



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**SİĞİR MASTİTİS KÖKENLİ STREPTOKOK
İZOLATLARININ BAZI VİRÜLENS ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aşur KURT

Samsun

Temmuz-2018



**ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**SİĞİR MASTİTİS KÖKENLİ STREPTOKOK
İZOLATLARININ BAZI VİRÜLENS ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aşur KURT

**Danışman
Doç. Dr. Arzu FINDIK**

**Samsun
Temmuz-2018**

T.C
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Veteriner Hekim Aşur KURT tarafından Doç. Dr. Arzu FINDIK danışmanlığında hazırlanan “Sığır Mastitis Kökenli Streptokok İzolatlarının Bazı Virülens Özelliklerinin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 05/07/2018 tarihinde yapılan sınav ile Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Murat YILDIRIM,

Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Mikrobiyoloji AbD

Üye: Doç. Dr. Arzu FINDIK

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Mikrobiyoloji AbD

Üye: Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Mikrobiyoloji AbD

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.../.../....

Prof. Dr. Ahmet UZUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam süresince her zaman bilgi ve desteği ile yanımda olan ve çalışmalarımnda beni yönlendiren, motive eden danışman hocam Doç.Dr. Arzu FINDIK'a Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr.Oktay GENÇ, Prof. Dr. Timur GÜLHAN, Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ ve Doç. Dr. Özlem BÜYÜKTANIR YAŞ'a ekonomik katkılarından dolayı Ondokuz Mayıs Üniversitesi'ne laboratuvar çalışmalarımnda önemli katkıları olan Araş. Gör. M. Gizem SEZENER'e teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından PYO.VET:1904.17.017 proje numarası ile desteklenmiştir.

ÖZET

SIĞIR MASTİTİS KÖKENLİ STREPTOKOK İZOLATLARININ BAZI VİRÜLENS ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Amaç: Bu çalışmada siğir mastitislerinden izole edilen Streptokok türlerinin fenotipik ve genotipik identifikasyonları gerçekleştirildikten sonra, suşların sahip oldukları bazı önemli virülens faktörlerini ortaya koymak, antibiyotiklere direnç profillerini belirlemek ve ayrıca gerçekleştirilecek moleküler tiplendirme yöntemi ile suşlar arasındaki genetik ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Çalışmada 22 adet Streptokok izolatu incelendi. İzolatlar konvansiyonel fenotipik testler ile ayrıca PCR ile genotipik olarak tanımlanmıştır. Suşları virülens özelliklerinden biyofilm oluşturma ve jelatinaz aktiviteleri fenotipik olarak belirlenirken, diğer bazı virülens özelliklerini kodlayan *hylB*, *fnbB*, *scpB*, *sbl*, *sip*, *pau* ve *lmb* genleri varlığı araştırıldı. Suşların 12 farklı antibiyotiğe karşı duyarlılık profilleri incelenerek çoklu direnç durumları ortaya konuldu. Samsun İli ve civarından izole edilmiş RAPD-PCR ile genotiplendirildi ve suşlar arasındaki genetik ilişki değerlendirildi.

BULGULAR: İzolatlardan 16'sı *S. dysgalactiae*, 1'i *S. agalactiae* ve 5'i *S. uberis* olarak hem fenotipik hem de genotipik olarak tanımlanmıştır. *S. agalactiae* suşu biyofilm üretimi yönünden pozitif ancak jelatinaz negatif bulunurken, *S. dysgalactiae* suşlarında biyofilm üretimi ve jelatinaz pozitiflik oranları sırasıyla %62,5 ve %75, *S. uberis* suşlarında sırasıyla %80 ve %60 bulundu. Suşların hiçbirinde *hylB*, *spbl*, *sip* ve *lmb* geni bulunamazken, *S. agalactiae* suşunda *cfb* geni belirlendi. *S. dysgalactiae* suşlarının 14'ünde (%87,5) ve 6'sında (37,5) sadece sırasıyla *mig* ve *fnbB* genleri bulunurken *S. uberis* suşlarının 4'ünde (%80) *skc* ve 2'sinde (%40) *pau* geni bulundu. RAPD tiplendirmesi sonunda *S. dysgalactiae* 3 küme ve 5 benzersiz tipe, *S. uberis* suşlarının ise 1 küme ve 3 benzersiz tipe ayrıldığı görüldü. Suşların tümünde en az 2 antibiyotiğe karşı direnç bulunurken çoklu antibiyotik direnci %81,8 oranında tespit edildi.

Sonuç: Mastitis izolatu streptokok türlerinin çeşitli virülens özellikleri yönünden fenotipik ve genotipik olarak varyasyonlar göstermesinden ve büyük ölçüde çoklu antibiyotik direnci belirlenmesinden dolayı, mastitis kontrolüne yönelik programlarda daha ayrıntılı karakterizasyon çalışmalarına yer verilmesi ve akılcı tedavi stratejilerinin geliştirilmesi gerektiği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Mastitis; Virülens özellikleri; Genotiplendirme; Antibiyotik duyarlılığı

Aşur KURT Yüksek Lisans Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi- Samsun, Temmuz-2018

ABSTRACT

DETERMINATION OF SOME VIRULENS PROPERTIES OF

STREPTOCOCCUS ISOLATES ORIGINATED FROM BOVINE MASTITIS

Aim: In this study, after phenotypic and genotypic identification of streptococcus species previously isolated from bovine mastitis, determination of some important virulence factors and antibiotic resistance profiles of the strains, and the genetic relationship between strains by molecular typing method.

Material and Method: Twenty-two streptococcus isolates were identified by conventional phenotypic tests and also genotypically by PCR. While two of the virulence properties of the strains, biofilm production and gelatinase activity, were determined by phenotypically, the presence of the genes encoding some other virulence factors such as *hylB*, *fnbB*, *scpB*, *spbl*, *sip*, *pau* and *lmb* were investigated. Susceptibility profiles of strains against 12 different antibiotics were examined and multiple resistance cases were revealed. The strains isolated from Samsun province and its vicinity were genotyped by RAPD-PCR and the genetic relationship between the strains was evaluated.

Results: Of the isolates, 16 were identified as *S. dysgalactiae*, 1 as *S. agalactiae*, 5 as *S. uberis*, both phenotypically and genotypically. While *S. agalactiae* strains were positive for biofilm production but gelatinase was negative, biofilm production and gelatinase positivity rates in *S. dysgalactiae* strains were found 62.5% and 75% respectively and in *S. uberis* strains they were 80% and 60%, respectively. The *cfb* gene was identified in the *S. agalactiae* strain while none of the strains were found to have the *hylB*, *spbl*, *sip* and *lmb* genes. Only *mig* and *fnbB* genes were found in 14 (87.5%) and 6 (37.5%) of *S. dysgalactiae* strains, respectively, while 4(80%) and 2(40%) of *S. uberis* strains had *skc* and *pau* genes, respectively. RAPD typing revealed that *S. dysgalactiae* strains were divided into 3 clusters and 5 unique types, *S. uberis* strains were divided into one cluster and 3 unique types. Resistance to at least 2 antibiotics was found in all strains, while multiple antibiotic resistance was detected in 81.8%.

Conclusion: Since streptococci isolates from mastitis have phenotypic and genotypic variations for their various virulence properties and because of the large extent of multiple antibiotic resistance determinations, it is concluded that more detailed characterization studies should be included in programs for mastitis control and rational treatment strategies should be developed.

Key words: Mastitis; Virulence properties; Genotyping; Antibiotic susceptibility

Aşur KURT Master Thesis

Ondokuz Mayıs University-Samsun, July-2018

SİMGELER VE KISALTMALAR

bp:	Base pair
CAMP:	Christie-Atkins-Munch-Petersen
IgA:	İmmunglobulin A
IgG:	İmmunglobulin G
kDa:	Kilodalton
M:	Marker
MDR:	Multi Drug Resistance
MLST:	Multi Locus Sequence Typing
MLVA:	Multi Locus Variable Tandem Repeat Analysis
PCR:	Polymerase Chain Reaction
PFGE:	Pulsed Field Gel Electrophoresis
Rep-PCR:	Repetitive element palindromic PCR
UPGMA:	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages
TÜİK:	Türkiye İstatistik Kurumu

İÇİNDEKİLER	
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.2. Sığır Mastitisine Neden Olan Streptokok Türleri ve Bu Etkenlerin İdentifikasyonu	6
2.3. Mastitise Neden Olan Streptokok Türlerinin Genotipik İdentifikasyonu ve.....	8
2.4. Streptococcus Patogenez ve Patojenitesi	9
2.4.1. <i>Streptococcus agalactiae</i> 'nin Virülens Faktörleri	9
2.4.2. <i>S. dysgalactiae</i> 'nin Virülens Faktörleri	11
2.4.3. <i>S. uberis</i> 'in Virülens Faktörleri.....	17
2.5. Süt İneği Yetiştiriciliğinde Antibiyotik Kullanımı ve Antibiyotik Direnç Sorunu	18
3. MATERYAL VE METOT	20
3.1. Bakteri Suşları.....	20
3.2. Besi Yerleri.....	20
3.3. Bakteriyel Kültür ve İdentifikasyon	20
3.4. Fenotipik İdentifikasyonda Kullanılan Testler.....	20
3.4.1. Katalaz Testi.....	20
3.4.2. Eskülin Hidrolizi.....	21
3.4.3. Sodyum Hippurat Testi	21
3.4.5. CAMP testi.....	21
3.4.6. Karbonhidrat fermentasyon testleri	21
3.5. Bazı virülens özelliklerinin fenotipik olarak belirlenmesi.....	22
3.5.1. Biyofilm Üretimi.....	22
3.5.2. Jelatinaz Testi.....	22
3.6. Genotipik İdentifikasyon ve Virülens Genlerinin Belirlenmesi	22
3.6.1. Oligonükleotid Primerler	22
3.6.2. <i>Streptococcus</i> Cins Spesifik PCR	24
3.6.3. Streptococcus Tür Spesifik Multipleks PCR	24
3.6.4. Virülens Genlerinin PCR ile Belirlenmesi.....	25
3.7. Antibiyotik Duyarlılık Profili.....	25

3.8. İzolatların RAPD-PCR ile Genotiplendirilmesi	26
3.9. RAPD-PCR Analizlerinin Tekrarlanabilirlik, Ayırt Edici İndeks (DI) ve Güven Aralıkları (CI)	26
4. BULGULAR.....	27
4.1. Suşların Fenotipik İdentifikasyonu	27
4.2. Suşların Bazı Virülens Özelliklerinin Fenotipik Olarak Belirlenmesi	28
4.2.1. Biyofilm oluşumu	28
4.2.2. Jelatinaz Aktivitesi	28
4.3. Suşların Genotipik İdentifikasyonu ve Virülens Genlerinin Belirlenmesi	29
4.3.1. Streptococcus Cins Spesifik PCR	29
4.3.2. Streptococcus Tür Spesifik PCR Analizleri	30
4.3. Virülens Genlerinin PCR ile Belirlenmesi.....	31
4.4. RAPD-PCR.....	33
4.5. Tekrarlanabilirlik, Ayırt Edici İndeks ve Güven Aralıkları	35
4.6. Antibiyotik Duyarlılık Profili.....	36
5. TARTIŞMA	39
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	47
7. KAYNAKLAR.....	48

1. GİRİŞ

Dünya toplam süt üretimi içinde en önemli pay inek sütüne aittir. Türkiye’de toplam sığır varlığı TÜİK Haziran 2016 verileri itibariyle 14.182.876’dır. TÜİK, 2015 verilerine göre sığır varlığının yaklaşık %39,5’i sağılan hayvanlar olup süt üretimi 13 milyon tondan fazladır. Aynı yılın toplam süt üretiminin %90,7’si inek sütünden oluşmaktadır. Tarımsal ekonominin önemli ve dinamik bir sektörünü oluşturan süt endüstrisinin ve süt sığırı yetiştiriciliğinin tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de karşılaştığı en büyük sorunların başında “mastitis” gelmektedir (Baştan, 2007). Sığır mastitisi dünyada süt yetiştiriciliğinin yapıldığı her yerde süt endüstrisine olumsuz ekonomik etki yapan en önemli hastalıklardan biridir (Vural ve ark., 2002). Mastitis, bakım ve besleme koşulları, çevre, inek ve insan faktörleri ile birlikte mikroorganizmaların birbiriyle etkileşimleri sonrası meme dokusuna giren mikroorganizmalara ve travmalara karşı bu dokunun yangısı ve gösterdiği tepkidir. Mastitis stafilokoklar, streptokoklar ve koliformları içeren sınırlı spektrumda bakteriler tarafından oluşturulur ancak herhangi bir bakteri de memeyi enfekte edebilir. Mastitise neden olan mikroorganizmalar, primer rezervuar ve bulaşma yoluna göre “kontagiyöz” ve “çevresel” etkenler olarak sınıflandırılabilir. Subklinik enfekte ineklerin memesi kontagiyöz etkenler için primer rezervuardır ve bulaşma bu enfekte memeden sağlıklı memeye veya diğer hayvanlara sağım sırasında bulaşabilir. Bu tip subklinik mastitise neden olan etkenler arasında *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* ve *Mycoplasma spp. (M. bovis)* yer almaktadır. Çevresel patojenler meme kanalına genellikle gübre, altlık, toprak, bitki materyali ve su aracılığıyla giren oportünistik etkenlerdir. Önemli çevresel patojenler arasında *Escherichia coli* ve *Klebsiella spp.*, *Streptococcus dysgalactiae* ve *Streptococcus uberis* yer almaktadır. Mastitis etkenleri içinde gerek kontagiyöz gerekse çevresel *Streptococcus* türleri yaygın olarak izole edilmektedir. Özellikle çevresel streptokok türleri, kontagiyöz mastitis etkenlerine karşı önlemlerin alındığı iyi yönetime sahip süt çiftliklerinde bile önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Oluşan meme infeksiyonlarının şiddeti ise bakterilerin sahip oldukları virulens faktörlerine ve konak cevabına göre değişmektedir. İnfeksiyonun oluşması için öncelikle meme bezine bakterilerin kolonize olması gerekmektedir. Kolonizasyonun sağlanması mastitis etkenlerinin epitel hücrelerine adezyonu ile başlar ve bakterinin sahip olduğu çeşitli virulens faktörleri ile infeksiyon devam ettirilir. Son

yapılan çalışmalarda geliştirilen moleküler teknikler ile bakterilerin virülens özellikleri araştırılmış ve çevresel koşulların değişimi, enfeksiyon sırasında konak-bakteri arasındaki etkileşimler sonucunda virülens özelliklerin ortaya çıkma durumunun da değiştiği belirlenmiştir.

Streptokoklar, özellikle de *S. agalactiae* patojeniteye iştirak eden çeşitli virülens faktörlerine sahiptir. Bunlar arasında polisakkarit kapsül gibi yapısal komponentler ile toksin ve enzimler yer almaktadır. Ayrıca, streptokok türlerinin çeşitli hücre-iilişkili ve ekstrasellüler faktörleri de identifiye edilmiştir. Sığır mastitisine neden olan streptokokların virülens faktörlerinin identifiye ve karakterize edilmesi, meme içi enfeksiyonun patogenezinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır (Calvinho ve ark., 1998).

Patojenik bakterilerdeki antibiyotik direnci önemli bir problem olarak bildirilmekte ve bu durum, yanlış antibiyotik kullanımının yanı sıra kısmen hayvan yetiştiriciliğinde antibiyotiklerin büyüme uyarıcı veya profilaktik ajanlar olarak kullanılmasının bir sonucu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bakterilerin virülens özellikleri içinde değerlendirilen çeşitli antibiyotiklere karşı direnç durumlarının antibakteriyel duyarlılık testleri ile belirlenmesi gerekir. Meme enfeksiyonları sonucu meydana gelecek kayıpların en aza indirilmesinde hayvanların zamanında ve etkili bir Şekilde tedavi edilmesi önem taşımaktadır. Mastitis patojenlerinin sahip oldukları virülens özelliklerinin, antibiyotik direnç durumları da dahil, belirlenmesi ve karakterize edilmesi epidemiyolojik açıdan önemli olup kontrol stratejilerine katkı sağlayacaktır.

Sığır mastitislerinin epidemiyolojisini araştırmaya yönelik çok sayıda moleküler tiplendirme metotları kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları elektroforetik bant profillerine dayalı karşılaştırmalı tiplendirme metotları ve bazıları seçilen genlerin sekansına dayalı kütüphane tiplendirme metotları iken, virülens gen dizilişleri ve tüm genom sekanslama projelerini de içermektedir. Birçok bakteri türü oldukça fazla genetik varyasyon göstermektedir ve bir tür içinde, sığır meme bezinde oldukça farklı enfeksiyon özelliklerine sahip ve sürü içinde epidemiyolojik özelliklere sahip suşlar bulunmaktadır. Mastitis patojenlerinin suş dağılımları, meme bezi, diğer hayvan veya insan vücut bölgeleri ve çevresel kaynaklar dikkate alınarak bireysel hayvanlar içinde ve hayvanlar, sürüler, ülkeler ve konak türler üzerinde araştırılmıştır.

Moleküler epidemiyolojik çalışmalar, birçok sığır mastitis patojenini için kaynakları, bulaşma yollarını ve prognozunu ve ayrıca konakçı adaptasyon ve hastalık oluşturma mekanizmalarını anlamamıza oldukça katkıda bulunmuştur (Zadoks ve ark., 2011).

Ülkemizde hala büyük ekonomik kayıplara neden olan mastitisin en önemli bakteriyel etkenlerinden olan streptokokların karakterizasyonu amacıyla yapılan bu tez çalışmasında, suşların sahip oldukları bazı önemli virulens faktörleri ile beraber antibiyotiklere direnç profilleri belirlenmiştir. Bununla birlikte moleküler tiplendirme yöntemi ile suşlar arasındaki genetik ilişkinin saptanması ve bunun virülens özellikleri ile ilişkisinin ortaya konulması da amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

Sığır mastitisleri çeşitli formlarda ortaya çıkan meme bezi yangısı olup önemli ekonomik kayıplara neden olmakla birlikte hayvan refahını da olumsuz şekilde etkilemektedir. Mastitisin ortaya çıkışında mikrobiyel, çevresel ve hayvana bağlı birçok faktör etkili olup insidens de değişiklik göstermektedir. Mastitisin en önemli nedenleri arasında bakteriyel etkenler ilk sırada yer almaktadır (Baştan, 2007).

Mastitise neden olan etkenleri, primer rezervuar ve bulaşma yoluna göre “kontagiyöz” ve “çevresel” etkenler olarak sınıflandırmak mümkündür. Çevresel mastitis, kontagiyöz patojenlerin kontrol altına alındığı çok iyi yönetilen birçok işletmede dahi önemli sorunlar yaratmaktadır. Çevresel patojenler hayvanın hemen etrafında bulunan talaş tozu, altlık, gübre ve toprak gibi materyallerde bulunur. *S. agalactiae* dışındaki *S. dysgalactiae*, *S. uberis* ve *S. bovis* gibi streptokok türleri ile birlikte *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* ve *Enterobacter aerogenes* çevresel mastitis patojenleri arasında sayılmaktadır. Bu tip etkenler esas olarak oportunistiklerdir ve konak bağışıklık cevabı yetersiz olduğunda veya kötü hijyen ve çevre koşullarında enfeksiyona neden olurlar (Schukken ve ark., 2005; Schroeder, 2009). Mastitisin önemli etkenlerinden olan streptokoklar içinde *S. uberis* ve *S. dysgalactiae* çevresel bir patojen olarak hem laktasyondaki hem de laktasyonda olmayan ineklerde klinik ve subklinik meme enfeksiyonuna neden olmaktadır (Guerin-Faubleee ve ark., 2002; Almeida ve ark., 2006). *S. agalactiae* ise kontagiyöz patojenlerden olup genellikle kronik mastitise neden olur. Teşhis edilmeyen taşıyıcı inekler patojenin sürüde yayılmasından sorumludur. Etken aynı zamanda invaziv hastalıklara ve insanlarda özellikle neonatal enfeksiyonlara da neden olmaktadır (Jain ve ark., 2012).

Bakterilerin, diğer mikroorganizmalarda da olduğu gibi, hastalık oluşturmak için veya hastalık oluşturma potansiyelini artırmak için sahip olduğu veya ürettiği çeşitli moleküllere virülens faktörleri denilmektedir. Bakteriler bu özellikleri sayesinde, kolonizasyon, immun evazyon (konak immun cevabından kaçış), immunosupresyon (konak immun cevabını baskılama), eğer hücre içi bir etkense konak hücre içine giriş veya çıkış, invazyon, konaktan besin sağlama gibi aktiviteleri yerine getirebilir. Mastitise neden olan streptokokların da potansiyel mastitis oluşturma kapasitesine iştirak eden çeşitli virülens faktörleri bulunmaktadır. Bu faktörler yapısal komponentler olabildiği gibi, toksin ve enzimler de olabilir (Brubacker, 1985; Krishnaveni ve ark., 2014).

