

## İNEK MASTİTİSLERİNDEN İZOLE EDİLEN KOAGULAZ POZİTİF STAFİLOKOK SUŞLARININ PENİSİLİN DİRENCİ VE BAZI ANTİBİYOTİKLERE DUYARLILIKLARI

Uçkun Sait Uçan<sup>1</sup>@

Emine Aslan<sup>2</sup>

### Penicillin Resistance and Antimicrobial Susceptibilities of Coagulase Positive Staphylococci Isolated from Bovine Mastitic Milk Samples

**Özet:** Bu çalışmada Konya Bölgesinde mastitisli inek sütlerinden izole edilen 81 koagulaz pozitif Stafilocok suşunun koagulaz aktivitesi, β-laktamaz üretimi ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları incelendi. Tüm Stafilocok suşlarının 51'i (%63) β-laktamaz pozitif bulundu. Suşların 75'i (%92.6) *S.aureus*, 6'sı (%7.4) *S.intermedius* olarak tanımlandı. *S.aureus* suşlarının 49'u (%65.3) ve *S.intermedius* suşlarının 2'si (%33.3) β-laktamaz pozitif. Koagulaz pozitif suşların tümü aynı zamanda β-laktamaz pozitif. *S.aureus* suşlarından 8'i (%10.6) ve *S.intermedius* suşlarından 4'ü (%66.7) tüm antibiyotiklere duyarlı bulundu. Çalışmada 1 tane metisilin dirençli *S.aureus* tespit edildi. Tüm suşlar dikkate alındığında, en duyarlı bulunan antibiyotiğin danofloksasin (%100) olduğu ve duyarlılıklarına göre ampisilin+sulbaktam ile metisilin (%98.8), oksasilin ve amoksisilin+klavulanik asit (%97.5), kloksasin (%96.3), amoksisilin (%22.2) ve penisilin G (%14.8) şeklinde sıralandığı belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Antibiyotik Direnci, Beta Laktamaz, Mastitis, Stafilocok, İnek

**Summary:** Coagulase activity, Beta-lactamase production and antibiotic susceptibility of the Staphylococcus strains isolated from mastitic udders of cows from Konya District were evaluated in this study. Seventy five (92.6 %) *S.aureus* and 6 strains (7.4%) *S.intermedius* were identified. Of *S.aureus* strains, 49 (65.3%) were found to be β-lactamase positive. The corresponding value for the *S.intermedius* was 2 (33.3%). Eight (10.6%) of the *S.aureus* and 4 (66.7%) of the *S.intermedius* strains were observed to be susceptible to all antibiotics tested. One of the *S.aureus* strains was observed to have resistance to meticillin. All of the strains (100%) showed susceptibility to Danofloxacin. Degrees of the antibiotic susceptibility by the strains as follows: ampicillin+sulbactam and meticillin (98.8% each) oxacillin and amoxicillin+clavulanic acid (97.5% each), cloxacillin (96.3%), amoxicillin (22.2%) ve penicillin G (14.8%).

**Key Words:** Antibiotic Resistancy, Beta Lactamase, Mastitis, Staphylococcus, Cattle

### Giriş

Süt inekçiliğinin en önemli sorunlarından biri olan mastitis bir çok bakteriyel, mikotik ve viral patojen tarafından oluşturulur. Bakteriyel etkenler arasında *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) ilk sıralarda yer alır (Arda ve İstanbulluoğlu, 1979; Alaçam ve ark., 1994; Erganiş ve ark., 1995; Hadimli ve ark., 2001). Bakteriyel mastitislerin sağaltımında çeşitli antibiyotikler yoğun olarak kullanılmaktadır (Dinç ve ark., 1991; Hadimli ve ark., 2001; Kuyucuoğlu ve Uçar, 2001). Ancak, tıpkı diğer infeksiyonların sağaltımında olduğu gibi, mastitislerin sağaltımında da antibiyotiklerin kullanımını direnç sorununu doğurmuştur. Bu direncin en iyi bilinen mekanizması, Stafilocoklarda β-laktam antibiyotiklere karşı gelişenidir (Watts ve Salmon, 1997). β-laktam antibiyotiklerin etkileri (penisilin, ampisilin

