

SUBKLİNİK MASTİTİSLERİN SAĞALTIMLARINDA DIMETHYL SULFOXİD (DMSO)'İN TAŞIYICI MADDE OLARAK KULLANILMASI ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

Levent KESKİNTEPE⁽¹⁾ Rifat VURAL⁽²⁾ Jale ERDEĞER⁽³⁾

Saffet SARAÇ⁽⁴⁾ Çetin KILIÇOĞLU⁽⁵⁾

**Studies on the use of DMSO as a carrier in the treatment of
subclinical mastitis.**

S U M M A R Y

In this study, the relative efficiency of various antibiotics that were dissolved in % 90 Dimethyl Sulfoxid (DMSO) for intramammary infusion on lactating cows with subclinical mastitis was investigated. A total of 69 different breeds milking cows in a state farm were subjected to routine test, using California mastitis test (CMT) method. 37 quarters were found infected with subclinical mastitis. Individual quarter milk samples were collected from infected quarters for bacteriological examination. Pathogenic bacterias were isolated from milk samples. To determine sensitivity the isolated strains of these pathogenic bacterias were tested by using several antibiotics this diffusion method. Each cow treated twice with 48h interval. Criteria for therapy was freedom from pathogenic bacteria as shown by once taken milk samples, on ten days following last treatment.

According to the results obtained that the milk avarage cure rate of Staphylococcus spp. infection was % 76.9 and of Streptococcus spp. infection was % 81.08.

These results show that the use of DMSO as penetrant carrier of antibiotics in treatment of subclinical mastitis may increase the effectiveness of therapy and may prevent the spread of mastitis and may be economic than the other treatment methods.

-
1. Arş. Grv., A.Ü. Vet. Fak. Doğum ve Rep. Hast. B. Dalı, Ankara
 2. Arş. Grv., Dr., A.Ü. Vet. Fak. Doğum ve Rep. Hast. B. Dalı, Ankara
 3. Arş. Grv., Dr., A.Ü. Vet. Fak. Bakteriyoloji B. Dalı, Ankara
 4. Vet. Hekim., Şeker Fabrikaları Çiftliği, Ankara
 5. Prof. Dr., A.Ü. Vet. Fak. Doğum ve Rep. Hast. B. Dalı, Ankara

Ö Z E T

Bu çalışmada, laktasyondaki subklinik mastitisli ineklere meme içi % 90 DMSO'da çözülen antibiyotik uygulamalarının etkinliği araştırıldı. Değişik ırklardan 69 adet ineğe CMT uygulandı. Bunlardan 37 meme lobu enfekte bulundu. Herbir meme lobundan bakteriyolojik muayene için süt örnekleri alındı. Çalışmaya alınan tüm inekler antibiyogram sonucuna göre, antibiyotik + % 90 DMSO ile 48 saat aralıkla iki defa tedavi edildi. Sağaltım sonuçları son tedaviyi izleyen 10. günde alınan süt örneklerinde patojenik bakterilerin olup olmadığına göre değerlendirildi.

Yapılan tedaviye göre stafilokok enfeksiyonlarında % 76.9 ve streptokok enfeksiyonlarında % 81.08 oranında bir iyileşme gözlemlendi.

Bu sonuçlar, subklinik mastitislerin tedavisinde taşıyıcı olarak DMSO'nun kullanımının tedavinin etkinliğini artırabileceğini, mastitisin yayılmasını önleyebileceğini, ve diğer tedavi metotlarından daha ekonomik olabileceğini göstermiştir.