Streptokok türlerinde hücre-ilişkili ve ekstrasellüler çeşitli faktörler identifiye edilmiştir. Etkenlerin immunglobulin G, fibrinojen, vitronektin, kollajen, plazminojen ve α -makroglobulin gibi konaktan derive edilen çeşitli plazma ve ekstrasellüler proteinlerle etkileşim içinde olabildiği, bu etkileşimlerin konak içinde yayılmayı sağlayan por oluşturan protein, yüzeyde eksprese edilen Mig proteini, hyaluronidaz ve fibrinolizin gibi virülens faktörleri aracılığıyla gerçekleştiği bildirilmiştir (Calvinho ve ark., 1998). Mastitisin patogenezi katılan faktörlerin identifiye edilerek karakterize edilmeleri, mastitisin kontrol stratejilerine önemli katkı sağlayacaktır. Zira streptokokların neden olduğu mastitislerin patogenezi kompleks ve çok faktörlü olabilmekte olup henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Calvinho ve ark., 1998; Almeida ve ark., 2006; Ding ve ark., 2016).

2.1. Streptokokların Genel Özellikleri ve Klasifikasyonu

Streptococcus cinsi içinde yer alan etkenler, tek tek, çiftler halinde veya değişik uzunlukta zincirler oluşturan Gram pozitif kok şeklindeki bakteriler olup hareketsiz, fakültatif anaerobik, katalaz ve oksidaz negatif özellikle gösterirler. Nazlı üreyen bakteriler olup üremeleri için besi yerlerine kan veya serum ilavesi gerekir. Doğada yaygın bulunan streptokokların veteriner hekimlik için önemli olan türlerinin çoğu üst solunum yolu mukozası ve alt ürogenital kanalda kommensal olarak yaşar. Streptokokların hemoliz yapma özellikleri türlere göre değişkenlik göstermekte olup genel olarak ayırımlarında ve sınıflandırılmalarında önemlidir (Markey ve ark, 2013). Streptokokların ayırımında en eski yaklaşım olan hemoliz özelliğini belirleme, Shottmuller (1903) tarafından ortaya konulmuştur. Hemoliz özellikleri üç temel tipte sınıflandırılır; beta hemoliz (tam hemoliz), alfa hemoliz (tam olmayan hemoliz) ve gama hemoliz (hemoliz yok) (Markey ve ark., 2013). Sınıflandırmada temel alınan diğer bir özellik oksijen gereksinimi olup streptokoklar aerobik, fakültatif anaerobik ve anaerobik streptokoklar olarak sınıflandırılabilir (Vasanthakumari, 2007). Genel olarak beta hemolitik streptokoklar hayvanlar için en patojenik türler olup bu etkenler sahip oldukları grup-spesifik karbonhidrat hücre duvarı antijenlerine göre, serolojik olarak A'dan H'ye ve K'dan V'ye kadar gruplandırılabilir (Lancefield grupları). Sherman (1937), streptokokların hemoliz özellikleri ve grup karbonhidrat antijenleri gibi özelliklerine göre klasifikasyonları yanında başta fermentasyon ve tolerans testleri olmak üzere fenotipik testlerinin de dikkate alındığı bir klasifikasyon önermiş ve streptokokları 4 divizyona

ayırıştır; piyojenik, viridans, laktik divizyonlar ve enterokoklar. Piyojenik divizyon içinde tanımlanmış grup antijenleri (A, B, C, E, F ve G) olan beta-hemolitik suşlar yer almaktadır. Bu divizyon, bugünkü serogruplandırmaya dayalı identifikasyon sistemlerinden belirgin bir farklılık göstermemektedir. Sherman'ın viridans divizyonu, alfa hemolitik, yüksek pH üreme koşullarını tolere edemeyen, tuz toleransı olmayan ve 10°C'de üremeyen streptokok türlerini içermektedir. Bu grup bugün de viridans streptokoklar olarak isimlendirilmektedir ve çok daha fazla sayıda tür bu klasifikasyona ilave edilmiştir. Laktik divizyon esas olarak süt ürünlerinin üretimi ile ilişkili türleri içermektedir. Bu divizyon 1980'lerin ortalarında *Lactococcus* genusu olarak yeniden klasifiye edilmiştir. Bu genus içerisinde hem insan hem de hayvanlarda enfeksiyonlara neden olan türler bulunmaktadır. Streptokokların sınıflandırılması ve identifikasyonu, sıklıkla birkaç istisna ile nitelendirilen tür tanımlamaları ile sonuçlanan, oldukça kısıtlı sayıdaki kompleks özelliklere (koloni büyüklüğü, hemoliz ve grup karbonhidrat antijenleri gibi) dayanan hiyerarşik ikiye ayrılmış bir yaklaşım ile ciddi şekilde engellenmiştir. Ayrıca kullanışsız klasifikasyon sisteminin yanında, etkenler yavaş ürediği ve izolasyon ve karakterizasyonları için ilave faktörler gerekebileceği için tür düzeyinde streptokok identifikasyonu nadiren zamanında (hastanın tedavisi bakımından) gerçekleştirilmektedir. *Streptococcus* genusu için klasifikasyon sisteminin revizyonuna uygulanan en kullanışlı araçlardan biri 16S rRNA gen sekanslamadır (Facklam, 2002).

2.2. Sığır Mastitisine Neden Olan Streptokok Türleri ve Bu Etkenlerin İdentifikasyonu

Streptokoklar çevrede yaygın olarak bulunan ve aynı zamanda ineklerin meme, mukoza ve derisinde komensal olarak da bulunan Gram-pozitif bakteriler olup bu komensal etkenlerden bazıları, bakteriler ve konak arasındaki dengenin bozulması durumlarında oportunistik enfeksiyonlara neden olmaktadır. Diğer bir kısım türler de mastitisin primer patojenleri olarak bilinir (Cleary ve Cheng, 2006). Streptokok türleri arasında, *S. agalactiae*, *S. uberis* ve *S. dysgalactiae* mastitisten izole edilen predominant mikroorganizmalardır (Eldausky ve ark., 2016). Sığır mastitisine neden olan diğer streptokok türleri arasında *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* ve *S. equi* subsp. *zooepidemicus* da sayılabilir (Markey ve ark., 2013).

Şüpheli süt örneklerinden *Streptococcus* türlerinin izolasyonu, etkenlerin üreme özellikleri ve ihtiyaçları göz önüne alınarak gerçekleştirildikten sonra koloni özellikleri,

Gram boyama özelliği, çeşitli biyokimyasal özellikleri (katalaz, eskülin hidrolizi, sodyum hippurat hidrolizi, karbonhidrat fermentasyon, vb), CAMP test, Lancefield gruplandırma, optosin ve basitrasin duyarlılıkları dikkate alınarak identifiye edilirler. API 20Strep (BioMerieux) gibi ticari sistemler de identifikasyonda kullanılabilir. Mastitise neden olan Streptokok türlerinin olası fenotipik identifikasyonu için değerlendirilen ana özellikler Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Mastitise neden olan Streptokok türlerinin fenotipik identifikasyonunda değerlendirilen başlıca özellikler (Markey ve ark., 2013’ten uyarlanmıştır)

Tür	Katalaz	Hemoliz	Eskülin hidrolizi	Na hippurat hidrolizi	CAMP	Lancefield gruplandırması	Diğer özellikler ve doğrulama testleri
<i>S. agalactiae</i>	-	β, α, γ	-	+	+	B	CAMP +
<i>S. dysgalactiae</i>	-	α	-	-	-	C	α -hemolitik, CAMP -
<i>S. uberis</i>	-	α, γ	+	+	-	-	Eskülin ayrıştırıcı
<i>S. pyogenes</i>	-	β	-	-	-	A	Basitrasine (0,04U disk) duyarlı
<i>S. pneumoniae</i>	-	α	\pm	-	-	-	Optosine duyarlı. Genellikle mukoid
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	-	β	-	-	-	C	Trehaloz-, sorbitol +, laktoz +, maltoz + (-)

+ = pozitif reaksiyon, - = negatif reaksiyon, \pm = çoğu suş pozitif, (-) = bazı suşlar negatif

2.3. Mastitise Neden Olan Streptokok Türlerinin Genotipik İdentifikasyonu ve Tiplendirilmesi

Geleneksel olarak, mastitis patojenleri klasik fenotipik mikrobiyolojik prosedürlere göre identifiye edilmekle birlikte PCR veya kitle spektroskopisine (MS) dayanan alternatif metotlar da bulunmaktadır (Raemy ve ark., 2013). Multipleks bir PCR metodu ticari olarak mevcut olup bunun genel fenotipik testlerle karşılaştırıldığında daha iyi sonuçlar verdiği ve birkaç saat içinde geniş spektrumda mastitis patojenlerini identifiye etme olanağı tanıdığı bildirilmiştir (Koskinen ve ark., 2010).

Moleküler tekniklerin, fenotipik farklılıklarla ilgili problemi çözmek suretiyle sığır *Streptococcus* spp. için daha doğru identifikasyon şeması sağlayabildiği bildirilmiştir. PCR analizleri çeşitli genlerin tür spesifik sekanslarını amplifiye etmek suretiyle sığır streptokoklarını identifiye etmek üzere geliştirilmiştir. Bu genler arasında *sodA*, *tuf*, CAMP faktör geni, tRNA intergenic region, 16S rRNA geni, 23S rRNA geni ve bu iki gen arasındaki “intergenic spacer region (IGS-genler arası bölge)” bulunmaktadır (McDonald ve ark., 2005).

Son 20 yıl içinde sığır mastitisinin epidemiyolojisini alttür düzeyinde araştırmak üzere çeşitli moleküler tiplendirme metotları kullanılmıştır. Bunlar karşılaştırmalı tiplendirme metotlarını içermekte olup elektroforetik bant paternleri, seçilmiş genlerin sekansına dayanan kütüphane tiplendirme metotları, virülens gen analizleri ve tüm genom sekanslama projelerine dayanmaktadır (Zadoks ve ark., 2011). İnsan ve sığır *S. agalactiae* popülasyonlarının ilk geniş ölçekli moleküler karşılaştırması RAPD tiplendirmesi ile yapılmış ve farklı bölgelerden izole edilen sığır suşları arasındaki genetik çeşitlilik incelenmiştir (Martinez ve ark., 2000). MLST (Multilocus sequence typing) *S. agalactiae* suş tiplendirmesinde ve patojen evriminin araştırılmasında karşılaştırmalı olarak kullanılmış, insan ve sığır suşları arasındaki ilişki araştırılmıştır (Bisharat ve ark., 2004). Mastitis patojenlerinden biri olan *S. uberis*'in moleküler tiplendirme çalışmalarında RAPD, rep-PCR veya PFGE karşılaştırmalı metotlar olarak kullanılmış ve daha sonraki yıllarda MLST şemaları geliştirilmiştir (Zadoks ve ark., 2005, Coffey ve ark., 2006, Zadoks ve ark., 2011). Gilbert ve ark. (2006), *S. uberis* genomlarının polimorfik ardışık tekrar dizilerini belirlemeye yönelik MLVA prosedürünü suşları ayırt edebilmek ve sütçü sürülerdeki *S. uberis* epidemiyoloji ve ekolojisini kavramak üzere kullanmışlardır. *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*'nın epidemiyolojisi tam olarak anlaşılamamıştır.

Patojenin kontagiyöz ve çevresel patojen olarak tanımlanmasının, müdahale çalışmaları ve 1990'lardaki moleküler çalışmalara dayandığı bildirilmiştir (Zadoks ve ark., 2011). Bir çalışmada, kuru dönem süresince *S. dysgalactiae*'nin kalıcılığını araştırmak üzere RAPD tiplendirmesi gerçekleştirilmiştir (Oliver ve ark., 1998).

2.4. Streptococcus Patogenez ve Patojenitesi

Streptokoklar piyojenik bakteriler olup genellikle suppuratif enfeksiyonlar ve abse oluşumundan sorumludurlar. Streptokokların neden olduğu enfeksiyonların patogenezinde rol oynayan çok çeşitli virülens faktörleri bulunmaktadır. Veteriner hekimlikte önemli olan ve mastitisten sorumlu streptokoklarda da çeşitli virülens faktörleri identifiye edilmiştir. Sığırlarda mastitise neden olan streptokok türlerinin sahip oldukları çok çeşitli virülens faktörleri, meme epitelyum hücrelerine tutunma, antifagositik, doku hasarı oluşturma, konak dokuda yayılma ve meme epitelyum hücreleri içinde canlı kalabilme gibi özellikler ile ilişkilidir (Markey ve ark., 2013).

2.4.1. Streptococcus agalactiae'nin Virülens Faktörleri

S. agalactiae Lancefield group B'nin (grup B streptokoklar, GBS) tek üyesi olup kronik ve bulaşıcı sığır mastitislerinin en önemli etkenlerindedir. Ayrıca develerde mastitis ve invaziv hastalıklar ile kedi, köpek, balık ve hamsterlerde de hastalıklara neden olabilmektedir. Varlıkları çoğunlukla sütteki yüksek somatik hücre sayısı ve azalmış süt verimi ile ilişkilidir. Belirlenemeyen taşıyıcı inekler patojenin sürüdeki diğer hayvanlara bulaşmasından sorumludur. *S. agalactiae* enfeksiyonları halk sağlığı açısından önemli sorunlara neden olur çünkü bu etkenler yeni doğanlarda nörolojik problemlere ve annelerde ise endometritis ve steriliteye neden olabilmektedir (Markey ve ark., 2013).

Streptokokal hücre yüzeyinin önemli bir komponenti serotip spesifitesi bulunan polisakkarit tabakadır. Proteinlerin bir tamamlayıcısı bu tabaka içine gömülü şekilde bulunur. Şimdiye kadar bu tip sadece birkaç protein belirlenmiştir. Bunlar arasında en önemlileri rastgele tekrarlanan, Ca protein, R protein, Rib protein, C β protein ve X protein gibi proteinlerdir. Belirlenen diğer dış yüzey proteinleri arasında glutamin sentetaz ve α enolaz bulunmaktadır (Jain ve ark., 2012).

Grup B *Streptococcus* (GBS) enfeksiyonlarının şiddeti ile bu patojenlerin sahip oldukları virülens faktörleri arasında ilişki vardır. Bunlar arasında *cps* gen kümesi tarafından kodlanan kapsül ve *scpB* geni tarafından kodlanan, nötrofil birikiminin önlenmesini sağlayan ve epitelyum hücrelerin bakteriyel invazyonunu uyarmak üzere

fibronektine bağlanan yüzey enzimi ScpB (bir C5a peptidaz) bulunmaktadır. C5a peptidaz genleri sadece grup B (*scpB* gene), grup A (*scpA* gen) ve grup G (*scpG* gen) streptokoklarda bulunmuştur. Kapsül, antifagositik özelliği ile önemli bir virülens faktörü olup multivalan kapsüller konjugat aşısı hazırlama girişimleri devam etmektedir (Lindahl ve ark., 2005, Jain ve ark. 2012). Lancefield tarafından belirlenmiş dört “klasik” kapsüller serotip vardır: tip Ia, Ib, II, ve III. Kapsül iki nedenden dolayı önem taşımaktadır. Birincisi, belli bir yüzey proteininin ekspresyonu genellikle kapsüller tip ile ilişkilidir. Böyle ilişkiler evrimsel soyları ifade edebilir ve fonksiyonel bir önemi olmayabilir ancak ilginç bir hipotez olarak, immün seleksiyonun, daha büyük uygunluklarından dolayı bazı yüzey yapılarının kombinasyonlarına sahip suşları tercih etmiş olduğu öne sürülmüştür. İkincisi ise, kapsülün yüzey proteinlerine karşı oluşan antikorların fonksiyonlarını engellemesi beklenebilir. Bunu ya antikorların erişimini engelleyerek ya da antikor efektör fonksiyonlarını engelleyerek yapabilir. Bununla birlikte, böyle bir durumun olmadığı görülmektedir, çünkü yüzey proteinlerine karşı oluşan antikorlar (en azından hayvan modelinde) enfeksiyona karşı koruyucudur ve bu durum protein tabanlı aşısı geliştirme girişimlerini cesaretlendirmektedir. Kapsül in vivo olarak, in vitro olduğundan daha ince olduğu için, sadece bazı üreme fazlarında eksprese edildiği için ve/veya oldukça gevşek ve esnek olduğu için opsonizasyonu engellememesi muhtemeldir (Lindahl ve ark., 2005).

bca geni, bakteriye konak hücreye girmesinde yardımcı olan bir yüzey proteini olan alfa-C proteinini, *lmb* geni, yine bir yüzey proteini olan ve hasarlı epitelin invazyonunda rol alan Lmb (laminin-bağlayıcı protein)’i, *cylE* geni, bir toksin olan ve doku hasarında rol oynayan ve bakterinin sistemik olarak yayılması sonucu menenjitise neden olmasını sağlayan β -hemolizini ve *rib* geni de çoğunlukla invaziv suşlarda bulunan yüzey Rib proteinini kodlamaktadır. *S. agalactiae* suşlarının çoğu Rib proteini gibi bir veya birden fazla yüzeye-bağlı proteinleri eksprese etmekte ve bu, suşlar arasında değişkenlik göstermektedir. Bu proteinler *S. agalactiae* için karakteristik olup koruyucu antikor cevabının oluşumunu uyarabilmektedir. CAMP faktör, bir seramid bağlayıcı protein olup stafilokokal sifingomyelinazın (beta toksin) etkinliğini artırmaktadır. CAMP faktörün hücre kültürleri ile tavşan ve farelerdeki letal özellikleri, meme dokusunda sitotoksik etkileri olabileceğini düşündürmüştür. *S. agalactiae* suşlarının sahip olduğu virülens faktörlerinin araştırıldığı çeşitli çalışmalarda, yukarıda sözü edilen virülens

faktörleri ve/veya bunları kodlayan genler suşlar arasında değişik oranlarda saptanmıştır. Örneğin alfa-C proteinini kodlayan gen, Jain ve ark. (2012)'nin yaptığı çalışmada *S. agalactiae* suşları arasında hiç bulunmazken, Hannoun ve ark.'nın (2009) yaptığı çalışmada %56,5 oranında belirlenmiştir. Bununla birlikte ScpB proteinini kodlayan gen, Jain ve ark. (2012) tarafından %22,2 oranında bulunurken Dimitriev ve ark. (2004) scpG geninin 3' ucundaki 51 bp'lik delesyonu grup B streptokokların teşhisi için bir marker olarak kullanmışlar, insan suşlarında %70,58 oranında *scpB* genini saptamışlardır. İnsan ve hayvanlardan izole edilen grup streptokoklarının antibiyotik dirençlilikleri ve virülens özellikleri üzerine yapılan bir araştırmada) ise insan suşlarında, *scpB* geni ile birlikte *Imp* ve *bca* genleri, tetrasikline dirençli suşlarda %96,5 (*Imp+scpB*) ve %66,9 (*Imp+bca+scpB*) oranlarında belirlenmiştir. Aynı çalışmada sığırlardan izole edilen suşlarda bu oranın %44,7 (*bca+scpB*) olduğu bulunmuştur. Virülens genlerinin insan ve sığır GBS'ları arasında farklı dağılım göstermesi, konakta bu etkenin neden olduğu enfeksiyonların patogeneze farklı virülens özelliklerinin iştirak edebildiğini düşündürmüştür (Duarte ve ark., 2005).

2.4.2. *S. dysgalactiae*'nin Virülens Faktörleri

S. dysgalactiae hem klinik hem de subklinik mastitis olgularından izole edilebilen Lancefield Grup C içinde yer alan bir etken olup aslında hem kontagiyöz hem de çevresel mastitis patojeni olarak sınıflandırılmıştır. Etken aynı zamanda sığırların tonsillerinde, ağız ve genital kanal mukozasında da bulunabilmektedir (Markey ve ark. 2013). *S. dysgalactiae* "yaz mastitisi" vakalarının etiolojisine de katılmaktadır. Avrupa, Kuzey Amerika ve Japonya'da görülen bu sendrom, *Trueperella pyogenes* başta olmak üzere *Peptoniphilus indolicus*, *S. pyogenes* ve çeşitli anaerobik etkenlerin iştirak ettiği miks bir enfeksiyon olup sineklerin de bulaşmada rol aldığı düşünülmektedir. *S. dysgalactiae*'nin memeye kolonize olduktan sonra ortamı diğer etkenler için uygun hale getirdiği düşünülmektedir. Mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte meme epitelyum hücreleri içinde canlı kalabilmektedir. Patojen, sahip olduğu çeşitli virülens faktörleri sayesinde konak dokuda yaşama, çoğalma ve yayılma şansına sahip olmaktadır. Bu faktörlerden bazıları direkt bağ doku hücreleri üzerine etki göstermekte diğerleri ise bir veya birden fazla konak mekanizmasını engelleyebilmektedir. Bu faktörler arasında, fibrinojen, fibronektin, kollajen ve IgG gibi konak proteinlerine bağlanmayı sağlayan çeşitli yüzey proteinleri, konak dokuda yayılmaya yardımcı olabilen hyaluronidaz ve

fibrinolizin sayılabilir. Çeşitli araştırmacıların yaptıkları çalışmalara göre, sığır mastitislerinden izole edilen *S. dysgalactiae* suşlarının potansiyel virülens faktörleri Tablo 2’de özetlenmiştir (Calvinho ve ark., 1998).