vb), bakterilerin peptidoglikan sentezi için gerekli olan transpeptidaz enziminin inhibisyonu yoluyla. Dirençli bakteriler tarafından üretilen β-laktamaz enzimi ise, β-laktam halkasının yapısını bozarak etki eder (Watts ve Salmon, 1997; De Oliveria ve ark., 2000). β-laktamaz (penisilinaz) enzimi, mastitislerden izole edilen Stafilocok suşlarının bazıları tarafından da üretilmektedir (Türütoğlu ve ark., 1995; Akan ve ark., 2001; Hadimli ve ark., 2001). Nazer ve Tavakoli (1994) klinik ve subklinik mastitislerden izole ettikleri Stafilocok suşlarında β-laktamaz pozitifliğini %89.4 olarak bildirirken, De Oliveria ve ark. (2000) ise inceledikleri 811 *S.aureus* suşunda β-laktamaz pozitifliğini %36.4 olarak bildirmişlerdir. Türkiye'de ise Sezen ve ark (1986) Konya Bölgesinde yaptıkları bir çalışmada mastitisli ineklerden izole ettikleri 19 *S.aureus* suşunun tamamında β-

laktamaz üretimini belirlemişlerdir. Akan ve ark (2001) inek mastitislerinden izole edilen 82 suşun %28'inde  $\beta$ -laktamaz aktivitesini tespit etmişlerdir. Hadimli ve ark. (2001) mastitisli süt ineklerinden izole edilen 107 Stafilocok suşunun  $\beta$ -laktamaz aktivitelerini araştırmışlar ve 82 koagulaz pozitif Stafilocok suşunun %36'sı ve koagulaz negatif Stafilocokların ise %48'i  $\beta$ -laktamaz pozitif bulunduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, Konya Bölgesinde inek mastitislerinden izole edilen koagulaz pozitif Stafilocok suşlarının  $\beta$ -laktamaz üretimleri ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları incelendi.

### Materyal ve Metot

Çalışmada, Konya Bölgesi'nde bulunan çeşitli kamu ve özel tarım işletmelerinden, klinik ve subklinik mastitisli ineklerden alınan süt örneklerinden izole ve tanımlanmış toplam 81 koagulaz pozitif Stafilocok suşu kullanıldı. Subklinik mastitis olguları CMT testi ile belirlendi. Suşların identifikasyonu klasik yöntemlere göre yapıldı (Carter ve Chengappa, 1991; Collins ve ark., 1995).

Koagulaz Testi: Lamda yapılan koagulaz testinde, kültürden alınan 1 veya 2 koloni lam üzerinde 1 damla su ile homojenize edilerek, 10-20 sn süre ile gözlemlendi. Koagulasyonun görülmemesi üzerine 1 öze dolusu tavşan plazması (EDTA ile elde edilen) ile karıştırılarak, 10 sn içerisinde koagulasyon verenler pozitif olarak değerlendirildi (Collins ve ark., 1995).

Tüpte yapılan testte ise, 0.8 ml nutrient buyyona 0.2 ml plazma ilave edildi ve test edilecek suş ekildi. Su banyosunda (37 °C) inkübasyona bırakıldı. Üç saat sonra muayene edildi. Negatif bulunan örnekler oda sıcaklığında bir gece daha inkübe edilerek, yeniden değerlendirildi (Collins ve ark., 1995).

$\beta$ -laktamaz aktivitesi: Suşların  $\beta$ -laktamaz aktivitelerinin belirlenmesinde  $\beta$ -laktamaz identifikasyon çubuklarından yararlanıldı (OXOID BR66A). Mueller

Hinton Agarda üreyen Stafilocok kolonilerinden sürme yapıldı ve çubuklar nemli ortamda 24 saat inkübe edildi. Sonuçlar 5., 15. dakikalarda ve 24 saat sonunda değerlendirildi. Koyu pembe renk pozitif, 24 saat sonunda rengin değişmemesi ise negatif olarak değerlendirildi.

Antibiyotik Duyarlılık Testi: Stafilocok suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları disk difüzyon tekniği ile saptandı (Bauer ve ark. 1966). Testte penisilin G (10 unite), kloksasilin (5 mcg), oksasilin (1mcg), amoksisilin (25 mcg), amoksisilin+klavulanik asit (30 mcg), metisilin (5 mcg), ampisilin+sulbactam (20 mcg) (Oxoid) ile danofloksasin (5 mcg) (Pfizer) diskleri kullanıldı.