G İ R İ Ş

Mastitis, iritan etkilere karşı meme bezinin tepkisi olarak tanımlanıp çeşitli şekillerde sınıflandırılabilirler. Bu ayrım yangı belirtilerinin bulunup bulunmadığına (klinik, subklinik) ve hastalığı oluşturan etkenlere göre yapılmaktadır (9). Subklinik mastitisler, belirgin bir lokal ve sistemik belde göstermeksizin ortaya çıkan, giderek meme dokusunun yıkımına ve fibrosisine neden olan mastitislerdir. Gizli seyreden bu mastitislerde çoğunlukla memede ve sütte fiziksel bir değişim hissedilmez. Bu nedenle subklinik mastitisler kolaylıkla hayvandan hayvana geçip meme loblarının süt üretimini azaltmakta ve hemde süütün bileşimini bozarak kısa sürede yetiştirmedeki tüm ineklerin elden çıkmasına neden olmaktadır. Hastalık ancak polimorf çekirdekli lökositlerin sayımı ve California mastitis testi (CMT) ile düzenli kontrol edilen işletmelerde yapılan taramalar ve bakteriyolojik yoklamalar sonucu saptanabilmektedir.

Subklinik mastitislerin sağaltımları amacı ile değişik kemoterapotikler ve yöntemler önerilmektedir. Fakat istenilen sonuçlar çeşitli nedenlerden ötürü sağlanamamaktadır. Ziv Silberman (1) bu başarısızlıkları çoğunlukla, kullanılan antibiyotiklere bağlı olarak oluşan dirençli suşlar ile mikroorganizmaların yerleştiği lezyonlu bölgelerin tümünde yüksek konsantrasyona erişecek meme içi verilen antibiyotikli maddelerin yeterli olmamasına bağlamıştır.

Meme içi uygulamalar için amaçlanan mastitis ilaçlarında antibiyotiklerin taşınmasında kullanılan belirgin taşıt maddelerinin veya solventlerinin

özel bir önemi vardır. Yaygın kullanım alanı olmasada DMSO'in biyolojik bariyerlerce geçirgen olması nedeniyle zaman zaman bazı araştırmacılarca antibiyotiklerle taşıyıcı madde olarak kullanılmıştır (13,15). DMSO ilk kez 1866 yılında Alexander Saylzeff tarafından hazırlanmıştır (14). Günümüzde ise Avrupa'da kömür ve petrolden elde edilmektedir (8). Saf DMSO'nun yüksek konsantrasyonları veya saflaştırılmış örnekleri buzdolabında donar (10). Saf DMSO, berrak, 18.5°C'de donan, sarımsak renkte bir maddedir (4,5,10). DMSO birçok madde için sudan daha iyi bir çözücüdür. Birçok proteinler ve steroidler DMSO'da çözülür. Çoğunluğu lipoprotein yapısındaki biyolojik bariyerler DMSO için geçirendir. DMSO bu geçişinde bariyerde herhangi bir değişikliğe ve yıkımlanmaya yol açmaz (3,4,5,10).

DMSO'nun absorpsiyon, taşıyıcılık, çeşitli enzimlerin inhibisyonu ve aktivasyonunun yanısıra invitro % 5 ve % 50 konsantrasyonlarda bakteriyostatik veya M.tuberculosis, staphylococcus spp., streptococcus spp., salmonella spp., E.coli gibi birçok patojene karşı bakterisidal etkiye sahiptir (3). DMSO'nun antimikrobiyal fonksiyonunun mekanizması tam olarak açıklanamamakla birlikte immün sistem üzerindeki etkinliği ve doku yıkımlanmasına neden olan endotoksinin etkinliğinin azaltılması ile olduğu tahmin edilmektedir (3). Aynı zamanda DMSO yangıda doku yıkımlanmasını azaltarak mikrosirkülasyonun devam ettirilmesi ve özellikle kronik olgularda fibroblast proliferasyonunu azaltarak antiinflamatuvar bir etkide göstermektedir (3).

DMSO hücre seviyesinde steroidlerle sinerjik etkiye sahiptir. Yine antibiyotiklerle birlikte kullanıldıklarında sağladıkları lokal dilatasyon ve antiinflamatuvar etkileri ile antibiyotiğin etkinliğini artırır.