S. dysgalactiae çeşitli plazma ve ekstrasellüler konaktan derive edilen IgG, albumin, fibronektin, fibrinojen, kollajen, vitronektin, plazminojen ve α 2-makroglobulin gibi proteinlerle etkileşime girebilir. Bu etkileşimler bakteriyel yüzey proteinleri aracılığıyla gerçekleştirilir ki bunlar yüksek bağlanma spesifitesi ve affinitesinden dolayı aynı zamanda reseptörler olarak da adlandırılır. Bununla birlikte bağlanmayı takiben bir sinyal olayı gösterilmemiştir. İnek mastitis vakalarından izole edilen *S. dysgalactiae* suşları IgG’ye “non-immun” şekilde bağlanma yeteneğindedir. IgG bağlayıcı faktörün virülens faktörü olarak bir rolü saptanamamıştır. Bununla birlikte düşük IgG konsantrasyonu olan bölgelerde konak savunma mekanizmasını engellediğine dair destekleyici bulgular vardır. Bağlayıcı proteinlerin *S. dysgalactiae* patogenezindeki önemi aydınlatılmayı beklemektedir. *S. dysgalactiae*, plazmada ve vücut sıvılarında eriyebilir halde ve bağ doku ile bazal membranlarda çözünmez formda bulunan yüksek molekül ağırlıklı bir glikoprotein olan fibronektine bağlanır. Sığır mastitisinden izole edilen bir *S. dysgalactiae* suşunda fibronektin-bağlayıcı proteini kodlayan iki ayrı gen identifiye edilmiştir. Bu genler tarafından kodlanan proteinlerden sadece bir tanesi standart kültür koşullarında eksprese edilmiştir. Bununla birlikte, Southern-hibridizasyon ile her iki genin de *S. dysgalactiae* klinik izolatlarında bulunduğu gösterilmiştir. Bakterinin fibronektine bağlanması meme dokusuna bağlanmada (adezyon) önemli rol alabilir (Lindgren ve ark, 1992, Lindgren ve ark. 1993).

Tablo 2. Sığır mastitislerinden izole edilen *S. dysgalactiae* suşlarının potansiyel virülens faktörleri (Calvinho ve ark., 1998)

Potansiyel Faktör	Araştırcılar ve tarihler
Aderens faktörleri	Calvinho ve ark, 1998
Kollajen bağlayıcı faktör	Mamo ve ark., 1987
Kapsül	Matthews ve Oliver, 1993
Fibrinojen bağlayıcı faktör	Mamo ve ark, 1987; Traore ve ark., 1991
Fibronektin bağlayıcı faktör	Mamo ve ark., 1987; Lindgren ve ark., 1992
IgG-bağlayıcı faktör	Mueller ve Blobel, 1983
IgG/albumin bağlayıcı faktör	Laemmle ve Frede, 1989
IgG/ α 2-makroglobulin bağlayıcı faktör	Jonsson ve Mueller, 1994
IgG/ α 2-makroglobulin/albumin bağlayıcı faktör	Jonsson ve ark., 1994
Invazyon faktörü	Almeida ve Oliver, 1995
Lipoteikoik asit	Calvinho ve ark., 1997
M-like protein	Calvinho ve ark., 1997
alfa2-makroglobulin bağlayıcı faktör	Mueller ve Blobel, 1983
Plazminojen bağlayıcı faktör	Ullberg ve ark., 1989
Vitronektin bağlayıcı faktör	Filippsen ve ark., 1990
Hyaluronidaz	Sting ve ark., 1990
Fibrinolizin	Garvie ve ark., 1983; Vandamme ve ark., 1996

Sığırlardan izole edilen *S. dysgalactiae* suşlarının α 2-makroglobulin-tripsine bağlandığı gösterilmiştir (Mueller ve Blobel, 1983; Valentin-Weigand ve ark., 1990; Rantamaeki ve Mueller, 1995). α 2-makroglobulin bir plazma glikoproteinidir ve neredeyse tüm endoprotezları benzersiz bir tuzak mekanizması ile inhibe edebilir. Bu protein aynı zamanda mastitisli sütlerde vasküler geçirgenlikteki artışın bir sonucu olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte meme epitelyum hücrelerinin veya meme bezine göç eden makrofajlar tarafından lokal üretim göz ardı edilemez (Rantamaeki ve Mueller, 1992). α 2-makroglobulin-tripsinin *S. dysgalactiae*'ya bağlanması spesifiktir. *S. dysgalactiae*'nin α 2-makroglobulin-tripsin ile ön muamelesi, bu bakterinin sığır nötrofilleri tarafından

fagositozunda konsantrasyona bağlı bir inhibisyona öncülük etmiştir. Bu, bağlanmanın, streptokokal yüzey üzerinde polimorf nükleer nötrofillerin bağlanması ve fagositoz için gerekli olan yapıları bloke edebildiğini düşündürmektedir (Valentin-Weigand ve ark., 1990).

Sığır mastitislerinden izole edilen *S. dysgalactiae* suşlarının vitronektine bağlandığı bulunmuştur (Filippsen ve ark.,1990; Rantamaeki ve Mueller, 1995). Vitronektin multifonksiyonel bir plazma proteini olup komplement-bağımlı liziste, koagülasyon sisteminde ve hücresele adhezenste önemli rol oynamaktadır (Hayman ve ark., 1983; Preissner ve ark., 1985). Traore ve ark. (1991) *S. dysgalactiae*'nın fibrinojenle bağlanmasının C3b-fiksasyonunu ve sonraki polimorf nükleer hücrelerce fagositoz olayını inhibe ettiğini göstermişlerdir. Grup A streptokokların M proteinlerinin fibrinojene veya komplement faktör H'ye bağlanması, fagositozdan kaçış mekanizmaları olarak düşünülmüştür (Kehoe, 1994). Bu yüzden *S. dysgalactiae*'nin fibrinojen-bağlayıcı komponenti, grup A streptokokal M proteine benzeyen bir patojenik faktör sergileyebilir. Plazminojenin *S. dysgalactiae*'nin yüzey reseptörlerine bağlandığı bulunmuştur (Ullberg ve ark., 1989).

Calvinho ve ark. (1998) M-benzeri bir protein ve lipoteikoik asitin (LTA), sığır mastitislerinde izole edilmiş *S. dysgalactiae* suşlarında bulunduğunu göstermişlerdir. M protein güçlü bir anti-fagositik etkiye sahiptir. Serum faktör H'ye bağlanarak, C3-konvertazı yıkımlayarak ve C3b tarafından opsonizasyonu önleyerek etkisini gösterir. M-benzeri protein ve LTA konak-patojen etkileşiminin erken döneminde rol alarak mastitis oluşumuna öncülük edebilmektedirler. Grup A streptokoklarındaki LTA'in, streptokokların memeli hücrelerine bağlanmasında ve memeli hücreleri üzerinde sitotoksik etkiler göstermesinde rol oynamaktadır (Simpson ve ark., 1982).

Sığır mastitis vakalarından yeni izole edilmiş *S. dysgalactiae* suşlarında kapsül varlığı ortaya konulmuştur. Bununla birlikte kapsül ekspresyonu saklama sürecinde kaybolmuştur (Matthews ve Oliver, 1993). Kapsül ekspresyonunu uyarma girişimleri başarısız olmuştur (Calvinho ve ark., 1996). *S. uberis*'teki kapsül ekspresyonu, sığır meme bezi makrofajları tarafından fagositoza karşı dirençle ilişkili bulunmuştur (Almeida ve Oliver, 1993). *S. dysgalactiae* tarafından kapsül ekspresyonu koşullarının belirlenmesi ve kapsülün önemi ile ilgili daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Patojenik streptokoklar tarafından salınan ürünler mastitisin oluşmasında ve kalıcılığında rol oynayabilmektedir. Sığır orijinli *S. dysgalactiae*'nin sığır fibrini için (insan fibrini için değil) bir fibrinolizin ürettiği bulunmuştur (Garvie ve ark., 1983; Vandamme ve ark., 1996). Fibrinolizin aktivitesi, streptokinaz-benzeri aktiviteden ziyade proteolitik bir enzim aktivitesidir (Vandamme ve ark.,1996). Ekstrasellüler hyaluronidaz, hyaluronik asiti parçalayan bir enzimdir ve sığır mastitislerinden izole edilen *S. dysgalactiae* suşlarında bulunmuştur (Sting ve ark, 1990). Bununla birlikte bu faktörün önemi tam olarak aydınlatılamamıştır. Hyaluronik asit önemli bir intrasellüler komponent olduğu için, hyaluronidazın streptokok doku invaziv özelliklerine iştirak ettiği hipotezi ileri sürülmüştür (Sting ve ark., 1990). Tam tersi, hyaluronidaz, hyaluronik asit kapsülleri ortadan kaldırabilir ve muhtemelen kapsüllü bakterilerin fagositoza daha duyarlı hale gelmesine neden olur (Leigh ve ark., 1990; Timoney, 1993). Bununla birlikte, Almeida ve Oliver (1993), salınan hyaluronik asitin meme makrofaj aktivitesini ve fagositozu baskıladığını bildirmişlerdir.

Streptokinazlar, hayvanlardan izole edilen fiziksel ve antijenik benzerlik gösteren grup C patojenik streptokoklarda bildirilmiştir (McCoy ve ark., 1991). Streptokinaz, plazminojen ile güçlü bir kompleks oluşturarak fibrini ve aynı zamanda bağdoku proteinlerini hidrolize eden plazminin aktivasyonuna neden olur. Plazminin streptokokların konak dokularda yayılma yeteneğini artırdığı ve enfeksiyonun erken dönemlerinde bakteriyel üreme için uygun peptid ve amino asitleri yapmak suretiyle kokların üremesini uyardığı hipotezi ileri sürülmüştür (Leigh, 1993; Leigh, 1994).

Mastitis patojenleri sütün yıkama etkisine maruz kalırlar ki bu, laktasyon sürecinde invazyona karşı önemli bir fiziksel bariyer oluşturmaktadır. Bununla birlikte, bakteriyel patojenlerin, mukozal yüzeylere tutunmak ve belli hızda replike olarak popülasyonlarını büyütme suretiyle sağımın yıkama etkisine direnç gösterdiklerini söylemek mümkündür. Buna göre, mastitis patojenlerinin hücrelere spesifik adherensi (bağlanması), mastitis oluşumu öncesinde patogenezin önemli bir safhasıdır (Frost ve ark., 1977; Wanasinghe, 1981). Mastitis bakteriyel patojenlerinin meme dokularına adherensi ile ilgili in vivo çalışmalar eskiye dayanmakta ancak sayıları azdır (Pattison, 1951; Gudding ve ark., 1984; Thomas ve ark., 1992). İlk çalışmalarda, keçilerde duktuler ve sekretorik epitele *S. agalactiae*'nin adezyonu bildirilmiştir (Pattison,1951). İnekte deneysel olarak mastitisin uyarılmasını takiben, *S. uberis* hasarlı duktuler veya sekretorik

epitelin luminal yüzeyine tutunmuş ancak büyük kanallar veya laktifer (süt veren) kanallara tutunmamıştır (Thomas ve ark.,1992). *S. dysgalactiae*'nin sığır meme epitelyum hücrelerine bağlanması, farklı in vitro modellerde gösterilmiştir. *S. dysgalactiae*, henüz kesilmiş ineklerden meme başı sinüsü, laktifer sinüs ve büyük kanallardan kazıma suretiyle elde edilen süspansiyon içindeki hücrelere bağlanmıştır (Frost ve ark., 1977; Wanasinghe, 1981). Meme eksplantları, diğer destekleyici dokularla ilişkili yerlerdeki hedef hücreler için avantaj sunmakla birlikte subepitel matriks bileşenlerinin bakteriyel adherense oldukça duyarlı olması, konak-patojen etkileşimini yorumlamada zorluk yaratabilmektedir (Paape ve ark., 1995). Sağlam meme epitelyum hücre monolayer kullanımı önceki metotlarda karşılaşılan sınırlamaları en aza indirmiştir.

S. dysgalactiae'nin hem primer sığır epitelyum hücrelerinin hem de transforme hücre hatlarının sağlam monolayerlerine adherensi Calvino (1997) tarafından gösterilmiştir. *S. dysgalactiae* suşlarından birinin adherensi transforme hücrelere, primer sığır meme epitelyum hücrelerinden daha yüksek olmuştur. Bu, kuyucuk başına daha fazla sayıda hücreden kaynaklanmamaktadır çünkü benzer bakteriyel epitel hücre oranları dikkate alınmıştır. Grup A ve B streptokokların bağlanma affinitelerinde (taze elde edilmiş ve transforme hücre hatları arasında) farklılıklar gözlenmiş ve her bir hücre tipindeki reseptörlerin farklı durumunu yansıttığı düşünülmüştür (Goldschmidt ve Panos, 1984; Courtney ve ark.,1992). Çevresel streptokokların konak hücrelere adhezyon mekanizmaları tam olarak anlaşılammıştır. *S. dysgalactiae* ve *S. uberis*, farklı derecelerde de olsa, fibronektin, fibrinojen, kollajen ve laminine bağlanmaktadır (Mamo ve ark., 1987; Valentin-Weigand ve ark., 1988). *S. dysgalactiae*'nin fibronektinin 210-kDa'luk C-terminal fragmenti ile ilişki kurduğu bulunmuştur. Ayrıca *S. dysgalactiae*'nin spesifik olarak sığır S proteinine (vitronektin), bağlandığı bulunmuş, S proteininin *S. dysgalactiae*'nin konak hücrelere adherensine aracılık edebileceği öne sürülmüştür (Filippsen ve ark., 1990). Mig (M-benzeri) protein, sığır serumu varlığında sığır nötrofilleri tarafından fagositoza direnç durumunda rol oynayan bir protein olup *S. dysgalactiae*'nin potansiyel virülens faktörleri arasında yer almaktadır. Bu protein çok komponentli bir sistemin duyuşal bir parçası olarak rol oynayabilir. Mig proteininin IgA ve/veya IgG'ye bağlanması, bu proteinde konformasyonel bir değişikliği tetikleyebilir ve bu da histidin kinaz aktivitesine sahip ikincil proteinlerin aktivasyonu ile sonuçlanır.

Bu durum virülens genlerinin ekspresyonlarının modülasyonu ile ilişkilidir. Mig geninin α_2 -M reseptör kısmı *S. dysgalactiae* için oldukça spesifiktir (Krisnaveni ve ark., 2014).

2.4.3. *S. uberis*'in Virülens Faktörleri

S. uberis, sığırlarda tonsil, genital kanal ve gastrointestinal kanalın kommensal bir organizması olup tüylerde ve çevrede bulunabilir. Dışkı ile kontamine altlık önemli bir enfeksiyon kaynağıdır. Ayrıca yoğun şekilde kullanılan gübre ile de patojen taşınabilir. *S. uberis* de her ne kadar çevresel mastitis etkeni olarak sınıflandırılmış olsa da, sığır meme epitelyum hücrelerine adereense iştirak eden spesifik bir moleküle sahip olduğu bildirilmiştir (Almeida ve ark., 2006). *S. uberis*'e ait çeşitli potansiyel virülens faktörleri arasında, plazminojen aktivatör faktör (PAF), hyaluronidaz (HYA), hyaluronik asit kapsül (CAP) ve CAMP faktör sayılabilir. Etkenin sahip olduğu plazminojen aktivatör, plazminin aktinasyonu ve kazeinden esansiyel aminoasitlerin oluşumuna katılmakla birlikte konak matriks proteinlerinin hidrolizinde de rol alabilir. Kapsülünün antifagositik özelliği ile ve hyaluronidazın da doku hasarı oluşturması suretiyle virülens özelliklerini gösterebilir (Lasagno ve ark, 2011; Markey ve ark, 2013). Yapılan çalışmalarda etkenin bu virülens fakörlerini eksprese etme açısından değişkenlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca *S. uberis* suşlarının Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) ile gerçekleştirilen genotipik analizi sonrasında da suşların virülens faktörleri ile PFGE modeli arasında bir ilişki bulunamamış, aynı PFGE tipi içinde değişkenlik gösteren virülens fenotipleri belirlenmiştir (Lasagno ve ark., 2011).

Bakteriyel biyofilm, eksopolisakkarit (EPS) ile çevrili mikrokolonilerden meydana gelen yüzeye ilişkili bakteri topluluğu olarak tanımlamıştır (Costerton ve ark., 1978; Costerton ve ark., 1987; Hoyle ve Costerton, 1991; Costerton ve ark., 1999). Araştırmacılar infekte olmuş dokuda büyüyen bakterilerin in-vitro hücrelerde bulunmayan hücre yüzey komponenti ürettiğini göstermişler ve bu yüzey komponentini slime faktör, biyofilm, eksopolisakkarit (EPS) ya da glikokaliks olarak adlandırmışlardır. Biyofilm bakterileri doku yüzeyi ile yaptıkları bu koruyucu birlikteliklerin yanında patojen olarak da vücutta bulunabilirler (Costerton ve ark., 1978; Costerton ve ark., 1999). Bu bakteriler biyofilm tabakaları sayesinde antikordardan, fagositik hücrelerden ve antibiyotiklerden korunurlar (Hoyle ve Costerton, 1991). Fagositik hücreler enzimlerini ortama salarlar ve bu enzimler biyofilm etrafındaki dokulara zarar verirler. Biyofilm oluşumunun bakterilerde iki aşamada meydana geldikleri belirlenmiştir. Bakteriler

öncelikle kapsüller polisakkaritleri ile yüzeye adhere olurlar ve çoğalarak slime faktör üretirler. Bu slime faktör oluşumu intraselüler polisakkarit adhesin ile ilişkilidir. Kapsüller polisakkarit ve intraselüler polisakkarit benzer yapıdadırlar ve ortak olarak beta-1-6 bağlı poliglukozamin çatisını içerirler. Farklılıkları ise amino gruplarındadır. Slime faktör üretiminin saptanması amacıyla Standart Tüp, Christensen Metodu, Kongo Red Agar ve Mikrodilasyon yöntemleri uygulanmaktadır. Bu yöntemlerden Kongo Red Agar ve Standart Tüp yöntemleri birçok çalışmada slime faktör üretiminin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır.

Mastitis suşları tarafından biyofilm üretimi ile ilgili farklı çalışmalar bildirilmiştir (Suntharalingam ve ark., 2005; Varhimo, 2011; Rossini ve Margarit, 2015; Moliva ve ark., 2017). Biyofilmler, bir ekzopolisakkarit matrikste gömülü yüzey-yapışık mikroorganizmaların yoğun agregatlarıdır. Biyofilmlerde serbest yaşayan planktonik hücrelerden ziyade, interaktif bir topluluk olarak yaşayan bakterilerin incelenmesi son zamanlarda büyük ilgi görmüştür (Suntharalingam P ve Cvitkovitch DG, 2005). Doğal ortamdaki bakteriler genellikle yüzeyler üzerinde gelişirler ve memelileri kolonize eden birçok streptokok türünün doğal olarak biyofilm olarak gelişen bakteriler topluluğu içinde olduğu düşünülür. Farklı streptokoklar, biyofilm toplulukları oluşturmak üzere farklı eğilimler gösterebilir, ancak her durumda, biyofilm oluşumu, hücrelerin bir yüzeye yapışmasına bağlıdır (Nobs ve ark., 2009).

2.5. Süt İneği Yetiştiriciliğinde Antibiyotik Kullanımı ve Antibiyotik Direnç Sorunu

Süt ineği yetiştiriciliğinde antibiyotik kullanımı başlıca 3 amaca hizmet etmektedir; terapötik (mevcut bir hastalığı tedavi etmek için), profilaktik (yüksek hastalık riskinin bulunduğu durumlarda koruyucu amaçla) ve subterapötik (üretimi artırmak amacıyla). Kompleks mikrobiyel toplulukları içerisindeki tüm hedef bakterileri elimine etmede tamamıyla etkin bir antibiyotik yoktur. Antibiyotik tedavisinin sonuçta antibiyotiklere duyarlı suşların sayısını azaltıp antibiyotik-dirençli suşların gelişimini uyarması kaçınılmazdır (McAllister ve ark., 2001). Antibiyotik kullanımının sıklığı, bakterilerin hem memede hem de çevredeki bakterilerin antibiyotik dirençliliğinde farklılıklar yaratabilir (Suriyasathaporn ve ark, 2012). Mastitis patojenlerinin antibiyotik duyarlılıkları ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmakta olup farklı antibiyotiklere değişen oranlarda direnç saptanmıştır. Bununla birlikte çoklu antibiyotik direncinin çok yaygın

olmadığını bildiren raporlar bulunmaktadır. Raporların bir kısmında özellikle yaygın olarak görülen *S. uberis* ve *S. dysgalactiae*'nin, uzun bir antimikrobiyel tedavi geçmişi olmasına rağmen yaygın bir antimikrobiyel direnç göstermediği bildirilmiştir (Pol ve ark., 2007, Lindeman ve ark., 2013, Petrovski ve ark., 2015). Bununla birlikte, *S. uberis*'in penisline karşı azalmış duyarlılığını bildiren raporlar bulunmaktadır (Haenni ve ark., 2010, McDougall ve ark., 2014, Thomas ve ark., 2015, Petrovski ve ark., 2015). Tedavinin etkinliği açısından mastitise neden olan etkenin belirlenmesi ile birlikte antibiyotik direnç profilinin de belirlenmesi önemlidir. Bununla birlikte, etken identifikasyonu ve antibiyogram sonuçlarının beklenemediği durumlarda, muhtemel etkene karşı popülasyonun geçmişindeki duyarlılık profilinin değerlendirilmesi söz konusu olabilir. Bölgelere veya ülkelere göre, etiyoloji, insidens, kullanılan antibiyotikler ve yönetim bakımından farklılıklar olabileceği için lokal bilgiler oldukça önem taşımaktadır (Petrovski ve ark., 2015).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Bakteri Suşları

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda bulunan, Samsun ve çevresindeki sığır mastitis olgularında izole edilmiş *Streptococcus* spp. şüpheli 22 adet izolat incelendi. Çalışmada referans suş olarak Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda yer alan *S. aureus* ATCC 25923 ve *S. aureus* Cowan suşu kullanıldı.