### Bulgular

Çalışmada incelenen toplam 81 suş ve özellikleri Tablo 1'de verildi. Bir suşun koagulaz pozitifliğinin değerlendirilmesi, suşun lam veya tüpte pozitif olmasına göre yapıldı. Suşlardan 66'sı (%81.5) tüpte koagulaz testi ile pozitif bulundu. Tüm suşlar lamda yapılan koagulaz testinde pozitif idi. Suşlardan 75'i (%92.6) *S.aureus*, 6'sı (%7.4) ise *S.intermedius* olarak tanımlandı. *S.aureus* suşları arasında 49 (%65.3) suş  $\beta$ -laktamaz pozitif, 26 suş (%34.7) ise negatif bulundu. *S.intermedius* suşlarında  $\beta$ -laktamaz pozitiflik 2 suşta (%33.3) tespit edilirken negatiflik 4 (%66.7) suşta belirlendi. *S.aureus* suşlarının 8'i (%10.7) tüm antibiyotiklere duyarlı bulundu. Üç suş, sadece penisiline dirençli diğer antibiyotiklere duyarlı bulunurken, 2 suş yalnız amoksisiline dirençli diğerlerine duyarlı bulundu. Metisiline dirençli yalnız bir *S.aureus* suşu tespit edildi. Bu suş aynı zamanda  $\beta$ -laktamaz pozitif idi. Çalışmada kloksasiline dirençli *S.aureus* suş sayısı 3'tü. *S.aureus* suşlarının 60'ı (%80) amoksisiline direnç gösterdi. Ampisilin+sulbactam kombinasyonuna 1 (%1.3), amoksisilin+klavulanik asit kombinasyonuna 2 (%2.7) suş dirençli bulunurken danofloksasine dirençli bir suşa rastlanmadı. Çalışmada denenen tüm antibiyotiklere duyarlılık sadece *S.intermedius* suşlarından 4'ünde (%66.7) tespit edildi. Metisilin, kloksasilin ve oksasiline dirençli *S.intermedius* suşu tespit edilmedi. *S.intermedius* suşları arasında aynı zamanda  $\beta$ -laktamaz pozitif olan penisiline dirençli 2 suş gözlemlendi. *S.intermedius* suşlarının tümü amoksisilin+klavulanik asit ile danofloksasine duyarlı bulundu. Tablo 2'de izole edilen Stafilocok türlerinin geliştirdikleri antibiyotik dirençlerine göre sınıflandırılması verilmiştir. En çok geliştirilen direncin penisiline karşı olduğu gözlemlendi (%85.2).

### Tartışma ve Sonuç

İnek mastitislerinin sağaltımı amacıyla çeşitli antibiyotikler yoğun olarak kullanılır. Ancak tedavide her zaman doğru antibiyotik seçimi mümkün olmamakta ve

Tablo 1. Stafilocok türlerinin  $\beta$ -laktamaz aktiviteleri

Stafilocok türü	n	$\beta$ -laktamaz pozitif	$\beta$ -laktamaz negatif
<i>S.aureus</i>	75	49 (%65.3)	26 (%34.7)
<i>S.intermedius</i>	6	2 (%33.3)	4 (%66.7)
Toplam	81	51 (% 63)	30 (%37.3)



Tablo 2. İncelenen Stafilokok suşlarının türlere göre antibiyotik dirençlilikleri

Stafilokok türü	P	Amok	Klok.	Oks.	Antibiyotikler			
					Amok.+Kla.	Amp. + Sul.	Dan.	Met.
<i>S.aureus</i>	67	60	3	2	2	1	0	1
n = 75	(%89.3)	(%80)	(%4)	(%2.7)	(%2.7)	(%1.3)	(%0)	(%1.3)
<i>S.intermedius</i>	2	3	0	0	0	0	0	0
n = 6	(%33.3)	(%50)	(%0)	(%0)	(%0)	(%0)	(%0)	(%0)
Toplam	69	63	3	2	2	1	0	1
n = 81	(%85.2)	(%77.8)	(%3.7)	(%2.5)	(%2.5)	(%1.2)	(%0)	(%1.2)

P: Penisilin, Amok: Amoksisilin, Oks: Oksasilin, Amok+Kla: Amoksisilin+Klavulanik Asit, Amp+Sul: Ampisilin+Sulbaktam, Dan: Danofloksasin, Met: Metisilin

bakterilerde gelişen direnç, mastitislerin sağaltımında başarısızlığa sebep olmaktadır. Ayrıca, bu durum ekonomik kayba ve halk sağlığı sorunlarının gelişmesine de yol açmaktadır (Francis, 1989). Bu sebeplerden dolayı mastitis sağaltımının, mutlaka antibiyogram sonuçlarına dayandırılması ve direnç gelişen antibiyotığın kullanımından kaçınılması gerekir (Sezen ve ark., 1986; Erganiş ve ark., 1995; Hadimli ve ark., 2001). Stafilokok mastitislerinde, etken bakteri tarafından geliştirilen antibiyotik direncinin en sık rastlananlarından birisi  $\beta$ -laktamaz enzimi aktivitesi aracılığıyla olanıdır (Watts ve Salmon, 1997). Bu enzim aracılığı ile Stafilokoklar (ve diğer bazı bakteriler) başta penisilin olmak üzere  $\beta$ -laktam grubu diğer antibiyotiklere karşı direnç geliştirirler.