DMSO'nun sistemik etkisi ve toksisitesi nisbeten düşük olup lokal toksisitesi doza, uygulama yoluna ve bireylere bağlıdır.

DMSO diğer terapötik ajanlarla kullanıldığında onların toksisitelerini artırdığı ve hatta tehlikeli olabileceği gösterilmektedir. Yalnız, DMSO ile kombine edilen antibiyotiklerin lokal uygulamalarda oldukça düşük toksisiteye sahip olduğu bildirilmektedir (3).

Ziv Silberman (16) Staphylococcus aureus saptanan kronik mastitisli 178 sağmal ve kurudaki ineklere antibiyotikleri değişik taşıyıcılarla (distile su, yağ, DMSO) vermiş ve en iyi sonucu kuruda % 87.7 ve laktasyonda % 64.3 oranıyla DMSO taşıyıcı maddede almıştır. Ziv Silberman (17) koyunlarda yaptığı diğer bir çalışmada %90'lık DMSO'nun antibiyotiği fibrotik ve damarsız sahanın içine taşıdığını ve etkin olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada, DMSO'nun yukarıda belirtilen özellikleri göz önünde tutularak çeşitli antibiyotiklerin DMSO taşıyıcı maddesinde çözündürülüp meme içi uygulamalarında subklinik mastitisler üzerinde gösterecekleri etkinliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Deneme hayvanları : Bu çalışmada, 37 meme lobu enfekte 18 holsteyn, 8 montofon ırkı inek kullanıldı. Denemede kullanılan ineklerin hepsi Şeker Fabrikaları A.Ş. Ankara Şeker Fabrikası Çiftliği'nden, California Mastitis Test (CMT) ve bakteriyolojik muayenelerde pozitif sonuç veren hayvanlardan seçildi. Seçilen hayvanların ortalama günlük süt miktarı 10/15 kg, ortalama yaşı 7 ve ortalama laktasyonları 4 olarak saptandı.

Süt örneklerinin toplanması : Süt örnekleri sabah sağımından önce meme başları iyice dezenfekte edilip bir miktar süt ayrı bir kaba sağıldıktan sonra steril bir tüpe 10 cc kadar alındı. Süt örnekleri mikrobiyolojik yoklamalar için portatif termosla laboratuvara gönderildi.

Besiyerleri : Streptokokal ve stafilokok mastitise neden olan etkenlerin izolasyonu ve identifikasyonları amacıyla zenginleştirilmiş kanlı agar, nutrient buyyon, serumlu buyyon, Edward's besiyeri, sodyum hippuratlı ve O/F besiyeri kullanıldı. Ayrıca, antibiyotik duyarlılık testlerini uygulamak için Mueller/Hinton agar (Oxoid) ve kanlı agardan faydalanıldı.

Standart suş : Str.agalactia suşu CAMP testinde kullanılmak üzere Bakteriyoloji Bilim Dalı suş koleksiyonundan alındı.

Tavşan plazması : Koagulaz oluşturan stafilokokların identifikasyonunda kullanıldı.

Antibiyotik diskleri : Antibiyotik duyarlılık testlerinde Oxoid disklerinden yararlanıldı.

İzolasyon ve identifikasyon : Steril tüpler içine aseptik koşullarda alınan ve soğuk ortamda laboratuvara ulaştırılan süt örnekleri homojenize edilerek bir öze dolusu kanlı agara ekilip 37°C'de 24/48 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda, büyüklük durumları değerlendirilerek stafilokok ve streptokok kolonileri ayırt edilip gram boyama yöntemi ile hazırlanan preparatlar incelendi. İzole edilen stafilokok kolonilerinden tek koloni, nutrient buyyona, streptokoklardan ise serumlu buyyona ekimler yapılarak 37°C'lik etüvde 24/48 saat inkübe edildi. Stafilokokların identifikasyonları için koagulaz, katalaz, O/F testi, streptokokların identifikasyonu için CAMP testi, Eskülin deneyi, sodyum hippurat hidrolizasyonu, karbonhidrat fermentasyonu (sorbitol, inulin, trehaloz) ve hemoliz testlerinden yararlanıldı (1,7).