3.2. Besi Yerleri

Çalışmada incelenecek suşların kültürü için Kanlı Agar (%5 koyun kanlı) ve Triptik Soy Buyyon, antibiyotik duyarlılık testi için Mueller Hinton Agar kullanıldı. Eskülin hidrolizini belirlemek için Edward's Agar kullanıldı.

3.3. Bakteriyel Kültür ve İdentifikasyon

Streptococcus spp. şüpheli suşların fenotipik identifikasyonu konvansiyonel kültür teknikleri ve biyokimyasal testlere dayanılarak gerçekleştirildi (Markey ve ark., 2013). Daha önce izole edilmiş ve biyokimyasal testlerle *Streptococcus* spp. olarak identifiye edilerek -20°C'de muhafaza edilen 22 adet suş hem Triptik Soy Buyyona hem de Kanlı Agar'a inokule edilerek 24-48 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon süresi sonunda tek koloni şeklinde saf olarak üreyen kültürlerden preparatlar hazırlanarak Gram boyama ile boyandı. Gram pozitif kok olarak değerlendirilen kültürler, kanlı agardaki üreme şekilleri (hemoliz özellikleri) yönünden değerlendirildi ve biyokimyasal testlerle identifikasyona tabi tutuldu. Tür identifikasyonunda kullanılan testler Tablo 1'de gösterilmiştir.

3.4. Fenotipik İdentifikasyonda Kullanılan Testler

3.4.1. Katalaz Testi

Test edilecek kolonilerden bir öze dolusu alıp temiz bir lam üzerinde %3 Hidrojen Peroksit ile bir araya getirildi. Birkaç sn içinde oluşacak oksijen gazı çıkışı (köpürme) olup olmadığı gözlendi. Gaz çıkışının olmaması negatif olarak değerlendirilirken katalaz pozitif kontrol olarak kullanılan *S. aureus* (ATCC 25923) kolonilerinin gaz çıkışına neden olduğu gözlendi.

3.4.2. Eskülin Hidrolizi

Eskülin hidrolizi suşların Edwards Besi Yeri (Oxoid)'ne inokule edilmesi suretiyle değerlendirildi. İnkubasyon sonunda siyah koloni oluşumu eskülin pozitif, mavi koloniler eskülin negatif olarak değerlendirildi (Arda, 1997).

3.4.3. Sodyum Hippurat Testi

Streptokok suşlarının hippurat hidrolaz enzimi yardımıyla sodyum hippuratu (hippurik asit) hidrolize edilerek benzoik asit ve glisine ayrıştırma yeteneğini belirlemek için, %1 sodyum hippurat çözeltisi içinde (0,4 ml) test edilecek suşun yoğun süspansiyonu yapıldı. Süspansiyonlar $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 2 saat (su banyosunda) inkube edildi. İnkubasyon süresi sonunda tüplere damlalıklarla 5 damla ninhidrin ayırıcı ilave edildi. Su banyosunda 10 (maksimum 30 dakika) dakika süreli inkubasyonun ardından oluşan koyu mavi renk pozitif olarak değerlendirildi. Renk değişiminin olmayışı veya hafif mor renk negatif olarak değerlendirildi (Arda, 1997).

3.4.5. CAMP testi

Koyun kanlı agara beta hemolizin üreten bir *S. aureus* (Cowan suşu) suşu ile test edilecek suşların çapraz inokule edilmesi suretiyle gerçekleştirildi. İnkubasyon süresi sonunda *S. aureus* ekim hattı (hemoliz zonu) ile test bakterilerinin ekim hattı (hemoliz zonu) arasında ok başı veya üçgen şeklinde ortaya çıkan tam hemoliz zonu (sinerjistik hemoliz) pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi (Arda, 1997).

3.4.6. Karbonhidrat fermentasyon testleri

Mastitise neden olan streptokokların identifikasyonunda en sık kullanılan karbonhidrat fermentasyon testlerinden mannitol, salisin ve trehaloz fermentasyon testleri içlerinde söz konusu şekerlerin %1 oranında bulunduğu indikatörlü (Bromtimol mavisi) Triptik Soy Buyyon (TSB)'da gerçekleştirildi. Şeker içeren indikatörlü besi yeri içine test edilecek suşun taze sıvı kültüründen 0,1 ml inokule edilerek 37°C 'de 1-14 gün inkube edildi. İnkubasyon süresi sonunda tüplerin renginin maviden sarıya dönmesi karbonhidrat fermentasyonunun pozitif olduğunu gösterdi. Renk değişiminin olmaması negatif olarak değerlendirildi (Arda, 1997).

3.5. Bazı virülens özelliklerinin fenotipik olarak belirlenmesi

3.5.1. Biyofilm Üretimi

Test edilecek bakteri suşları Kongo Red Agar (CRA)'a tek koloni düşecek şekilde ekildi ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda siyah koloni oluşturan bakteriler biyofilm pozitif, renksiz ya da pembe renkli koloniler ise negatif olarak değerlendirildi (Çiftci ve ark., 2009).

3.5.2. Jelatinaz Testi

Jelatinaz özelliği, Arda (1997) tarafından bildirilen yöntemle incelendi. İncelenecek olan izolatların koyun kanlı Triptik Soy Agar (TSA)'da 37°C'de 24-48 saatlik kültürü hazırlandı. Üreyen suşlardan bir koloni alınarak TSB'ye ekimleri yapıldı. Tüm suşların buyyondaki 24 saatlik kültüründen, %3 jelatin içeren TSB buyyona ekimler yapıldı ve 37°C'de bir hafta süreyle inkübe edildi. İnkubasyon periyodu süresince, besiyerleri hergün 37°C 'lik etüvden çıkarılarak, 4°C'de 1 saat bekletildi. Bir saat sonra besiyerlerindeki değişim kontrol edildi. Normalde jel halinde olan besiyerinin 4°C'de bekletildikten sonra yumuşayarak akışkan hale gelmesi pozitif, jel halinde kalması ise negatif olarak değerlendirildi.

3.6. Genotipik İdentifikasyon ve Virülens Genlerinin Belirlenmesi

3.6.1. Oligonükleotid Primerler

Streptococcus izolatlarının cins ve tür identifikasyonları ile bazı virülens genlerini belirlemeye yönelik oligonükleotid primerler ve beklenen bant büyüklükleri ile beraber suşların genotiplendirilmesinde kullanılan primer Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3. *Streptococcus* cins ve tür düzeyinde genotipik identifikasyon ile virülens genlerini belirlemeye yönelik primerler

Hedef		Oligonükleotid primerler (5'-3')	PCR ürünü (bp)	Kaynak
<i>str</i>	F	TGTTTAGTTTTGAGAGGTCTTG	154	Yadav ve ark. (2014)
	R	CGTGGAATTTGATATAGATATTC		
<i>sag40</i>	F	CGT CGT GGT ATT GAA ACA GCT GTT	405	Dmitriev ve ark. (2006)
	R	GGA TAT ACG GAT TCT CAA GTT CAG AG		
<i>dys</i>	F	CGT GGG ATT GAA ACA GCA ACAG	281	Dmitriev ve ark. (2006)
	R	ACC ACG TGA TTC TTC GAT AGT AAT G		
<i>ube</i>	F	TCGCGGTATTGAAAAAGCAACAT	400	Dmitriev ve ark. (2006)
	R	TGCAATAATGAGAAGGGGACGAC		
<i>fnbB</i>	F	TGATGCTGCAAAAGAATTGC	629	Shome ve ark. (2012)
	R	TTACAGCCCCCTTTTTGAGGA		
<i>mig</i>	F	CGTTTTTAGTTTCGGGAGCA	188	Khrisnaveni ve ark. (2014)
	R	TGCCTTCAATTGAGTCTGCTG		
<i>skc</i>	F	TCCGGATTTTGGGTCCTTAGCCA	475	Khrisnaveni ve ark. (2014)
	R	AGTCGACTTTGCGCCTGATGCAC		
<i>cfb</i>	F	ATGGGATTTGGGATAACTAAGCTAG	193	Dmitriev ve ark. (2002)
	R	AGCGTGTATTCCAGATTTCTTAT		
<i>sip</i>	F	ACTATTGACATCGACAATGGCAGC	266	Khrisnaveni ve ark. (2014)
	R	GTTACTGTCAGTGTGTCTCAGGA		
<i>pau</i>	F	TGCTACTCAACCATCAAAGGTTGC	439	Khrisnaveni ve ark. (2014)
	R	TAGCAGTCTCAGTAGGATGAGTGA		
<i>Llb</i>	F	AACCCCAAACAGCCTACGCAAG	375	Rato ve ark. (2011)
	R	TAAAACGGGATCCGTCAGGTAT		
<i>hylB</i>	F	CATACCTTAACAAAGATATATAACCCAAA	950	Sukhnanand ve ark. (2005)
	R	AGATTTTTTAGAGAATGAGAAGTTTTTT		
<i>scpB</i>	F	AGTTGCTTCTTACAGCCCAGA	567	Shome ve ark. (2012)
	R	GGCGCAGACATACTAGTTCCA		
<i>spbl</i>	F	ACTCAAAAAGGCGCAACCT	490	Brochet ve ark. (2006)
	R	GACGAGCAACAAGCACGATA		
M13		5'- GAGGGTGGCGGTTCT-3'	-	Huey ve Hall (1989).

3.6.2. *Streptococcus* Cins Spesifik PCR

Streptokok şüpheli izolatların cins düzeyinde identifikasyonu için için Yadav ve ark. (2014)'nın bildirdiği yöntemle göre cins spesifik primerler kullanılarak PCR yapıldı. Buna göre 154 bp'lik bant görülmesi *Streptococcus* spp. pozitif olarak değerlendirildi. DNA ekstraksiyonu için, prensibi spin kolon sistemine dayanan Invitrogen doku kiti kullanıldı ve üretici firmanın bildirdiği yöntemle göre yapıldı. Reaksiyon karışımı (25 µl), 200µm dNTP karışımı, 1X PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 2,5 U *Taq* DNA polimeraz, 10 pmol of her bir primer ve 300 ng of DNA ekstraktı içermekteydi. PCR amplifikasyonu koşulları; 95°C'de 5 dk. ilk denatürasyon, 36 siklus şeklinde 95°C'de 1 dk. denatürasyon, 58°C'de 45 sn annealing ve 72°C'de 1 dk. ekstensiyondan oluştu. Amplifiye edilmiş PCR ürünleri, Tris borate EDTA (TBE) buffer içinde 0.2µg/ml ethidium bromid içeren %2 agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu. Marker olarak 1000bp DNA ladder kullanıldı. Ürünler ultraviyole ışığı altında görüntülendi.

3.6.3. *Streptococcus* Tür Spesifik Multipleks PCR

Streptococcus cinsine ait olduğu belirlenen suşlar, Dimitriev ve ark. (2006)'nın bildirdiği yöntemle göre PCR ile identifiye edildi. PCR son hacim 25 µl olan karışım içinde gerçekleştirildi. 94°C'de 2 dakika ilk denatürasyonun ardından, toplam 30 siklus süresince, 94°C'de 30 sn denatürasyon, 52°C'de 1 dakika annealing ve 72°C'de 30 sn ekstensiyon süreci uygulandı. Son siklustan sonra, 72°C'de 10 dk. ilave bir inkubasyon uygulandı. Multipleks-PCR analizleri için primerler (Tablo 3) reaksiyon karışımına ilave edildi. Amplifiye edilmiş PCR ürünleri, Tris borate EDTA (TBE) buffer içinde 0.2µg/ml ethidium bromid içeren %2 agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu. Marker olarak 1000bp DNA ladder kullanıldı. Ürünler ultraviyole ışığı altında görüntülendi. *S. dysgalactiae* için 281 bp, *S. uberis* için 400 bp ve *S. agalactiae* için 405 bp'lik bant görülmesi pozitif olarak kabul edildi.

3.6.4. Virülens Genlerinin PCR ile Belirlenmesi

Streptokok izolatlarında *hylB* (Hyaluronate lyase), *fnbB* (Fibrinojen bağlayıcı protein), *scpB* (C5a peptidaz) ve *Spb1* (Yüzey proteini), *sip* (Yüzey İmmunojenik protein), *pau* (Plazminojen aktivatör) ve *lmb* (Laminin bağlayıcı protein), *mig* (Mig protein), *skc* (streptokinaz) virülens genlerinin varlığı PCR ile araştırıldı (Dmitriev ve ark. 2002; Sukhnanand ve ark., 2005; Brochet ve ark., 2006; Rato ve ark., 2011; Shome ve ark., 2012; Khrisnaveni ve ark., 2014).

Her bir virülens geni için 25 mikrolitrelik hacim içerisinde 1X PCR buffer, 0,5 µM (her bir) primer, 1X PCR buffer, 2,5 mM MgCl, 200µM dNTP ve 50ng DNA ile PCR karışımı hazırlandı. Her bir gen bölgesi için PCR amplifikasyonu aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi:

hylB: 95°C 5dk.; 30 siklus 95 °C 30 sn., 55 °C 30sn., 72 °C 30 sn.; 72 °C 10 dk.
fnbB: 94 °C 5 dk.; 30 siklus 94 °C 30sn., 60 °C 30 sn., 72 °C 45sn.; 72 °C 5dk.
scpB: 94 °C 5 dk.; 30 siklus 94 °C 30sn., 58 °C 30 sn., 72 °C 45sn.; 72 °C 5dk.
spbl: 94 °C 5 dk.; 30 siklus 94 °C 60 sn., 55 °C 45 sn., 72 °C 90 sn.; 72 °C 7 dk.
sip: 94 °C 5 dk.; 30 siklus 94 °C 30 sn., 52 °C 30 sn., 72 °C 90 sn.; 72 °C 10 dk.
pau: 94 °C 5 dk.; 30 siklus 94 °C 60 sn., 54 °C 30 sn., 72 °C 90 sn.; 72 °C 10 dk.
lmb: 94 °C 5 dk.; 30 siklus 94 °C 60 sn., 55 °C 45 sn., 72 °C 90 sn.; 72 °C 7 dk.
cfb: 95 °C 2 dk.; 30 siklus 94 °C 30 sn., 52 °C 60 sn., 72 °C 60 sn.; 72 °C 10 dk.
skc: 95 °C 2 dk.; 30 siklus 94 °C 30 sn., 58 °C 30 sn., 72 °C 30 sn.; 72 °C 10 dk.
mig: 95 °C 2 dk.; 30 siklus 94 °C 30 sn., 58 °C 30 sn., 72 °C 30 sn.; 72 °C 10 dk.

Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2µg/ml) içeren %1,5'luk agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi.

Streptococcus izolatlarının virülens faktörleri için kullanılacak olan oligonükleotid primerler ve beklenen bant büyüklükleri Tablo 3'de gösterilmiştir.

3.7. Antibiyotik Duyarlılık Profili

İncelenen *Streptococcus* suşlarının 7 farklı gruptan 12 antibiyotiğe karşı duyarlılık durumları Kirby-Bauer Agar Disk Difüzyon yöntemi ile belirlendi (Bauer ve ark., 1966). İzolatlar CLSI (2011) kılavuzuna göre duyarlı, orta derecede duyarlı ve dirençli olarak değerlendirmeye tabi tutuldu. Kullanılan antibiyotik diskleri: Penisilin (10IU), Amoksisilin/Klavulanik asit (20/10µg), Ampisilin (10 µg), İmipenem (10 µg),

Sefalotin (30 µg), Tetrasiklin (30 µg), Kloramfenikol (30 µg), Vankomisin (30 µg), Spiramisin (100 µg), Eritromisin (15 µg), Enrofloksasin (5 µg), Linkomisin (15 µg). Fenotiplendirme için UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) metodu ile dendogram ve görüntü analiz programı kullanılarak dendogram çizildi. Şuşlar arasındaki genetik ilişki % 70-80 benzerlik katsayısı göz önüne alınarak belirlendi.

3.8. İzolatların RAPD-PCR ile Genotiplendirilmesi

Her bir bakteri türü için ayrı ayrı olmak üzere tüm izolatların RAPD-PCR paternlerinin belirlenmesi amacıyla ERIC-2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3') primeri kullanılacaktır. Amplifikasyon aşaması Versalovic ve ark. (2002) tarafından bildirilen metodun modifiye edilmesiyle gerçekleştirildi. Bu aşamada her bir primer için ayrı ayrı olmak üzere DEPC-treated water, 1XPCR Buffer, 2,5 mM MgCl₂, 200 µM her bir dNTP, 2.5 U Taq DNA polimeraz, 25 pmol primer ve 5 µl template DNA içeren 25 µl'lik bir RAPD master karışımı hazırlandı. Bu karışım 94 °C'de 5 dk ön denatürasyonu takiben 94 °C'de 1 dk denatürasyon, 40 °C'de 1 dk annealing, 72 °C'de 3 dk ekstension olmak üzere 40 siklus ve 72 °C'de 7 dk final ekstensiyon koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2µg/ml) içeren %1,5'lük agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Oluşan RAPD paternlerinin dendogramları UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) metodu ile dendogram ve görüntü analiz programı kullanılarak çizildi. Şuşlar arasındaki genetik ilişki % 70-80 benzerlik katsayısı göz önüne alınarak belirlendi.

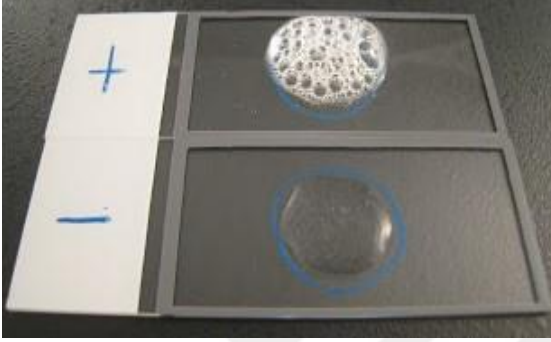
3.9. RAPD-PCR Analizlerinin Tekrarlanabilirlik, Ayırt Edici İndeks (DI) ve Güven Aralıkları (CI)

Testler arası RAPD-PCR tiplendirme tekrarlanabilirliğini değerlendirmek için izolatlar arka arkaya 5 gün test edildi. DI'ler, Hunter ve Gaston (1988) tarafından bildirilen formüle göre hesaplandı. CI'ler ise Grundmann ve ark. (2001)'nin bildirdikleri formül kullanılarak hesaplandı.

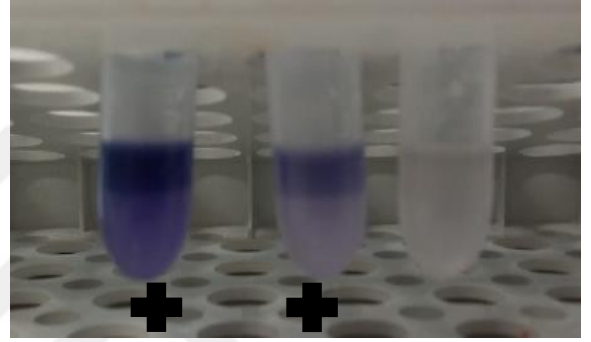
4. BULGULAR

4.1. Suşların Fenotipik İdentifikasyonu

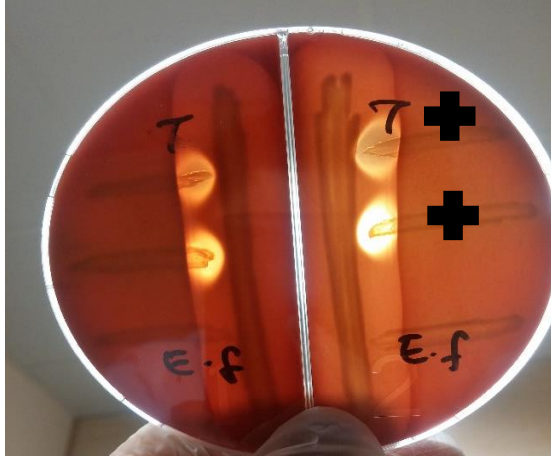
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda bulunan 22 adet mastitis kökenli streptokok izolatu incelendi. İzolatların identifikasyonları fenotipik ve genotipik olarak doğrulandı. Suşlardan 16'sı *S. dysgalactiae*, 1'i *S. agalactiae* ve 5'i *S. uberis* olarak identifiye edildi. Suşların fenotipik identifikasyonu ve karakterizasyonlarında kullanılan testlerin sonuçları Tablo 4'te gösterilmiştir.



