: M. Arda, N. Aydın, E. Alaçam, Ö. Akay, H. Özgür, S. Diker. Lalahan Veteriner Zootekni Araştırma Enstitüsü Yetiştirme ve Deneme Çiftliği Müdürlüğü Ofset Tesisleri, Ankara, **1984**, s. 62-68.
60. **Pachauri S, Varshney P, Dash SK, Gupta MK.** Involvement of fungal species in bovine mastitis in andaround Mathura, India. *Vet World*, 6(7), **2013**, s. 393-395.
61. **Pfaller MA, Messer SA, Mills K, Bolmstrom A.** In vitro susceptibility testing of filamentous fungi: comparison of Etest and reference microdilution methods for determining itraconazole MICs, *J Clin Microbiol* **2000**, s. 38(9):3359-61.
62. **Pfaller MA, Diekema DJ, Sheehan DJ.** Interpretive breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* **2006**, s. 19: 435-447.
63. **Philpot WN, Nickerson SC.** *Winning The Fight Against Mastitis*. Westfalia, Naperville, **2000**.

64. **Pinho L, Ferreira J, Cabral C, Lameira R, Meireles P, ve ark.** Prevalence of mastitis pathogens in milk samples from Portuguese dairy cattle. In: *Mastitis Control From Science to Practice*, Ed.: T. J. G. M. Lam, 1st Ed., Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, **2008**, s. 47-53.
65. **Posteraro B, Romano L, Sanguinetti M, Masucci L, Morace G, ve ark.** Commercial systems for flu- conazole susceptibility testing of yeasts: comparison with the broth microdilution method, *Diagn Microbiol Infect Dis* **2000**, s. 38(1):29-36.
66. **Pore RS.** Prototheca taxonomy. *Mycopathol* **1985**, s. 90: 29-139.
67. **Rajala-Schultz PJ, Smith KL, Hogan JS, Love BC.** Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows: *Veterinary Microbiology*, **2004**, s. 102: 33–42.
68. **Serrano MC, Ramírez M, Morilla D, Valverde A, Chávez M, ve ark.** A comparative study of the disc diffusion method with the broth microdilution and Etest methods for voriconazole susceptibility testing of *Aspergillus* spp. *J Antimicrob Chemother* **2004**, s. 53, 739–742.
69. **Schalm OW, Carrol EJ, Jain NC.** *Bovine Mastitis*. Lea and Febiger, Philadelphia, USA. **1971**, s. 349- 360.
70. **Schlenstedt R, Zschock M, Kloppert B, and Wolter W.** Occurrence of *Prototheca* mastitis in dairy farms in Hessen. *Tierarztl Prax Ausg G*, **1997**; s. 25: 407-12.
71. **Schukken YH, Tikofsky LL, Zadoks, RN.** Environmental control for mastitis prevention, milk quality and food safety. In: *Mastitis in Dairy Production*, Ed.: H. Hogeveen, 2nd Ed., Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, **2007**, s. 109-114.
72. **Shahan TA, and Pore RS.** In vitro susceptibility of *Prototheca* spp. To gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother* **1991**, s. 35: 2434-5.
73. **Spanemberg A, Wunder EA Jr, Brayer Pereira DI, Argenta J, ve ark.** Diversity of yeasts from bovine mastitis in Southern Brazil. *Rev Iberoam Micol*, **2008**, s. 25: 154-156.
74. **Topuzoğlu B.** Sütçü ineklerde *Staphylococcus Aureus*'a bağlı subklinik mastitislerde uzun süreli antibiyotik tedavisinin bakteriyolojik iyileşme ve somatic hüce sayımı üzerine etkisi. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2011**.
75. **Tucker EW.** Case reports on yeast infections of the bovine udder. *Cornell, Vet.*, **1954**, s. 44:79
76. **Van Damme DM.** Use of miconazole in treatment for bovine mastitis. *Agri-Practice* **1983**, s. 9: 1425-7
77. **Yeh SG, KY Chung and HTCho.** Prevalence of yeasts in bovine mammary gland infections and teat cups of milking machines. *Korean J.Vet.Res*, **1988**, s. 28:361
78. **Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR.** (1994). *Clinical Veterinary Microbiology*. Mosby-Year Book Europe Limited, Lynton House, London WC1H9LB, England, **1994** s. 209-236.
79. **Wayne PA,** Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard-Third Edition. CLSI Document M27-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute, **2008**.

- 80. Melchers WJ, Verweij PE, van den Hurk A, van Belkum, De Pauw BE, ve ark. General primer-mediated PCR for detection of Aspergillus species. J Clin Microbiol. 1994 Jul; s. 32(7): 1710–171.**

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Karaman ilinin Sarıveliler ilçesinde dünyaya geldi. Ortaöğretimini 1995-2003 yılları arasında Sarıveliler Ahmet Tufan Şentürk İlköğretim okulunda tamamladıktan sonra liseyi 2003-2006 arasında Sarıveliler Yunus Emre Lisesi'nde tamamladı. 2008 yılında kaydolduğu Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2012 yılında mezun oldu. 2010 yılında Anadolu Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Kamu Yönetimi bölümüne kaydoldu. 2012 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji (Veteriner) Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı. 2014 yılında Necmettin Erbakan üniversitesi Ahmet Keleşoğlu Eğitim Fakültesinde Pedagojik Formasyon diplomasını aldı.