Antibiyotik duyarlılık testleri : Bu testler, stafilokoklar için Mueller Hinton agar, streptokoklar için ise kanlı agar besiyerleri kullanılarak Kirby/Bauer disk diffüzyon yöntemine göre yapıldı (2). Sonuçlar her disk için verilen standart (oxoid) zonlarla karşılaştırılarak değerlendirildi.

İlaç seçimi ve uygulanması : Oxytetracycline HCl 919.80 mcg/mg, Ampicilline Tryhydart 857.7 mcg/mg, Chloramphenicol 851.73 mcg/mg,

Procain penicilline G 2.250.000, Kristalize penicilline G potassium 750.000 IU., Streptomycine sülphate 2.0, antibiyotik duyarlılık testlerine göre seçildi. Seçilen bu antibiyotiklerden 1 gr alınarak 15 cc DMSO içinde eritilerek 20 cc'lik plastik enjektörle meme içersine, 48 saat aralıklarla iki kez kuralına uygun olarak verildi. Son uygulamadan 10 gün sonra bakteriyolojik muayene için ikinci defa süt numunesi alındı.

B U L G U L A R

Makina ile sağım yapılan Ankara Şeker Fabrikası Çiftliği'ndeki çalışmalar sonucu 116 inek klinik olarak muayene edilmiş olup bunlardan 56 ineğin 76 meme lobunda subklinik mastitisten şüphe edilerek bakteriyolojik incelemeler için süt örnekleri alındı. Bunlardan 56 ineğin 74 meme lobunda enfeksiyon etkeni üredi.

Bu araştırmaya enfeksiyon etkeni üreyen, subklinik mastitisli 26 inek ve 37 meme lobu alındı. Klinik muayenelerde 30 meme lobunda fibröz ürmeler saptanmış olup çalışmaya alınan meme loblarının tümünde CMT'ye duyarlılık gözlemlendi. 37 meme lobundan 26'sında stafilokokal enfeksiyon etkeni üreyip bunun 13'ü Staph.aureus, diğer 13'ü ise Staph.epidermis; 11'inde ise streptokokal enfeksiyon bulunup, 6'sı Str.agalactia, 4'ü Str.lactis, 1 tanesi de Str.faecalis olarak saptandı (Tablo-1).

Tablo-1 : Enfeksiyon etkenlerinin dağılım yüzdesi

ETKEN	MEME LOBU	YÜZDE ORANI
Stap.aureus	13	35.13
Staph.epidermidis	13	35.13
Str.agalactiae	6	16.21
Str.lactis	4	10.82
Str.faecalis	1	2.71
TOPLAM	37	100.00

Klinik ve laboratuvar uygulamaları ile tesbit edilen mastitis olaylarının meme loblarına dağılışı Tablo-2'de görüldüğü gibi % 32.4 oranında olmak üzere büyük çoğunlukla arka loblarda, daha azınlıkla olmak üzere de ön loblarda olduğu belirlendi.

Bakteriyolojik izolasyon ve identifikasyon çalışmaları sonucu elde edilen etkenler yapılan antibiyotik duyarlılık testleri ile Tablo-3'de verilen antibiyotikere duyarlı çıktı.

Tablo-2 : Mastitisin loblara göre dağılımı

MEME LOBU	İNEK SAYISI	YÜZDE ORANI
Sol ön	4	10.8
Sağ ön	9	24.4
Sol arka	12	32.4
Sağ arka	12	32.4

Tablo-3 : İzole edilen etkenlerin antibiyotiklere duyarlılıkları

ETKEN	Oksitetra- siklin	Kloram- fenikol	ampi- silin	Penisi- lin	Strepto- misin
Staph.aureus	4	7	1	1	-
Staph.epidermidis	6	3	1	1	2
Str.agalactiae	1	3	1	1	-
Str.lactis	2	-	-	2	-
Str.faecalis	1	-	-	-	-
TOPLAM	14	13	3	5	2

DMSO'da çözdürülen antibiyotiklerin meme içi enjeksiyonlarından yaklaşık bir saat sonra sarımsak kokusu başlayıp, altı saat sonra tamamen ortadan kalktı.