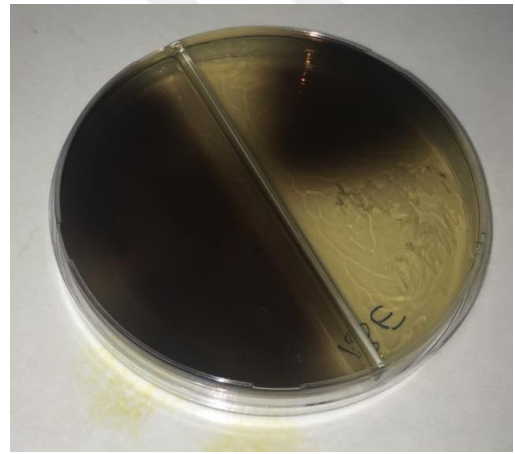
Şekil 1. Katalaz Testi



Şekil 2. Sodyum hippurat Testi



Şekil 3. CAMP Testi



Şekil 4. Eskülin Hidrolizi



Şekil 5. Biyofilm Faktör Oluşumu

4.2. Suşların Bazı Virülens Özelliklerinin Fenotipik Olarak Belirlenmesi

4.2.1. Biyofilm oluşumu

S. agalactiae suşu biyofilm faktör oluşumu yönünden pozitif bulunurken *S. dysgalactiae* suşlarında biyofilm üretimi %62,5, *S. uberis* suşlarında %80 oranında bulundu (Tablo 4).

4.2.2. Jelatinaz Aktivitesi

S. agalactiae suşu jelatinaz negatif bulunurken, *S. dysgalactiae* suşlarında jelatinaz pozitiflik oranları sırasıyla %75, *S. uberis* suşlarında sırasıyla %60 oranında bulundu (Tablo 4).

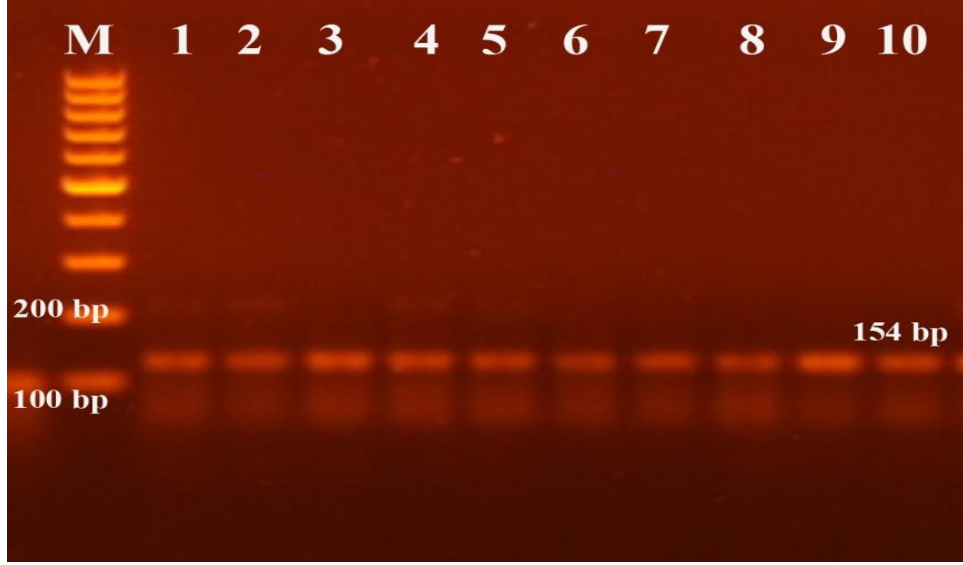
Tablo 4. Suşların fenotipik olarak değerlendirilmesi

SUŞ NO	Katalaz	Hemoliz	Eskülin Hidrolizi	Na hippurat Hidrolizi	CAMP	Biyofilm	Jelatinaz Aktivitesi
1	-	β	-	+	+	+	-
2	-	α	-	-	-	-	-
3	-	α	+	+	-	+	+
4	-	α	-	-	-	-	+
5	-	α	-	-	-	-	+
6	-	α	-	-	-	-	+
7	-	α	-	-	-	+	-
8	-	α	-	-	-	+	-
9	-	α	-	-	-	-	-
10	-	α	+	+	-	+	-
11	-	α	+	+	-	+	-
12	-	α	-	-	-	-	+
13	-	γ	+	+	-	+	+
14	-	α	-	-	-	+	+
15	-	α	-	-	-	+	+
16	-	α	-	-	-	+	+
17	-	α	-	-	-	+	+
18	-	α	-	-	-	+	+
19	-	γ	+	+	-	-	+
20	-	α	-	-	-	+	+
21	-	α	-	-	-	+	+
22	-	α	-	-	-	+	+

4.3. Suşların Genotipik İdentifikasyonu ve Virülens Genlerinin Belirlenmesi

4.3.1. Streptococcus Cins Spesifik PCR

İzole edilmiş ve fenotipik olarak Streptococcus spp. olarak tanımlanan 22 adet suşun tamamı, Streptococcus cins spesifik PCR sonucunda 154 bp bant verdi ve Streptococcus spp. olarak doğrulandı.



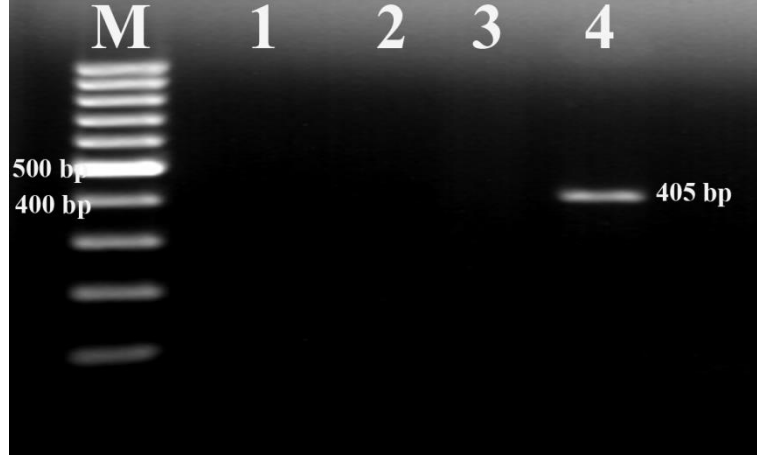
Şekil 6. Streptococcus cins spesifik PCR

4.3.2. Streptococcus Tür Spesifik PCR Analizleri

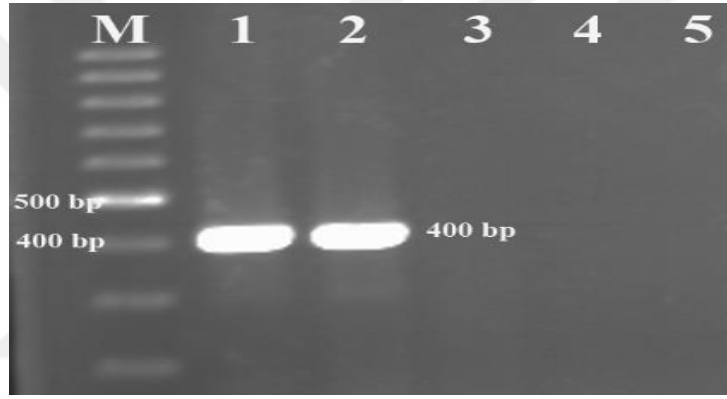
Fenotipik olarak 1'i *S. agalactiae*, 16'sı *S. dysgalactiae* ve 5'i de *S. uberis* olarak tanımlanan izolatlar tür spesifik primerler ile yapılan PCR analizleri ile doğrulandı. Buna göre *S. agalactiae* suşu 405 bp'lik bant verirken, *S. dysgalactiae* ve *S. uberis* suşlarının sırasıyla 281 ve 400 bp'lik bantlar verdikleri belirlendi.



Şekil 7. Streptococcus tür spesifik PCR-*S. dysgalactiae* (281 bp)



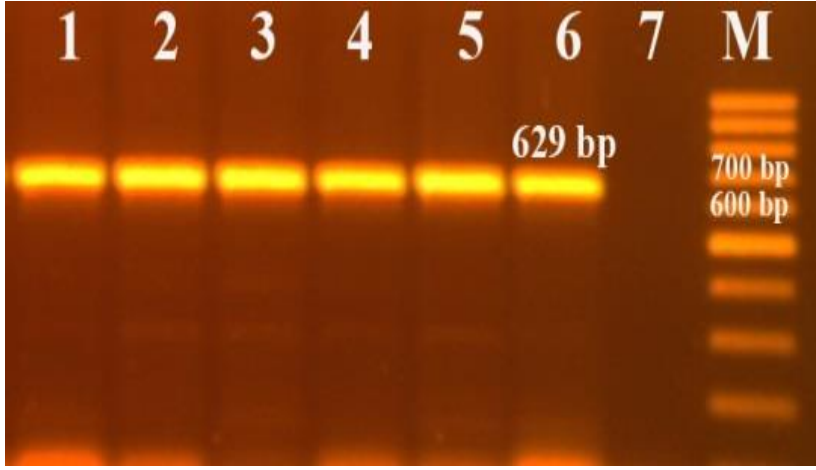
Şekil 8. Streptococcus tür spesifik PCR- *S. agalactiae* (405 bp)



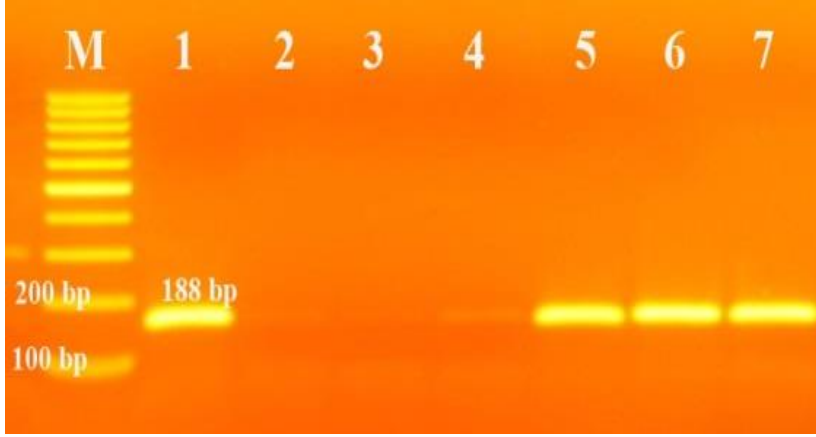
Şekil 9. Streptococcus tür spesifik PCR- *S. uberis* (400 bp)

4.3. Virülens Genlerinin PCR ile Belirlenmesi

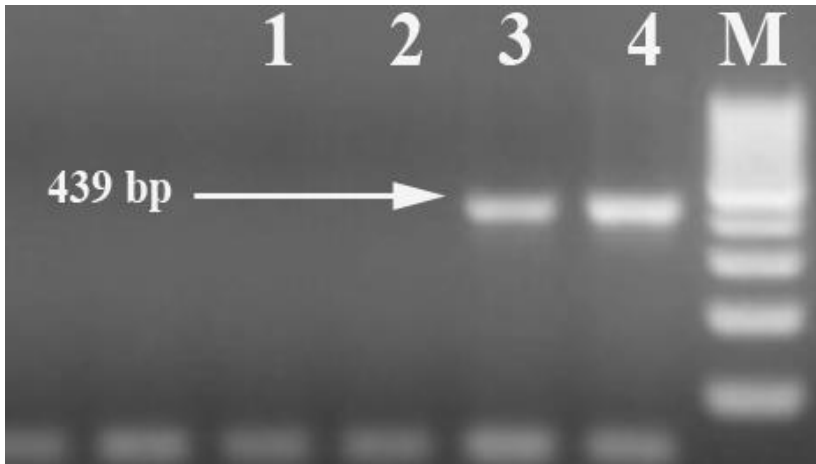
Çalışmada streptokok suşlarında araştırılacak genlerden *fnbB*, *mig*, *skc*, *cfb*, *hylB*, *scpB*, *spb1*, *sip*, *pau* ve *lmb* genlerine spesifik ayrı ayrı PCR analizleri sonunda *fnbB*, *mig*, *skc*, *cfb* ve *pau* genleri için beklenen bant boyutlarında, sırasıyla 629 bp, 188 bp, 475 bp, 193 bp, 567 bp ve 439 bp'lik bantlar elde edilirken suşların hiçbirinde *hylB*, *spb1*, *sip* ve *lmb* geni bulunamadı. Çalışma suşlarında belirlenen virülens genleri tablo 3'te belirtilmiştir. Çalışmanın tek *S. agalactiae* suşunda *cfb* geni belirlenirken diğer virülens genlerinden hiçbirini belirlenemedi. *S. dysgalactiae* suşlarının 14'ünde (%87,5) ve 6'sında (%37,5) sadece sırasıyla *mig* ve *fnbB* genleri bulunurken *S. uberis* suşlarının 4'ünde (%80) *skc* ve 2'sinde (%40) *pau* geni bulundu.



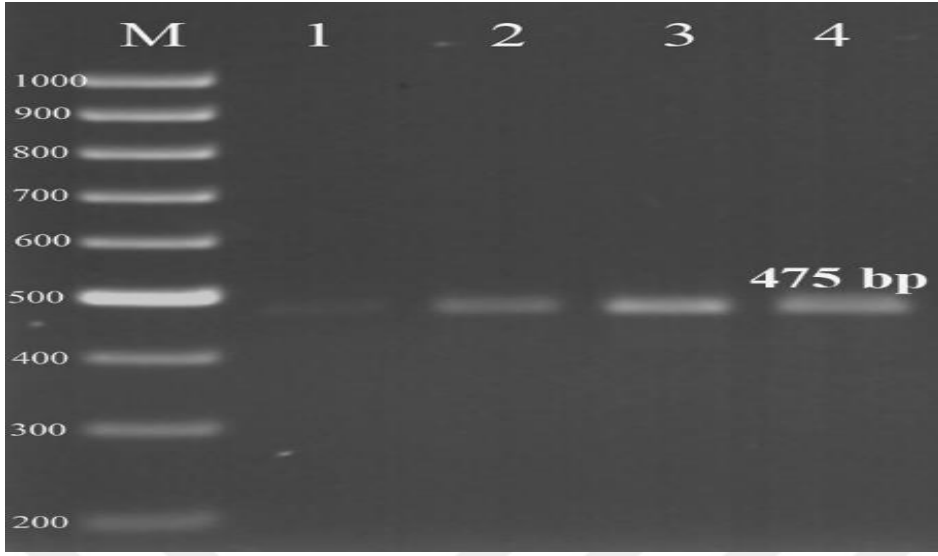
Şekil 10. *fnbB* (Fibrinojen bağlayıcı protein) virülens geni (629 bp)



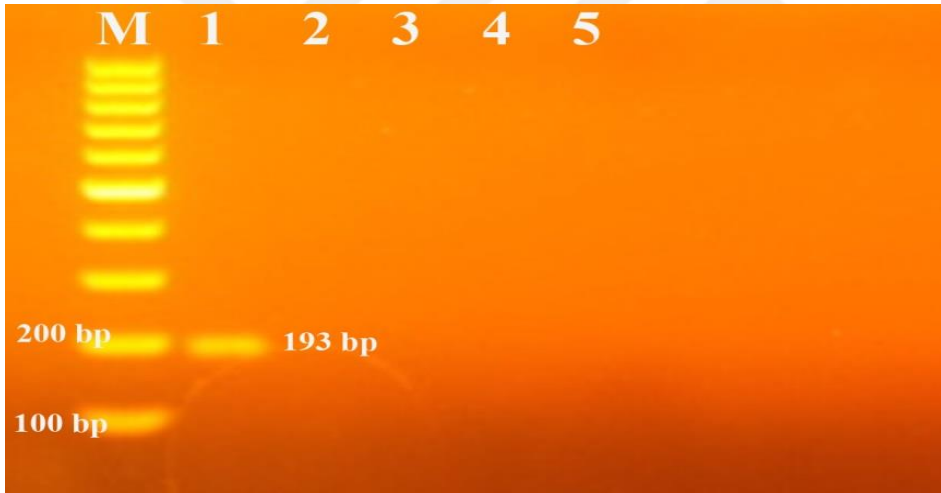
Şekil 11. *mig* (Mig protein) virülens geni (188 bp)



Şekil 12. *pau* (Plazminojen aktivatör) virülens geni (439 bp)



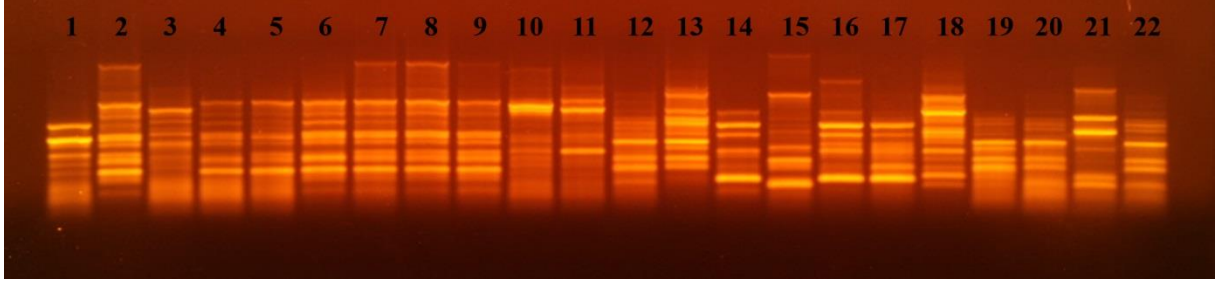
Şekil 13. *skc* (streptokinaz) virülens geni (475 bp)



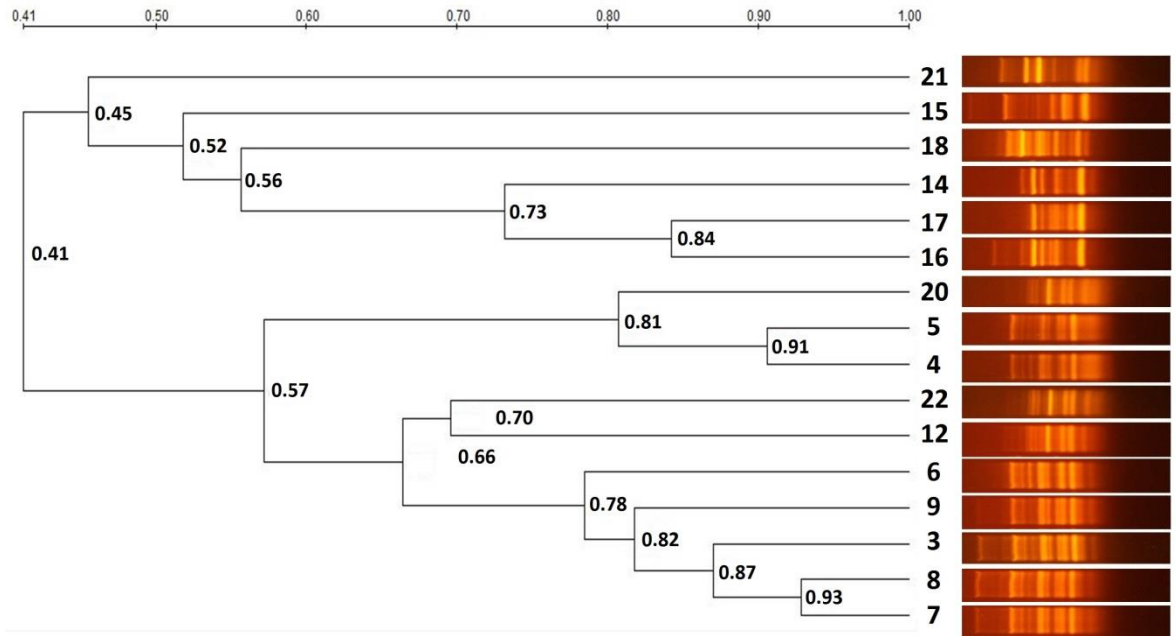
Şekil 14. *cfb* (CAMP faktör) virülens geni (193bp)

4.4. RAPD-PCR

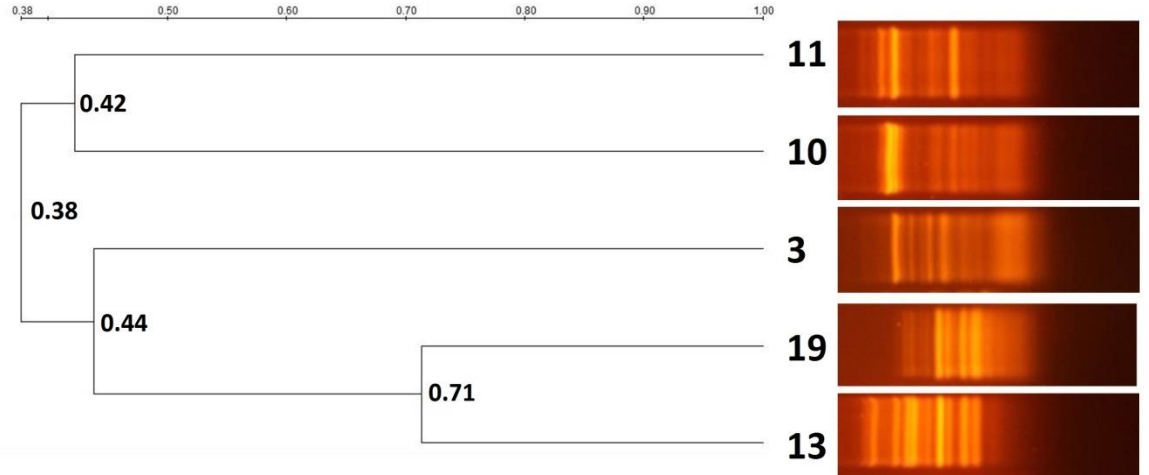
Çalışma kapsamında incelenen streptokok suşlarının hepsi M13 primeri ile bant verdi. Tüm suşlar arasında genetik çeşitlilik gözlemlendi. Çalışma kapsamında değerlendirilen 22 adet streptokok suşunun RAPD-PCR profili Şekil 15’te gösterilmiştir. *S. dysgalactiae* ve *S. uberis* suşlarına ait RAPD-PCR profillerinden elde edilen dendrogramlar da ayrı ayrı sırasıyla Şekil 16 ve Şekil 17’de gösterilmiştir.



Şekil 15. Tüm Streptokok suşlarının RAPD-PCR profili



Şekil 16. UPGMA kullanılarak *S. dysgalactiae* izolatlarının RAPD-PCR paternlerinden oluşturulmuş dedrogram



Şekil 17. UPGMA kullanılarak *S. uberis* izolatlarının RAPD-PCR paternlerinden oluşturulmuş dedrogram

S. dysgalactiae suşları, RAPD-PCR sonucu 16 farklı tipe (3 “cluster” (küme) ve 5 “unique” (benzersiz) tip ayrıldı. *S. dysgalactiae* suşlarının nispeten daha fazlasını (5 suş) bulunduran kümedeki (H kümesi) suşların en az %78 oranında benzer olduğu gözlenirken 3'er *S. dysgalactiae* suşu içeren E ve D kümelerinin suşları arasındaki benzerliğin sırasıyla %81 ve %73 olduğu belirlendi. *S. uberis* suşları, RAPD-PCR ile 5 farklı (1 küme ve 3 benzersiz tip) tipe ayrıldı. Küme içindeki iki suşun birbirine %71 oranında benzediği gözlemlendi.

4.5. Tekrarlanabilirlik, Ayırt Edici İndeks ve Güven Aralıkları

RAPD-PCR analizlerinin tekrarlanabilirliği %100 bulundu. DI (%CI)'ler *S. dysgalactiae* ve *S. uberis* suşlarının RAPD-PCR analizleri için sırasıyla 0,86 (%86-87) ve 0,9 (%89-90) olarak hesaplandı.

4.6. Antibiyotik Duyarlılık Profili

Streptococcus suşlarının 7 farklı gruptan 12 antibiyotiğe karşı Kirby-Bauer Agar Disk Difüzyon yöntemi ile belirlenen direnç durumları Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5. İncelenen tüm Streptokok suşlarının genel antibiyotik dirençlilik durumları

Kullanılan Antibiyotik Diskleri	Dirençli Suş Oranı	% Direnç
Penisilin	19/22	86,3
Amoksisilin + Klavulanik Asit	9/22	40,9
Ampisilin	22/22	100
İmipenem	2/22	9,09
Sefalotin	15/22	68,1
Tetrasiklin	12/22	54,5
Kloramfenikol	13/22	59,09
Vankomisin	14/22	63,6
Spiramisin	9/22	40,9
Eritromisin	11/22	50
Enrofloksasin	10/22	45,5
Linkomisin	20/22	90,9

İncelenen tüm antibiyotiklerin hepsine karşı duyarlı olan suş bulunmadı. Suşların tümünde en az 2 antibiyotiğe karşı direnç bulunurken çoklu antibiyotik direnci (en az 3 veya daha fazla sayıda antibiyotik grubuna direnç gösteren; MDR) %81,8 (18 suş) oranında tespit edildi. *S. uberis* suşlarının tamamı ve *S. dysgalactiae* suşlarının çoğu (%87,5) penisiline dirençli bulundu. Diğer beta laktam grubu antibiyotiklerden amoksisilin, ampisilin, sefalotin ve imipeneme direnç yüzdeleri *S. uberis* 'te sırasıyla %40, %100, %80 ve %0, *S. dysgalactiae* 'da ise sırasıyla %43,75, %100, %68,75 ve %6,25 olarak belirlenirken bu iki türün glikopeptid antibiyotiklerden vankomisine karşı direnç yüzdeleri sırasıyla %60 ve %68,75 bulundu. *S. agalactiae* suşu'nun ampisilin ve tetrasiklin dışında diğer antibiyotiklere duyarlı olduğu görüldü. *S. uberis* suşları makrolidlerden spiramisin ve eritromisine karşı sırasıyla %40 ve %60 dirençli bulunurken

aynı antibiyotiklere karşı *S. dysgalactiae* suşlarının direnç yüzdesi sırasıyla %43,7 ve %50 olarak tespit edildi. Enrofloksasine sadece iki *S. uberis* suşu (%40) ve *S. dysgalactiae* suşlarının %50'si direnç gösterirken, tetrasikline karşı *S. dysgalactiae* suşları %62,5 *S. uberis* suşları ise %20 oranında dirençli bulundu. *S. uberis* suşlarının tamamında (%100) ve *S. dysgalactiae* suşlarının büyük çoğunluğunda (%93,73) linkomisin direnci belirlendi. Çalışmadaki tüm streptokok suşlarının antibiyotik duyarlılık profilleri ve çoklu direnç durumları Tablo 6'da verilmiştir.

Tüm suşların antibiyotiplendirmesi için UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) metodu ile dendrogram ve görüntü analiz programı kullanılarak çizilen dendrogram Şekil 18'de verilmiştir.

Tablo 6. Streptokok suşlarının antibiyotik duyarlılık profilleri ve çoklu direnç durumları

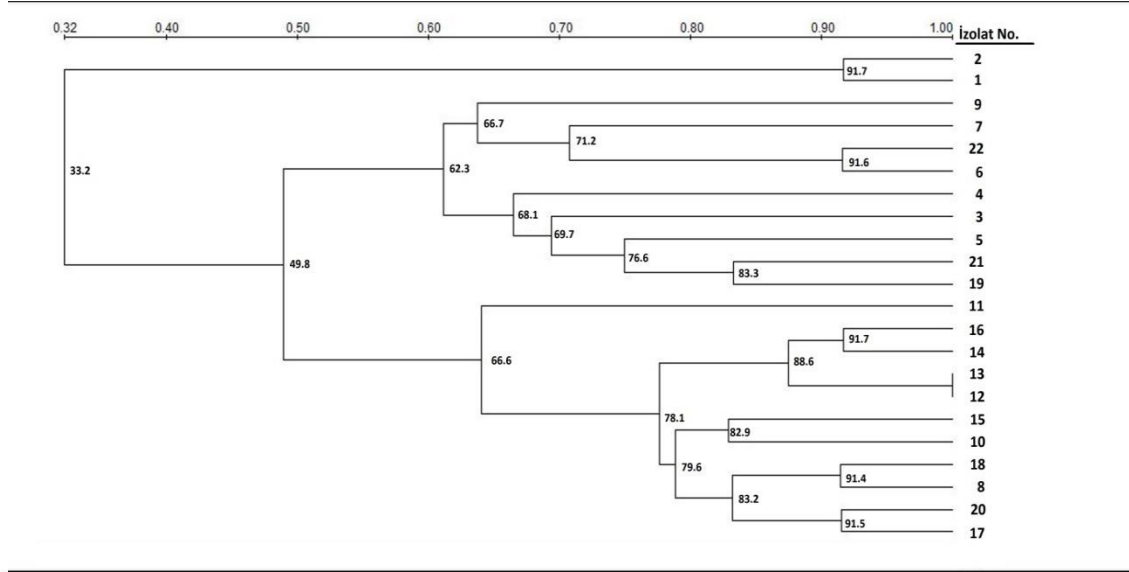
Sus No	P	AX	AMP	IPM	KE	VA	C	SP	E	ENR	MY	TE	Grup Sayısı**	
<i>S. uberis</i>	1*	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	R	2	
	3	R	S	R	S	R	S	S	I	I	R	S	3	
	10	R	R	R	S	R	R	R	I	S	R	R	6	
	11	R	I	R	S	R	R	S	R	R	R	S	5	
	13	R	R	R	S	R	R	R	I	R	R	I	6	
19	R	S	R	S	S	S	S	I	I	I	R	S	2	
<i>S. dysgalactiae</i>	2	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R	2	
	4	S	S	R	S	S	S	S	I	I	I	R	R	3
	5	R	R	R	S	R	I	S	I	I	I	R	S	2
	6	R	S	R	S	I	R	S	I	I	I	R	R	4
	7	R	R	R	S	R	R	R	I	R	I	R	I	4
	8	R	I	R	S	R	R	R	R	I	R	R	R	7
	9	R	R	R	S	S	I	R	R	R	I	R	R	5
	12	R	R	R	S	R	R	R	I	R	R	R	I	6
	11	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	I	6
	15	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	7
	16	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	6
	17	R	S	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	7
	18	R	I	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R	7
	20	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	7
21	R	I	R	S	I	S	S	I	I	I	R	S	2	
22	R	S	R	S	I	R	R	I	I	I	R	R	5	

P: Penisilin, AX:Amoksisilin + Klavulanik asit, AMP:Ampisilin, IPM:İmipenem, KE:Sefalotin, C:Kloramfenikol, VA:Vankomisin, SP:Spiramisin, E:Eritromisin, ENR:Enrofloksasin, MY:Linkomisin, TE:Tetrasiklin

*: *S. agalactiae*

** : Direnç belirlenen grup sayısı

β-laktam	Glikolipid	Amfenikol	Makrolid	Kinolon	Aminoglikozid	Tetrasiklin
----------	------------	-----------	----------	---------	---------------	-------------



Şekil 18. *Streptococcus* spp. izolatlarının antibiyotiplendirme sonucu elde edilen dendrogram

Dendrograma göre, çalışmada kullanılan antibiyotiklere karşı genel duyarlılık profilleri incelendiğinde ve %70 benzerlik oranı temel alındığında, suşların 3 tekli tip ve 4 kümeye ayrıldığı görüldü. Suşların %81,8'inin birbirine %70'in üzerinde benzerlik gösterdiği görüldü. Suşlar arasındaki benzerlik oranının %78,1 olduğu grup (A8), suşların %45,4'ini içermekteydi ve bu suşların da 6'sı %90'ın üzerinde benzerlik göstermekteydi.

5. TARTIŞMA

Mastitis tüm dünyada, çeşitli kontrol stratejileri de uygulanmasına rağmen yaygın olarak görülen ve önemli ekonomik kayıplara neden olan bir hastalıktır (Bradley, 2002). Mastitis çok faktörün iştirak ettiği (multifaktöriyel) bir hastalık olup, etiyopatolojisinde 3 ana faktörden söz edilebilir; mikroorganizmalara maruziyet, konak immun savunma mekanizmaları ve çevresel faktörler (Zadoks, 2001). Mikrobiyel etkenler bunlar arasında en önemli yere sahiptir. Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de çeşitli çalışmalarda (Türütoğlu ve ark., 1995; Ekin ve Gürtürk,1998; Gürtürk ve ark., 1998; Kuyucuoğlu ve Uçar, 2001; Tel ve ark., 2009; Macun ve ark., 2011; Genç, 2015) mastitis prevalansı değerlendirilmiş, çeşitli bakteriyel etkenler izole ve tanımlanarak etkenlerin karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Mastitise neden olan etkenlerin içinde bakteriyel etkenler önemli bir yer tutmakta olup mastitise neden olan mikroorganizmaların yaklaşık %95’inin *S. agalactiae*, *S. aureus*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis* ve *E. coli* olduğu ve %5’inin ise diğer mikroorganizmalar olduğu bildirilmiştir (Atasever ve Erdem, 2008). Mastitise neden olan önemli streptokok türlerinden *S. agalactiae*’nin kontagiyöz mastitise neden olduğu, *S. dysgalactiae* ve *S. uberis* ise çevresel mastitis etkeni olduğu bilinmektedir (Zadoks, 2001; Bogni ve ark., 2011). Kontagiyöz bakteriler, mastitisli (enfekte) inekten sağlıklı ineğe genellikle sağım sırasında bulaşır. Eller, havlular veya sağım makinesi kontagiyöz bakteriler için bulaşma kaynağıdır. Çevresel bakteriler, adından da anlaşılacağı gibi ineklerin çevresindeki altlık, toprak, gübre, vb. materyallerden ve dolayısıyla yönetim uygulamalarından oldukça fazla etkilenir. Bunları tamamen elimine etmek olanaksız olup, hayvanın yaşadığı yerde hep vardır. Bunlar sadece hem hayvanı hem de çevresini temiz tutmak suretiyle kontrol altına alınabilir (Zadoks, 2002, Garcia, 2004). Mastitisin kontrolü ve/veya önlenmesinde hem çevresel hem de kontagiyöz mastitis patojenlerinin belirlenmesi, prevalansının ve dağılımının belirlenmesi, ayrıca mastitise iştirak eden risk faktörlerinin belirlenmesi çok önemlidir (Azevedo ve ark., 2016).

Geleneksel olarak mastitis patojenlerinin identifikasyonu klasik fenotipik mikrobiyolojik yöntemlere göre yapılmaktadır. Bununla birlikte PCR veya kütle spektroskopisine dayalı değerli alternatif yöntemler de bulunmaktadır (Raemy ve ark., 2013). Fenotipik identifikasyon, morfoloji, üreme özellikleri, substratları metabolize etme yetenekleri ve DNA ekspresyonu sonu ortaya çıkan diğer özelliklerin

değerlendirilmesi ile gerçekleştirilmektedir. Ticari teşhis kiti üreticileri, test sistemleri ve biyokimyasal testlerin kombinasyonlarını içeren, fenotipik özelliklere dayalı identifikasyon metotları geliştirmiştir. Fenotipik metotların bazı avantajları arasında, uygulamasının kolay olması, piyasada kolay bulunabilmesi ve nispeten ucuz olması sayılabilir. Ancak fenotipik metotların genel bir zayıflığı, aynı türden izolatların değişken ekspresyon özelliklerinden ve değerlendirmelerinin subjektif olmasından kaynaklanmaktadır. Bu testlerin tekrarlanabilirliği, fenotipik özelliklerin ekspresyonundaki ve değerlendirilmesindeki değişkenliklerden dolayı kısıtlıdır. Ayrıca tekrarlanabilirliğin yanında, tiplendirebilirlik de hem tür hem de suş düzeyinde iyi değildir. Mikrobiyolojik kültür metotlarının da zahmetli ve zaman alıcı olduğu düşünülmektedir. Genotipik metotlar identifikasyonda temel olarak DNA'yı kullanmakta olup tür identifikasyonu ve suş tiplendirmesi için kullanılmaktadır. Hatta bazı mastitis patojenlerinin genomik sekansları mevcut olup bunlar, enfeksiyöz etkenlerin nükleik asitlerini direkt belirlemeye yönelik en popüler metotlardan biri haline gelmiş olan PCR gibi nükleik asit temelli metotları geliştirmek için kullanılmıştır (Duarte ve ark., 2015). Açıkça görülmektedir ki, enfeksiyöz hastalıkların önlenmesi ve mastitisin izlenmesi için streptokokların hızlı ve spesifik identifikasyonu istenmektedir. Süt ineklerinde mastitis tanısının iyileştirilmesine yönelik olarak Puektes ve ark. (2001), süttten *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* ve *S. uberis*'i aynı anda teşhis edecek hızlı, duyarlı ve spesifik bir multipleks PCR metodugeliştirmişlerdir. Günümüzde, ribozomal operon-temelli PCR, birçok bakteriyel türün identifikasyonunda kullanılmakta olup süt ürünlerinde mastitise neden olan bakterilerin belirlenmesinde çeşitli yaklaşımların kullanıldığı bildirilmiştir (Dimitriev ve ark., 2006). Sığır sütündeki bakteriyel DNA ile PCR'da reaksiyona giren moleküler probalar, *E. coli*, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. parauberis* ve *S. uberis*'in direkt ve hızlı tespitini sağlayacak şekilde geliştirilmiştir (Riffon ve ark., 2001). Shome ve ark., 2011' da geliştirdikleri multipleks PCR ile, içlerinde *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* ve *S. uberis*'in de olduğu 10 bakterinin simultan identifikasyonunu basit, hızlı ve güvenilir şekilde identifiye etmişlerdir. Açıkça görülmektedir ki, PCR-temelli metotların geliştirilmesi bakterilerin hızlı ve güvenilir şekilde identifiye edilmesi için değerli bir seçenektir. Bununla birlikte kültür işleminin mastitis olgusundan izole edilecek patojenin antibiyotik duyarlılığını belirlemeye öncülük edeceği de unutulmamalıdır. Bu çalışmada daha önceden çeşitli mastitis olgularından izole edilip, *Streptococcus* spp.

olarak tanımlanmış suşlar hem kültürel hem de PCR ile moleküler tanımlamaya tabi tutuldu. Kültürel tanımlama sonucu 22 adet suşun tamamı *Streptococcus* spp. olarak doğrulanırken tür düzeyinde 22 suşun 1'i *S. agalactiae*, 16'sı *S. dysgalactiae* ve 5'i de *S. uberis* olarak tanımlanmış oldu. Suşların tür spesifik primerler ile gerçekleştirilen PCR analizleri sonucunda, %100 uyumla suşlar tanımlanmış oldu. Moatamedi ve ark. (2007), streptokokal mastitisin teşhisinde PCR ve kültür metotları arasında %91,6 uyum olduğunu bildirmişlerdir. Ancak araştırmacılar bakteri tanımlamalarını PCR ile süt örneklerinden DNA amplifikasyonu ile gerçekleştirmişlerdir.

Patojen suşların tanımlamalarında ve karakterizasyonlarında çeşitli virülens özelliklerinin fenotipik ve genotipik olarak ortaya konulması önemlidir. Lasagno ve ark., (2011), mastitise neden olan *S. uberis* suşlarının fenotipik ve genotipik özelliklerini araştırdıkları çalışmalarında, suşları plazminojen aktivatör faktör, hyaluronidaz, kapsül ve CAMP faktör varlığı yönünden fenotipik olarak ve pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) ile de genotipik olarak karakterize etmişlerdir. Plazminojen aktivatör faktör, hyaluronidaz, kapsül ve CAMP faktör yönünden suşların sırasıyla %65,5, %56,3 ve %59,4 oranında pozitiflik gösterdikleri ve PFGE paternlerinin virülens özellikleri ile ilişkisinin olmadığı bildirilmiştir. Bu çalışmada incelenen fenotipik virülens faktörlerinden jelatinaz ve biyofilm oluşturma özellikleri yönünden *S. uberis* suşları arasında heterojenite gözlemlendi. Johnsen ve ark. (1999), *S. uberis* suşlarında %90 oranında *skc* geninin varlığını tespit ettiklerini bildirirken, Reinoso ve ark. (2011) *skc* genini *S. uberis* suşlarının %65,3'ünde saptamışlardır. Abdel-Tavap ve ark. (2017), süttten izole ettikleri *S. agalactiae* suşlarında PCR ile *hyaluronidase (hyl)* genini %25%, *S. dysgalactiae* suşlarında *mig* genini %100 oranında saptamışlardır. Ayrıca, *plazminojen aktivatör(pauA)* genini *S. uberis* izolatlarında %100 oranında tespit etmişlerdir. Çiçek (2014), *S. uberis* suşlarında *pau* ve *skc* genlerini sırasıyla %70 ve %91 oranlarında bulmuştur. Bu çalışmada incelenen *S. dysgalactiae* suşlarından %81,25'i *mig* geni yönünden pozitif bulunurken, *pau* geni sadece *S. uberis* suşlarının %40'ında pozitif bulundu. Bu çalışmada suşlarda varlığı araştırılan çeşitli virülens genlerinden (10 farklı virülens geni) sadece 2 gen, *skc* ve *pau* genleri, *S. uberis* suşlarında sırasıyla %80 ve %40 oranında tespit edilirken bu iki geni de içermeyen 1 adet *S. uberis* suşu tespit edildi. RAPD-PCR ile gerçekleştirilen genotiplendirme sonunda da ortaya konulan genotipler ile virülens özellikleri arasında ilişki görülmedi. Genotiplendirme sonucu %71 oranında

benzerlik gösteren ve aynı küme içinde yer alan suşların *skc* ve *pau* geni varlığı bakımından farklı oldukları görüldü.