Bu çalışmada, sağaltıma alınan Staph.aureus ile enfekte 13 meme lobunun 10'unda, Staph.epidermis ile enfekte 13 meme lobunun 10'undan Str.agalactiae ile enfekte 6 meme lobunun 5'inden, Str.lactis ile enfekte 4 meme lobunun tamamından pozitif sonuç alınıp bunlar başarı oranları ile birlikte Tablo-4'de gösterildi.

Tablo-4 : Uygulanan tedavi sonucu elde edilen başarı yüzdesi

ETKEN	TOPLAM	POZİTİF	NEGATİF	BAŞARI YÜZDESİ
Staph.aureus	13	10	3	% 76.9
Staph.epidermis	13	10	3	% 76.9
Str.agalactiae	6	5	1	% 83.3
Str.lactis	4	4	-	% 100.0
Str.faecalis	1	1	-	% 100.0

T A R T I Ő M A

Subklinik mastitislerin antibiyotik tedavisinde etkin organizmaların in-vitro olarak belirli antibiyotiklere yüksek duyarlılık göstermelerine rağmen pratikte çoğunlukla zayıf sonuçlar alınmaktadır. Meme içi yolla verilen ilaçlar mikroorganizmaların lokalize oldukları esas meme kısımlarına (alveoiller) yeterli yoğunlukta ulaşamaz. Daha da ötesi ilaç dağılımı meme içi kullanılan taşıyıcı veya solventlerin yapısına ve miktarına bağlıdır (15,16,17).

İdeal bir taşıyıcının uygulanmadan hemen sonra antibiyotik ve mastitis oluşturan organizmaların arasında en yüksek yüzey teması sağlayan antibiyotik yoğunluğu oluşturacak bir madde olması gerektiği çeşitli araştırmalar tarafından açıklanmıştır (3,17). Böyle bir aracı madde meme dokularında etkin antibiyotik seviyesine ulaşmalıdır. Başarılı bir uygulamadan en az 12 saat sonra meme dokusundan antibiyotiği atabilme yeteneği önemli bir kriter olarak vurgulanmaktadır (17).

Ziv Silberman (17) Staph.aureus ile enfekte laktasyondaki 14 adet inekte % 90'lık DMSO ile % 64.3, yağda eriyen bir aracı madde ile % 16.3, suda eriyen bir aracı madde ile ise de % 44 oranında bir başarı elde etmiştir. Buna karşılık Storper ve ark. (13) 24 saat ara ile 3 kez Staph.aureus izole edilmiş subklinik mastitisli genç ineklerden (2/4. laktasyondaki ineklere) ampisilin ve kloksasilin kombinasyonu verilmesi ile % 39.6'lık bir başarı, yine aynı araştırmacılar, aynı kombinasyonun farklı konsantrasyonlarından % 64.1'lik bir başarı elde etmişlerdir. bu çalışma Storper ve arkadaşlarının sadece antibiyotik kombinasyonları ile 3 gün süreyle yaptığı uygulama ile karşılaştırıldığında hem ekonomik hem de tedavi başarısı açısından daha etkili bulunmuştur.

Enfeksiyon etkenlerinin,% 32.4 oranında arka loblarda görülmesi sağım makinasının dezenfeksiyonuna ve basıncına bağlı olarak şekillenmiş olabilir.