Ding ve ark. (2016), mastitis vakalarından izole ettikleri *Streptococcus* suşlarında *cyl*, *glnA*, *cfb*, *hylB* ve *scaA* genlerinin varlığını incelemişler ve sadece *S. agalactiae* suşlarında sırasıyla %46,9, %50,6, %49,4 ve %45,7 oranında belirlemişlerdir. Bununla birlikte izolatların %3,7, %21 ve %4,9'unun *bca*, *lmb* ve *scpB* genleri yönünden pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada, suşlarda araştırılan 10 virülens geninden *cfb* geni, sadece çalışmamızın tek *S. agalactiae* suşunda tespit edilirken bu suş *hylB*, *lmb* ve *scpB* de dahil diğer genler yönünden negatifti. Bu bulgular, çoğu sığır suşlarının, insan suşlarının aksine, özellikle *scpB* ve *lmb* genlerinden (yüzey proteinlerini kodlar) yoksun olduğunu bildiren moleküler analiz sonuçları (Franken ve ark., 2001; Dmitriev ve ark., 2002; Shome ve ark., 2012) ile uyumludur. Genel olarak mastitise neden olan streptokok türlerinde ve özellikle çevresel mastitis etkenleri olarak değerlendirilen *S. dysgalactiae* ve *S. uberis* suşlarında virülens genleri yönünden varyasyonlar gözlenmektedir. Bu varyasyonların ortaya konması, etkenlerin sebep olduğu mastitis vakalarının patogenezelemlerinin daha iyi anlaşılmasını sağlayarak kontrol programlarında alınacak önlemlere yönelik faaliyetlere ışık tutacaktır.

Bakteriyel izolatların karakterizasyonları ve birbirine yakın suşların identifiye edilmesinde biyokimyasal profil, serotiplendirme ve antibiyotik direnç profilleri her zaman yeterli olmamaktadır. Streptokokların identifikasyonuna ve diferensiyasyonlarına yönelik nükleik asit temelli teşhis yöntemlerinin geliştirilmesi ve uygulanması giderek artmıştır. Moleküler metotlar kullanılarak araştırılan başlıca sığır mastitis patojenleri arasında Gram negatif türlerden *E. coli* and *K. pneumoniae* ve Gram pozitiflerden ise *S. agalactiae*, *S. uberis* ve *S. aureus* yer almaktadır. *S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae*, koagulaz negatif stafilokoklar (CoNS) veya *Mycoplasma* spp. gibi diğer bazı tür veya cinslerin alt tür düzeyinde moleküler tiplendirmesi hala emekleme aşamasındadır. Sığır mastitisinin epidemiyolojisini alt tür düzeyinde araştırmak için oldukça çeşitli moleküler tiplendirme metotları kullanılmıştır. Bunlar arasında elektroforetik bant paternlerine dayanan karşılaştırmalı tiplendirme metotları, seçilmiş genlerin sekansına dayanan kütüphane tiplendirme metotları, virülens genlerin araştırılması ve tüm genom sekans projeleri yer almaktadır (Zadoks, 2011). DNA analizine dayanan restriction fragment length polymorphism (RFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD), Pulsed

Field Gel Electrophoresis (PFGE) ve Multilocus Sequence Typing (MLST) gibi moleküler metotlar yaygın olarak kullanılmaktadır. PFGE, bakterileri tiplendirmede en ayırt edici metot olmakla birlikte, RAPD nispeten daha ucuz olması, hızlı olması, ucuz ekipman gerektirmesi ve duyarlılığı göz önüne alındığında daha basit ve dolaysız bir yöntemdir. RAPD, polimorfik DNA segmentlerinin çoğaltılması için rastgele bölgelere bağlanan primerlerin kullanıldığı bir metot olup son yıllarda hem insan hem de hayvan suşlarındaki genetik varyasyonun ortaya konulması için sıklıkla kullanılmaktadır (Martinez ve ark., 2000). RAPD analizi, grup A, C ve G streptokoklar içindeki türlerin ve suşların ayırımını sağlama kapasitesini değerlendirmek üzere kullanılmış, analizin grup A streptokok suşlarının tamamını ayırt edemediği bildirilmiştir (Bert ve ark, 1996). Jayaro ve ark. (1996), OPE-4 ve OPE-5 primerleri ile elde edilen karakteristik polimorfik DNA fragmentlerine dayanan bir bakteriyel tür identifikasyon şeması geliştirmişler ve çalışmanın sonunda RAPD parmak izi yönteminin sütlerdeki bakterilerin tür identifikasyonu için hızlı ve doğru bir metot olma potansiyeli taşıdığı bildirilmiştir. Önceki bazı çalışmalarda *S. uberis* izolatları arasında önemli suş homojenitesi olduğu bildirilmekle birlikte bunun nedeni olarak moleküler tiplendirme metotlarının henüz yeni kullanılmaya başlanması ve ayırt edici güçlerinin zayıf oluşu görülmüştür. Sonraları yapılan ve RAPD-PCR metodunun da kullanıldığı hemen hemen her çalışmada suşlar arasında önemli derecede heterojenitenin olduğu gösterilmiştir (Zadoks ve ark., 2011). Riffon (2001), çalışmasında OPA primerleri ile kullanılarak *S. uberis* etkenlerinden elde ettiği RAPD-PCR profillerinin aynı ve farklı çiftliklerdeki farklı hayvanlardan izole edilen suşlarda benzer profiller gösterdiğini ve kullanılan OPA primerlerinden birinin, sadece bir *S. uberis* suşunda farklı bant profili oluşturduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada, kullanılan M13 primeri ile, *S. uberis* suşlarında farklı bant profilleri elde edilirken, birbirine en yakın *S. uberis* suşları arasındaki benzerlik %71 oranında bulundu. *S. dysgalactiae* türünün önemli virülens özelliklerini kodlayan *mig* ve *fnbp* genlerini bir arada bulduran 6 (%37,5) *S. dysgalactiae* suşu olduğu ve bunlardan 4'ünün (%25) H kümesi içinde yer aldığı ve bu suşların da benzerlik oranlarının \geq %78 olduğu görüldü. Diğer 2 suş ise başka bir kümede (D kümesi) yer almakta ve %73 benzerlik göstermekteydi.

Antimikrobiyel direnç patojenik bakterilerde önemli bir problem haline gelmiş olup kısmen hayvan yetiştiriciliğinde kullanılan büyüme uyarıcılarına ve profilaktik ajanlara bağlı olabilir (Ding ve ark., 2016). Mastitis patojenlerinin direnç profilleri, farklı ülkelerde oldukça fazla araştırılmış olup oransal olarak farklılıklar göstermektedir. Fransa’da yapılan bir çalışmada, *S. uberis*’in en yüksek oranda (yaklaşık %18) streptomisine dirençli olduğu ardından makrolid- linkozamidlere %13-17 oranında direnç gösterdikleri belirlenmiştir. Aynı çalışmada, tetrasikline (yaklaşık %7-13) ve okzasiline (yaklaşık %13) karşı direnç oranları daha düşük bulunmuştur. *S. dysgalactiae* için ise, en yüksek direnç oranı tetrasikline karşı (%35-42) belirlenirken, makrolidler-linkozamidlere karşı direnç %3-5 oranında bulunmuştur. Türler ne olursa olsun, hiçbir suşta ampisilin, florfenikol, rifampisin veya glikopeptidlere karşı direnç belirlenmemiştir (Botrel ve ark., 2010). Bu çalışmada, *S. uberis* suşlarının makrolidlerden spiramisin ve eritromisine karşı sırasıyla %40 ve %60 dirençli olduğu belirlenirken, bu yüzdeler *S. dysgalactiae* suşları için sırasıyla %43,75 ve %50 idi. Tek *S. agalactiae* suşu ise bu üç makrolide karşı duyarlı bulundu. Bu sonuçlar Botrel ve ark. (2010)’nın sonuçlarında göre oldukça farklı olup direnç yüzdelerinde makrolid grubu antibiyotiklere karşı artış olduğu görülmektedir. Başka bir çalışmada (Suriyasathaporn ve ark.,2012) *S. uberis* ve *S. dysgalactiae* suşlarının genel olarak özellikle oksitetrasiklin (yaklaşık %23-37), gentamisin (%74-77) ve neomisine (%91-95) karşı yüksek oranda dirence sahip olduğu belirlenmiştir. Kia ve ark (2014), klinik mastitis olgularından izole ettikleri *S. dysgalactiae* ve *S. uberis* suşlarında tetrasikline karşı sırasıyla %74,18 ve %75,59 olarak bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar beta laktam antibiyotiklerden amoksisilin ve penisiline karşı direnci *S. dysgalactiae* suşları için sırasıyla %8,86 ve %46,78, *S. uberis* suşları için %11,5 ve %20,98 bulunmuş, vankomisine karşı direncin ise her iki suş için sırasıyla %75,82 ve %78,89 olduğu ortaya konulmuştur. Bu çalışmada, tetrasikline karşı *S. dysgalactiae* suşları %62,5 oranında direnç gösterirken *S. uberis* suşları %20 oranında dirençli bulundu. Ayrıca *S. dysgalactiae* suşlarının penisilin (%87,5), amoksisilin + klavulanik asit (%43,75) ve vankomisin (%68,75) için direnç oranlarının, Kia ve ark. (2014)’nın sonuçlarından daha yüksek olduğu görüldü. Bu çalışmadaki *S. agalactiae* suşu’nun ampisilin ve tetrasiklin dışında diğer antibiyotiklere duyarlı olduğu görüldü. Zhang ve ark. (2018), Çin’de 5 bölgede izole ettikleri *S. dysgalactiae* suşlarında dikkate çekici bir şekilde, sefaleksine ve seftriaksona karşı sırasıyla %34,1 ve %13,6 oranında direnç bulmuşlardır. Diğer bazı çalışmalarda

sefalotine karşı streptokokların dirençlilikleri, %7,4 (*S. dysgalactiae*) ve %17,3 (*S. uberis*) (Ding ve ark., 2016) ve %14 (Ceniti ve ark.,2017) oranlarında bildirilmiştir. Bu çalışmada ise, *S. dysgalactiae* ve *S. uberis* suşlarının sırasıyla %81,2 ve %80'i sefalotine dirençli bulunurken *S. agalactiae* suşu duyarlı bulunmuştur. Momtaz ve ark. (2017), streptococcus suşlarının tetrasiklin (%87,50) ve eritromisine (%83,92) karşı oldukça yüksek oranda direnç gösterdiğini belirtmiş, linkomisine karşı (%5.35) oldukça düşük bir direnç oranı belirledikleri için streptokok mastitislerinde kullanılacak en iyi antibiyotiklerden biri olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte bu çalışmada linkomisine karşı streptokok suşlarının neredeyse tümü (*S. agalactiae* ve 1 *S. dysgalactiae* suşu hariç) linkomisine dirençli bulundu. Ding ve ark. (2016), *S. dysgalactiae* ve *S. uberis* suşlarında, ampisilin de dahil olmak üzere penisilin, amoksisiline karşı bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre çok daha düşük direnç oranları bildirmişlerdir. Yapılan çeşitli çalışmalarda mastitis olgularından izole edilen streptokok suşlarının ampisiline karşı direnç yüzdeleri de değişkenlik (%8-80) göstermekte olup (İkiz ve ark., 2013; Ding ve ark., 2016; Ceniti ve ark., 2017) bu çalışmada tüm streptokok suşlarının (%100) ampisiline dirençli olduğu bulundu. Imipeneme karşı genellikle 2 *S. dysgalactiae* suşu hariç tüm suşların duyarlı olduğu gözlemlendi. Enrofloksasine sadece bir *S. uberis* suşu direnç gösterirken, eritromisin dirençli *S. dysgalactiae* suşlarının oranı %50 bulundu. Türkiye'de yapılan çeşitli çalışmalarda, mastitis olgularından izole edilen streptokok türlerinin çeşitli antibiyotiklere değişik oranlarda dirençli buldukları bildirilmiştir. Tel ve ark. (2009), amoksisilin ve tetrasikline karşı direnç oranlarını sırasıyla %21,7 ve %26,1 bulurken, Macun ve ark. (2011), çalışmalarında izole ettikleri streptokok türlerinin aynı antibiyotiklere karşı sırasıyla %4,54 ve %18,18 direnç gösterdiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacıların eritromisin ve spiramisine karşı direnci ise sırasıyla %27,72 ve %9,09 bulmuşlardır. Acar ve ark. (2012), oksitetrasiklin, amoksisilin klavulonik asit ve pensiline karşı sırasıyla %58,8, %53 ve %76,5 direnç yüzdeleri bildirmişlerdir.

Görüldüğü gibi gerek yurt dışında gerekse yurt içinde yapılan çalışmalarda sığır mastitislerinden izole edilen streptokok suşlarında, antibiyotik duyarlılık profilleri yönünden varyasyonlar dikkati çekmektedir. Bu çalışmada özellikle ampisilin ve linkomisine karşı bulunan %100 direnç durumları ile birlikte sahada yaygın bir şekilde kullanılan sefalosporin grubu antibiyotiklerden sefalotine karşı bulunan direnç yüzdeleri dikkati çekmektedir. Ayrıca suşların %81,8'inde çoklu antibiyotik direncinin tespit edilmesi bölgede antibiyotik direnç sorunun önemli göstergelerinden biri olarak düşünülmektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ülkemizde hala büyük ekonomik kayıplara neden olan mastitisin en önemli bakteriyel etkenlerinden olan streptokoklar'ın gerek fenotipik gerekse genotipik olarak identifikasyonları gerçekleştirilerek suşların sahip oldukları bazı önemli virülens faktörleri ortaya konuldu. Tez çalışmasında kullanılan fenotipik ve genotipik identifikasyon metotlarının suşları ayırt etmede kullanışlı olduğu, araştırılan virülens faktörleri yönünden suşlar arasında varyasyonların olduğu görüldü. Daha önce yapılan araştırmalarda da etkenlerin sahip oldukları virülens faktörlerinin türlere göre ve bölgesel farklılıklar gösterdiği bildirilmektedir. Bölge veya ülke genelinde yapılacak çalışmalarda virülens genlerinin daha ayrıntılı bir şekilde araştırılmasının, hem hastalığın patogenezi daha iyi anlamada yardımcı olacağı hem de aşı geliştirme çalışmalarında kullanılmak üzere potansiyel aşı suşu/protein adaylarının ortaya konmasında yardımcı olacağı düşünülmektedir. Çalışmada RAPD-PCR ile gerçekleştirilen moleküler tiplendirme ile de suşlar arasındaki genotipik ilişki belirlenerek bunun virülens özellikleri ile ilişkisi değerlendirildi. RAPD tiplerinin *S. dysgalactiae* ve *S. uberis* izolatlarında, suşların çalışmada araştırılan virülens genleri ile açık bir ilişkisinin olmadığı görüldü. DNA dizi analizine veya tüm genom analizine dayanan moleküler metotlarla yapılacak tiplendirme ve virülens özellikleri ile ilişkilendirmenin yararlı olacağı düşünülmektedir. Streptokok izolatlarının antibiyotiklere karşı direnç profillerinin de belirlendiği bu çalışmada, çeşitli gruplardan çok sayıda antibiyotiğe karşı direnç durumu ortaya konuldu. Genel olarak bakıldığında, bölgelere göre streptokok suşlarının direnç profillerinde değişkenlik görülmesinin yanında, zaman içinde bazı antibiyotiklere karşı direnç oranlarının da değişebildiği dikkati çekmektedir. Çalışmada elde edilen antibiyotiplendirme sonuçları da aynı bölgeden izole edilmiş olan streptokok suşları arasında çeşitli antibiyotiklere direnç yönünden benzerlik olduğunu göstermektedir. Bölge veya bölgelere spesifik, sürü bazında antibiyotik duyarlılık surveyanslarının yapılarak antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi ve optimum antimikrobiyal terapi başarısı için antibiyotiklerin bu profile göre seçilmesi önemli görülmektedir.

7. KAYNAKLAR

- AbdEL-Tawab AA, Abou El-Roos NA, El-Hofy FI, Abdullah HE. Molecular studies regarding to virulence factors of *Streptococcus* species isolated from raw milk. *BVMJ*. 2017 32(1):145-152.
- Acar G, Yılmaz E, Solmaz H, Cantekin Z. Hatay Bölgesinde klinik ve subklinik mastititsli ineklerden *Streptococcus* spp. etkenlerinin izolasyonu ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi. *AVKAE Derg.* 2012; 2(2):1-5.
- Almeida RA and Oliver SP. Antiphagocytic effect of the capsule of *Streptococcus uberis*. *J. Vet Med B*. 1993; 40: 707-714.
- Almeida RA, Luther DA, Park HM, Oliver SP. Identification, isolation, and partial characterization of a novel *Streptococcus uberis* adhesion molecule (SUAM). *Vet Microbiol*. 2006; 115(1-3):183-91.
- Arda M. Temel Mikrobiyoloji, 3. Baskı, Ankara, Medisan Yayınevi, 2011; 90-91.
- Atasever S, Erdem H. Süt sığırlarında mastitis ile sütün elektriksel iletkenliği arasındaki ilişkiler, *OMÜ Zir. Fak. Derg.* 2008; 23(2): 131-136.
- Azevedo C, Pacheco D, Soares L, Romão R, Moitoso M, Maldonado J, Guix R and Simões J. Prevalence of contagious and environmental mastitis-causing bacteria in bulk tank milk and its relationships with milking practices of dairy cattle herds in São Miguel Island (Azores). *Trop Anim Health Prod* 2016; 48:451-459.
- Baştan A. İneklerde Meme Hastalıkları. Hatiboğlu Basım ve Yayım San.Tic.Ltd.Şti Ankara Üniversitesi, 2. Baskı,2007.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Am Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *J Clin Pathol*. 1966; 45(4):493-6.
- Bert F, Picard B, Branger C and Lambert-Zechovsky N. Analysis of genetic relationships among strains of groups A, C and G streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis *J Med Microbiol*. 1996; 45: 278-284.
- Bisharat N, Crook DW, Leigh J, Harding RM, Ward PN, Coffey TJ, Maiden MC, Peto T and Jones N. Hyperinvasive neonatal group B *Streptococcus* has arisen from a bovine ancestor. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 2161-2167.
- Bogni C, Odierno L, Raspanti C, Giraudo J, Larriestra, A, Reinoso, E, Lasagno M, Ferrari M, Ducrós E, Frigerio C, Bettera S, Pellegrino, M, Frola I, Dieser S and Vissio C. War against mastitis: Current concepts on controlling bovine mastitis

- pathogens. In: Mendez-Vilas A (ed). Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances. Singapore: World Scientific, 2011; 483–94.
- Botrel MA, Haenni M, Morignat E, Sulpice P, Madec JY and Calavas D. Distribution and Antimicrobial Resistance of Clinical and Subclinical Mastitis Pathogens in Dairy Cows in Rhône-Alpes, France. Foodborne Pathogens and Disease 2010; 7(5):479-487.
- Bradley A. Bovine mastitis: an evolving disease. The Vet J. 2002; 164, 116-128.
- Brubaker RR. Mechanisms of bacterial virulence. Ann Rev Microbiol 1985; 39: 21-50.
- Calvinho LF, Almeida RA, Oliver SP. Potential virulence factors of *Streptococcus dysgalactiae* associated with bovine mastitis. Vet. Microbiol 1998; 61: 93-110.
- Ceniti C, Britti D, Santoro AML, Musarella R, Ciambrone L, Casalnuovo F and Costanzo N. Phenotypic antimicrobial resistance profile of isolates causing clinical mastitis in dairy animals. Italian Journal of Food Safety 2017; 6:6612.
- Cleary P and Cheng Q. Medically Important Beta-Hemolytic Streptococci. Prokaryotes, 2006; 4: 108-148.
- Coffey TJ, Pullinger GD, Urwin R, Jolley KA, Wilson SM, Maiden MC, Leigh JA. First insights into the evolution of *Streptococcus uberis*: a multilocus sequence typing scheme that enables investigation of its population biology. Appl Environ Microbiol 2006;72(2): 1420-1428.
- Costerton JW, Cheng K J, Geesey GG, Ladd TT, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ Bacterial biofilms in nature and disease. Annu Rev Microbiol 1987 41: 435-464.
- Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. Sci Am 1978; 238: 86-95.
- Costerton JW, Steward PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. Science, 1999; 284: 13-18.
- Courtney HS, von Hunolstein C, Dale JB, Bronze MS, Beachey EH, Hasty DL. Lipoteichoic acid and M protein: dual adhesins of group A streptococci. Microb Pathog 1992; 12: 199-208.
- Çiçek E. Aydın İlinde Bulunan Sığır Çiftliklerinde *Streptococcus uberis* Kökenli Mastitislerin ve Virulans Genlerinin Multiplex Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Mpcr) İle Belirlenmesi. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü, Aydın, Yüksek Lisans Tezi, 2014; 1-28.

- Çiftci A, Fındık A, İça T, Baş B, Onuk EE, Güngördü S. Slime Production and Antibiotic Resistance of *Enterococcus faecalis* Isolated from Arthritis in Chickens. J Vet Med Sci 2009; 71(6): 849-853.
- Dimitriev A, Bhide M, Mikula, I. cpn60 gene based M-PCR assay for simultaneous identification of streptococcal species. Acta Vet BRNO 2006; 75: 235- 240.
- Dimitriev A, Suvorov A, Shen AD, Yang YH. Clinical diagnosis of group B streptococci by *scpB* gene based PCR. Indian J Med Res 2004; 119 (Suppl): 233-236.
- Dimitriev A, Shakleina E, Tkáčiková L, Mikula I, Totolian A. Genetic heterogeneity of the pathogenic potentials of human and bovine group B streptococci. Folia Microbiol (Praha) 2002; 47(3):291-295.
- Ding Y, Junli Z, Xiuling H, Man L, Guan H, Zhang Z, Peifeng L. Antimicrobial resistance and virulence-related genes of *Streptococcus* obtained from dairy cows with mastitis in Inner Mongolia, China. Pharm Biol 2016; 54(1): 162-167.
- Duarte CM, Freitas PP, Bexiga R. Technological advances in bovine mastitis diagnosis: an overview. J Vet Diagn Invest 2015; 27(6): 665-672.
- Duarte RS, Rosana RB, Facklam RR, Teixeira LM. Phenotypic and Genotypic Characteristics of *Streptococcus porcinus* Isolated from Human Sources. J. Clin. Microbiol. 2005; 43(9): 4592-4601.
- Ekin İH, Gürtürk K. İneklerde subklinik mastitis olgularından izole edilen streptokokların sero gruplandırılması ve çeşitli biyokimyasal özellikleri üzerine araştırmalar. YYÜ Sağ Bil Ens Derg 1998; 4 (1-2): 21-27.
- Eldesouky IE, Refae MAAE, Nada HS, Elnaby GRH. Molecular Detection of *Streptococcus* species Isolated from Cows with Mastitis. World Vet J 2016; 6(4): 193-202.
- Facklam R. What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. Clin Microbiol Rev 2002; 15(4): 613-630.
- Filippesen LF, Valentin-Weigand P, Blobel H, Preissner KT, Chhatwal GS. Role of complement S protein (vitronectin) in adherence of *Streptococcus dysgalactiae* to bovine epithelial cells. Am J Vet Res 1990; 51: 861-865.
- Franken C, Haase G, Brandt C, Weber-Heynemann J, Martin S, Lammeler C, Podbielski A, Lütticken R, Spellerberg B. Horizontal gene transfer and host specificity of

- beta-haemolytic Streptococci: The role of a putative composite transposon containing scpB and lmb. Mol Microbiol 2001; 41:925-35.
- Frost AJ, Wanasinghe DD, Woolcock JB. Some factors affecting selective adherence of microorganisms in the bovine mammary gland. Infect Immun 1977; 15: 245-253.
- Garcia A. Contagious vs. Environmental Mastitis. 2004
<http://www.dairyweb.ca/Resources/USWebDocs/MastitisPathogens.pdf>
- Garvie E.I, Farrow JAE, Bramley AJ. Streptococcus dysgalactiae (Diernhofer) nom. rev.. Int J Syst Bact 1983; 33: 404-405.
- Genç, F. Subklinik mastitisli sığırlardan Staphylococcus aureus, Streptococcus uberis ve Streptococcus dysgalactiae etkenlerinin izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü, Aydın, Yüksek Lisans Tezi, 2015.
- Gilbert FB, Fromageau A, Lamoureux J, Poutrel B. Evaluation of tandem repeats for MLVA typing of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis. BMC Veterinary Research 2006;2: 33-41.
- Grundmann H, Hori S, Tanner G. Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. J Clin Microbiol 2001;39:4190-4192.
- Gudding R, McDonald JS, Cheville NF. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* mastitis: bacteriologic, histologic, and ultrastructural pathologic findings. Am J Vet Res 1984; 45: 2525-2531.
- Gürtürk K, Boynukara B, Ekin İH, Gülhan T. Van ve Yöresindeki İneklerde Subklinik Mastitisin Etiyolojisi Üzerine Bir Çalışma. Y.Y.Ü. Vet Fak Derg 1998; 9(1-2):1-4.
- Haenni M, Galofaro L, Ythier M, Giddey M, Majcherczyk P, Moreillon P, Madec JY. Penicillin-binding protein gene alterations in *Streptococcus uberis* isolates presenting decreased susceptibility to penicillin. Antimicrob Agents Chemother 2010 ;54: 1140-1145.
- Hayman EG, Pierschbacher MD, Oehgren Y, Ruoslahti E. Serum spreading factor (vitronectin) is present at the cell surface and in tissues. Proc Natl Acad Sci USA. 1983;80: 4003-4007.

- Hoyle BD, Costerton JW. Bacterial resistance to antibiotics: The role of biofilms. *Progress Drug Rev* 1991; 37: 91-105.
- Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 1988; 26:2465-2466.
- Jain B, Tewari A, Bhandari BB, Jhala MK. Antibiotic resistance and virulence genes in *Streptococcus agalactiae* isolated from cases of bovine subclinical mastitis. *Vet Arhiv* 2012; 82:423–432.
- Jayarao BM, Gillespie BE, Oliver SP. Application of Randomly Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting for Species Identification of Bacteria Isolated from Bovine Milk. *Journal of Food Protection* 1996; 59(6): 615-620.
- Johnsen LB, Poulsen K, Kilian M, Petersen P. Purification and cloning of a streptokinase from *Streptococcus uberis*. *Infect Immun* 1999; 67: 1072-1078.
- Jonsson H, Frykberg L, RantamaÈki L, Guss B. MAG, a novel plasma protein receptor from *Streptococcus dysgalactiae*. *Gene*. 1994(a);143, 85±89.
- Jonsson H, MuÈller HP. The type-III Fc receptor from *Streptococcus dysgalactiae* is also an a2-macroglobulin receptor. *Eur. J. Biochem*. 1994(b);220, 819±826.
- Kehoe MA. Cell-wall associated proteins in Gram-positive bacteria. In: Ghuysen J-M, Hakenbeck R editors. *Bacterial cell wall*. Elsevier Science B.V., Amsterdam 1994; pp. 217-261.
- Kia G, Mehdi G, Keyvan R. Prevalence and antibiotic susceptibility of streptococcus spp. in cows with mastitis in Germi, Iran. *Animal and Veterinary Sciences* 2014;2(2): 31-35.
- Koskinen MT, Wellenberg GJ, Sampimon OC, Holopainen J, Rothkamp A, Salmikivi L, van-Haeringen WA, Lam TJ, Pyorala S. Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *J Dairy Sci* 2010; 93: 5707-5715.
- Krishnaveni N, Isloor SK, Hegde R, Suryanarayanan VVS, Rathnma D, Veeregowda BM, Nagaraja CS and Sundareshan S. Rapid detection of virulence associated genes in Streptococcal isolates from bovine mastitis. *Afr J Microbiol Res* 2014; 8(22): 2245-2254.

- Kuyucuoğlu Y, Uçar M. Afyon bölgesi süt ineklerinde subklinik ve klinik mastitislerin görölme oranları ve etkili antibiyotiklerin tespiti. Vet Hek Mikrobiyol Derg 2001;1: 19-24.
- LaÈmmmler C, Frede C. Binding of immunoglobulin G and albumin to *Streptococcus dysgalactiae*. Zbl.Bakt. 1989;271, 321±329.
- Lasagno MC, Reinoso EB, Diesser SA, Calvinho LF, Buzzola F, Vissio C, Bogni CI, Odierno LM. Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine subclinical mastitis in Argentinean dairy farms. Revista Argentina de Microbiología 2011; 43: 212-217.
- Leigh JA, Field TR, Williams MR. Two strains of *Streptococcus uberis*, of differing ability to cause clinical mastitis, differ in their ability to resist some host defense factors. Res Vet Sci 1990; 49: 85-87.
- Leigh JA. Activation of bovine plasminogen by *Streptococcus uberis*. FEMS Microbiol Lett 1993; 114: 67-72.
- Leigh JA. Purification of a plasminogen activator from *Streptococcus uberis*. FEMS Microbiol Lett 1994; 118: 153-158.
- Lindahl G, Ihammar-Carlemalm MS, Areschoug T. Surface Proteins of *Streptococcus agalactiae* and Related Proteins in Other Bacterial Pathogens. Clin Microbiol Rev 2005; 18(1): 102–127.
- Lindeman CJ, Portis E, Johansen L, Mullins LM, Stoltman GA. Susceptibility to antimicrobial agents among bovine mastitis pathogens isolated from North American dairy cattle, 2002–2010. J Vet Diagn Invest 2013 25: 581-591. doi:10.1177/1040638713498085
- Lindgren PE, McGavin MJ, SignaÈs C, Guss B, Gurusiddappa S, HoÈoÈk M, Lindberg M. Two different genes coding for fibronectin-binding proteins from *Streptococcus dysgalactiae*. Eur J Biochem 1993; 214: 819-827.
- Lindgren, PE, Speziale P, McGavin M, Monstein HJ, HoÈoÈk M, Visai L, Kostianen T, Bozzini S, Lindberg M. Cloning and expression of two different genes from *Streptococcus dysgalactiae* encoding fibronectin receptors. J Biol Chem 1992; 267: 1924-1931.
- Macun HC, Pir Yağcı İ, Ünal N, Kalender H, Sakarya F, Yıldırım M. Kırıkkale'de

- Belirlenen Subklinik Mastitisli İneklerde Etken İzolasyonu ve Antibiyotik Direnç Durumu. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2011; 8(2): 83-89.
- Mamo W, Froeman G, Sundas G, Wadstroem T. Binding of fibronectin, fibrinogen and collagen II to streptococci isolated from bovine mastitis. Microb Pathogen 1987; 2: 417-442.
- Markey BK, Leonard FC, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. Mastitis. In: Edwards R and Hewat C. Clinical Veterinary Microbiology. 2nd Ed., Mosby Elsevier. 2013; 433-453.
- Martinez G, Harel J, Higgins R, Lacouture S, Daignault D, Gottschalk M. Characterization of *Streptococcus agalactiae* Isolates of Bovine and Human Origin by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. J Clin Microbiol 2000; 38(1): 71-78.
- Matthews KR, Oliver SP. Encapsulation of streptococci isolated from bovine milk. J Vet Med B 1993; 40: 597-602.
- McAllister TA, Yanke LJ, Inglis GD, Olson ME. Is antibiotic use in dairy cattle causing antibiotic resistance? Adv Dairy Technol 2001;13:229-247.
- McCoy HE, Broder CC, Lottenberg R. Streptokinases produced by pathogenic group C streptococci demonstrate species-specific plasminogen activation. J Infect Dis 1991;164: 515-521.
- McDonald WL, Fry BN, Deighton MA. Veterinary Identification of *Streptococcus* spp. causing bovine mastitis by PCR-RFLP of 16S-23S ribosomal DNA. Microbiology 2005; 111: 241-246.
- McDougall S, Hussein H, Petrovski K. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* from dairy cows with mastitis. N Z Vet J 2014; 62: 68-76.
- Moatamedi H, Seyfiabad SM, Ghorbanpoor M, Jamshidian M, Gooraninejad SA. Polymerase chain reaction based study on the subclinical mastitis caused by *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae* and *S. uberis* in cattle in Ahvaz. Iranian J Vet Res 2007; 8(3): 260-265.
- Moliva MV, Cerioli F, Reinoso EB. Evaluation of environmental and nutritional factors and sua gene on in vitro biofilm formation of *Streptococcus uberis* isolates. Microbial Pathogenesis 2017; 107: 144-148.

- Momtaz H, Mahvash MSC, Soleimani R, Jazayeri A. Prevalence of Virulence Factors and Antimicrobial Resistance of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis* in Ruminant Sub-clinical Mastitic Milk in Iran. *International Journal of Medical Laboratory* 2017;4(1):34-47.
- Mueller H-P, Blobel H. Absorption of human α 2-macroglobulin with selected strains of streptococci. *Med Microbiol Immunol* 1983;172: 33-39.
- Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. Streptococcus Adherence and Colonization. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009; 73(3): 407-450.
- Oliver SP, Gillespie BE, Jayarao BM. Detection of new and persistent *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* intramammary infections by polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 160:69–73.
- Paape MJ, Capuco AV, Guidry AJ, Burvenich C. Morphology, function and adaptation of mammary cells in normal and disease states. *J Anim Sci* 1995; 73(Suppl.2): 1-17.
- Pattison IH. Studies on experimental streptococcal mastitis. V. Histological findings in experimental streptococcal mastitis in the goat. *J Comp Pathol* 1951; 61: 71-87.
- Petrovski K, Grinberg A, Williamson N, Abdalla M, Lopez-Villalobos N, Parkinson T, Tucker IG, Rapnicki P. Susceptibility to antimicrobials of mastitis-causing *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Str. dysgalactiae* from New Zealand and the USA as assessed by the disk diffusion test. *Aust Vet J* 2015; 93: 227-233.
- Phuektes P, Mansell PD, Browning GF. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis. *J Dairy Sci* 2001; 84:1140-1148.
- Pol M, Ruegg PL. Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of gram-positive mastitis pathogens. *J Dairy Sci* 2007; 90:262-273.
- Preissner KT, Wassmuth R, Mueller-Berghaus, G. Physicochemical characterization of human S-protein and its function in the blood coagulation system. *Biochem J* 1985; 231: 349-355.
- İkiz S, Başaran B, Bingöl EB, Çetin Ö, Kaşıkçı G, Özgür NY, Uçmak M, Yılmaz Ö,

- Gündüz MC, Sabuncu A. Presence and antibiotic susceptibility patterns of contagious mastitis agents (*Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*) isolated from milks of dairy cows with subclinical mastitis. *Turk J Vet Anim Sci.* 2013; 37: 569-574
- Raemy A, Meylan M, Casati S, Gaia V, Berchtold B, Boss R, Wyder A, Graber HU. Phenotypic and genotypic identification of streptococci and related bacteria isolated from bovine intramammary infections. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2013; 55: 53-61.
- Rantamaeki LK, Mueller H-P. Isolation and characterization of α 2-macroglobulin from mastitis milk. *J Dairy Res* 1992; 59: 273-285.
- Rantamaeki LK, Mueller H-P. Phenotypic characterization of *Streptococcus dysgalactiae* isolates from bovine mastitis by their binding to host derived proteins. *Vet Microbiol* 1995; 46: 415-426.
- Reinoso EB, Lasagno MC, Dieser SA, Liliana M. Distribution of virulence-associated genes in *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis. *FEMS Microbiology Letters* 2011; 318: 183-188.
- Riffon R, Sayasith K, Khalil H, Dubreuil P, Drolet M, Lagace J. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2001;39, 2584-2589.
- Rossini R, Margarit I. Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: Influence of environmental conditions and implicated virulence factors. *Front Cell Infect Microbiol* 2015; 5 (6): 1-4.
- Schroeder JW. Mastitis Control Programs: Bovine Mastitis and Milking Management. 2009. [online]. Fargo: North Dakota State University Agriculture and University Extension. Available from: <http://www.ag.ndsu.edu/pubs/ansci/dairy/as1129w.htm>.
- Sherman M. Streptococci. *Bacteriol Rev* 1937;1(1): 3-97.
- Shome BR, Bhuvana M, Mitra SD, Krithiga N, Shome R, Velu D, Banerjee A, Barbuddhe SB, Prabhudas K, Rahman, H. Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis* isolates from bovine milk. *Trop Anim Health Prod* 2012; 44(8): 1981-1992.
- Shome BR, Bhuvana M, Mitra SD, Shome R, Velu D, Banerjee A, Barbuddhe SB,

- Prabhudas K, Rahman H. Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis* isolates from bovine milk. *Trop Anim Health Prod* 2012; 44:1981-92.
- Shome BR, Das Mitra S, Bhuvana M, Krithiga N, Velu D, Shome R, Isloor S, Barbuddhe SB, Rahman H. Multiplex PCR assay for species identification of bovine mastitis pathogens. *J Appl Microbiol* 2011;111(6):1349-56.
- Shottmuller H. Die Artunterscheidung der für den menschen Pathogen Streptokokken durch Blutagar. *Munch Med Wochenschr* 1903; 50: 849-853.
- Simpson, WA, Dale JB, Beachey EH. Cytotoxicity of the glycolipid region of streptococcal lipoteichoic acid for cultures of human heart cells. *J Lab Clin Med* 1982; 99: 118-126.
- Sting R, Schaufuss P, Blobel H. Isolation and characterization of hyaluronidase from *Streptococcus dysgalactiae*, *S. zooepidemicus* and *S. equi*. *Zbl Bakt* 1990; 272, 276±282.
- Suntharalingam P, Cvitkovitch DG. Quorum sensing in streptococcal biofilm formation. *Trends Microbiol* 2005; 13 (1): 3-6.
- Suriyasathaporn W, Chupia V, Sing-Lah T, Wongsawan K, Mektrirat R, Chaisri W. Increases of Antibiotic Resistance in Excessive Use of Antibiotics in Smallholder Dairy Farms in Northern Thailand. *Asian-Aust J Anim Sci.* 2012; 25(9): 1322-1328.
- Tel OY, Keskin O, Zonturlu AK, Arserim Kaya NB. Şanlıurfa yöresinde subklinik mastitislerin görülme oranı, aerobik bakteri izolasyonu ve duyarlı antibiyotiklerin belirlenmesi. *FÜ Sağ Bil Vet Derg.* 2009;23(2): 101-106.
- Thomas LH, Leigh JA, Bland AP, Cook, RS. Adherence and colonization by bacterial pathogens in explant cultures of bovine mammary tissue. *Vet Res Comm* 1992;16: 87-96.
- Thomas V, de Jong A, Moyaert H, Simjee S, El Garch F, Morrissey I, Marion H, Valle M. Antimicrobial susceptibility monitoring of mastitis pathogens isolated from acute cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. *Int J Antimicrob Agents* 2015; 46: 13-20.
- Timoney JF. *Streptococcus*. In: Giles CL, Thoen, C.O. editors. *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 2nd. ed. Iowa State University Press, Ames, 1993; 3-20.

- Traore MY, Valentin-Weigand P, Chhatwal GS, Blobel H. Inhibitory effect of fibrinogen on phagocytic killing of streptococcal isolates from humans, cattle and horses. *Vet Microbiol* 1991;28: 295-302.
- Türütoğlu H, Ateşoğlu A, Salihoğlu H, Öztürk M. Marmara bölgesi süt ineklerinde mastitise neden olan aerobik etkenler. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg* 1995; 26: 125-137.
- Ullberg M, Kronvall G, Wiman B. New receptor for human plasminogen on gram positive cocci. *APMIS* 1989; 97: 996-1002.
- Valentin-Weigand P, Chhatwal GS, Blobel H. Adherence of streptococcal isolates from cattle and horses to their respective host epithelial cells. *Am J Vet Res* 1988; 49: 1485-1488.
- Valentin-Weigand P, Traore MY, Blobel H, Chhatwal GS. Role of α -macroglobulin in phagocytosis of group A and C streptococci. *FEMS Microbiol Lett* 1990; 70: 321-324.
- Vandamme P, Pot B, Falsen E, Kersters K, Devriese LA. Taxonomic studies of Lancefield streptococcal groups C, G, and L (*Streptococcus dysgalactiae*) and proposal of *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* subsp. nov.. *Int J Syst Bacteriol* 1996; 46: 774-781.
- Varhimo E. Inducible mutagenesis and biofilm formation in *Streptococcus uberis*. Academic dissertation 2011 Department of Veterinary Biosciences, Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki, Finland.
- Vasanthakumari R. Streptococcus. In: *Textbook of Microbiology*. BI Publications Pvt Ltd. 2007; 191-201.
- Vural R, Ergün Y, Özenç E. Büyük Ruminantlarda Mastitis. In: Kaymaz M, Fındık M, Rişvanlı A ve Köker A, editörler. *Evcil Hayvanlarda Meme Hastalıkları*. 1. Baskı, Malatya, Medipres. 2002; 149-259.
- Wanasinghe DD. Adherence as a prerequisite for infection of the bovine mammary gland by bacteria. *Acta Vet Scand* 1981 22: 109-117.
- Yadav R, Kumar A, Sharma A, Goel P, Sindhu N, Jhambh R. PCR Assay for the Detection of *Streptococcus* spp. in Buffalo Milk. *Haryana Vet* 2014; 53(2): 121-123.
- Zadoks RN, Allore HG, Barkema HW, Sampimon OC, Wellenberg GJ, Grohn YT, Schukken YH. Cow and quarter-level risk factors for *Streptococcus uberis* and

- Staphylococcus aureus mastitis*. Journal of Dairy Science 2001; 84: 2649-2663.
- Zadoks RN, Middleton JR, McDougall S, Katholm J, Schukken YH. Molecular Epidemiology of Mastitis Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to Humans. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2011;16:357–372.
- Zadoks RN, Schukken YH, Wiedmann M. Multilocus sequence typing of *Streptococcus uberis* provides sensitive and epidemiologically relevant subtype information and reveals positive selection in the virulence gene pauA. J Clin Microbiol 2005; 43(5): 2407-2417.
- Zadoks RN. Molecular and mathematical epidemiology of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* mastitis in dairy herds. PhD Thesis. Utrecht University, Utrecht, the Netherlands. 2002.
- Zhang S, Piepers S, Shan R, Cai L, Mao S, Zou J, Ali T, De Vlieghe S, Han B. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance profiles in *Streptococcus dysgalactiae* isolated from bovine clinical mastitis in 5 provinces of China. Journal of Dairy Science 2018; 101(4): 3344-3355.