Bu çalışmada,taşıyıcı madde olarak kullanılan % 90'lık DMSO ile Staph.aureus için % 76.9, Staph.epidermis için % 76.9, Str.agalactia için % 83.3, Str.lactis için % 100, Str.feacalis için % 100'lük sağaltım oranları Ziv Silberma'nın bulguları ile paralellik gösterip bu DMSO'nun taşıt madde olarak antibiyotiği etkin yoğunlukta alveoler bölgeye taşımaya ve antimikrobiyal etkinliğine bağlanabilir.

Sonuç olarak, elde edilen bulgular, DMSO'nun subklinik mastitislerde etkin olarak kullanılabilceğini göstermiştir. Laktasyondaki hayvanların subklinik mastitislerinde etkin ve ekonomik olan bu kimyasal maddenin kliniklerde Veteriner Hekim'lerce uygulanması uygun bulunmuştur.

T E Ő E K K Ū R

Bu çalışmada kullanılan antibiyotikleri karşılayan Doğu İlaç Fabrikaları A.Ş. Müdürlüğü'ne teşekkür ederiz.

K A Y N A K L A R

- 1 - AKAY, Ö. ve AYDIN, N. (1984) : Stafilokokal mastitisler. 1. Mastitis Semineri, 15/16 Kasım, Ankara, 136/146.
- 2 - BAUER, A.V., KIRBY, W.M.M., SHERRIS, J.C. and TURC, M. (1966) : Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. J. Clin. Pathol., 45, 493-494.
- 3 - BRAYTON, C.F. (1986) : Dimethyl sulfoxide (DMSO). Cornell Vet., 76, 61-90.
- 4 - DAVID, N.A. (1972) : The pharmacology of dimethyl sulfoxide. Ann. Rev. Pharm., 12, 353-374.
- 5 - KHARASCH, N., THYAGARAJEN, B.J. (1983) : Structural basis for biological activities of dimethyl sulfoxide. Ann. N.Y. Acad. Sci. 411, 131-134.
- 6 - İZGÜR, H. (1980) : İneklerde subklinik mastitislerin sağaltımları üzerinde çalışmalar (doktora tezi). Ankara, 40 sayfa.
- 7 - İZGÜR, M. (1984) : Streptokokal mastitisler. I. mastitis Semineri, 15-16 Kasım, Ankara, 127-135.
- 8 - JACOB, S.W. and HERSCHLER, R. (1983) : Introductory remarks: Dimethyl sulphoxide after twenty years. Ann. N.Y. Acad. Sci., 411.
- 9 - KILIÇOĞLU, Ç. ve ALAÇAM, E. (1985) : Veteriner doğum bilgisi ve üreme organlarının hastalıkları. Teriogenoloji, Ankara, 378 sayfa.
- 10 - MACGREGOR, W.S. (1967) : The chemical and physical properties DMSO. Ann. N.Y. Acad. Sci., 141(1), 1-2.
- 11 - RAMMLER, D.H. and ZAFFARONI, T. (1967) : Biological implications of DMSO based on a review of its chemical properties. Ann. N.Y. Acad. Sci., 141, 13-23.
- 12 - SCHALM, O.W., CARROLL, E.S., JAIN, N.C. (1971) : Bovine mastitis. 238/239, Philadelphia.
- 13 - STORPER, M., BARMASHE, B., ZIV, G. and SARAN, A. (1981) : Experiment with three new intramammary antibiotics combination products for the treatment of subclinical mastitis in lactating cows. Refush Vet., 38 (4), 154-165.
- 14 - ŐENDİL, Ç. (1973) : Dimethyl sulfoxide (DMSO). Türk. Vet. Hek. Der. Derg. 43, 1/2, 28-30.
- 15 - TURNER, C.W. (1939) : The comparative anatomy of the mammary gland. Univ. Coop. Store, Columbia, Mo., USA.
- 16 - ZIV, SILBERMAN, G. (1967) : Diffusion in the udder of dyes and antibiotics dissolved in DMSO. Refuah Vet., 24, 237.
- 17 - ZIV SILBERMAN, G. (1967) : DMSO in the treatment of chronic mastitis. Vet. Rec., 81, 527-528.