Bu çalışmada incelenen 81 Stafilokok suşunun 51'i (%63)  $\beta$ -laktamaz pozitif bulundu. *S.aureus* suşlarının  $\beta$ -laktamaz pozitifliği ise 49 suşta (%63.3) belirlendi. Eskiizmirliler ve Öncel (2001) 115 Stafilokok suşu ile yaptıkları çalışmada %61.7'lik bir  $\beta$ -laktamaz pozitifliği ve *S.aureus* suşları yönünden değerlendirildiğinde bu oranın %64.2 olduğunu bildirmişlerdir. Jones ve Health (1985) *S.aureus* suşlarının %66'sında  $\beta$ -laktamaz pozitifliği bildirmişlerdir. Sezen ve ark. (1986) ise *S.aureus* suşlarında bu oranı %100 olarak belirlemişlerdir. Akan ve ark. (2001) inek mastitislerinden izole edilen koagülaz pozitif Stafilokok suşlarının  $\beta$ -laktamaz aktivitesini %28 olarak tespit ettiklerini, benzer bir çalışmada Hadimli ve ark. (2001) ise %43.9 olarak belirlediklerini bildirmişlerdir. Değişik çalışmalarda elde edilen koagülaz pozitif Stafilokok suşlarının  $\beta$ -laktamaz aktiviteyi büyük farklılıklar göstermektedir. Öte yandan bu çalışmanın sonuçları ile aynı bölgeden yapılmış olan diğer çalışmaların (Sezen ve ark., 1986; Hadimli ve ark., 2001) sonuçları ara-

sında da farklılıklar görülmektedir. Sezen ve ark. (1986)'nın %100'lük  $\beta$ -laktamaz pozitifliği, inceledikleri örnek sayısının az olması ile açıklanabilir. Hadimli ve ark. (2001) koagülaz pozitif ve *S.aureus* suşları için bildirdikleri %43.9 ve %46.1'lik oranlar, bu çalışmada elde edilen değerlerden (sırasıyla %63 ve %65.3) düşüktür. Öte yandan Hadimli ve ark. (2001) *S.intermedius* suşlarında  $\beta$ -laktamaz pozitifliği %0 olarak bildirilirken, bu çalışmada bu oran %33.3 olarak bulunmuştur. Söz konusu çalışmalarda örneklemin farklı sürülerden yapılmış olması bu farklılığı açıklayabilir.

Bu çalışmada  $\beta$ -laktamaz pozitif suşların tümünün aynı zamanda koagülaz pozitif olması (hem tüp hem de lamda koagülaz testi ile) bu iki özellik arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmektedir. Koagülaz aktivitesinin ölçümünde, tüpte koagülaz testinin değerlendirildiği başka bir çalışmada da benzer sonuç ve yargıya ulaşılmıştır (Akan ve ark., 2001).

Penisiline dirençli suşların büyük çoğunluğunun (3 suş hariç) aynı zamanda amoksisiline de dirençli olması,  $\beta$ -laktamaz pozitiflik ile  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklere karşı gelişen direnç arasında bir paralellik olduğunun işareti olarak değerlendirildi. Öte yandan amoksisilin, bir  $\beta$ -laktamaz inhibitörü olan klavulanik asit ile kombinasyonu bu direnci önemli ölçüde önlemiştir. Dolayısıyla yeni antibiyotiklerin geliştirilmesinde buna benzer kombinasyonların oluşturulması bir strateji olarak benimsenebilir. Genel olarak ele alındığında  $\beta$ -laktamaz ile hidrolize olmayan  $\beta$ -laktam grubu diğer antibiyotiklere (metisilin, oksasilin, kloksasilin) karşı ciddi bir direnç gelişimi tespit edilmemiştir. Özellikle hastane enfeksiyonlarında önemli bir patojen olan metisilin dirençli *S.aureus* (MDSA) (Mutlu ve ark., 1997) suşlarına bu çalışmada yalnızca 1 tane rastlanmış olması, Bölgesel düzeyde söz konusu dirençli patojenin,

mastitis etkeni olarak henüz beşeri enfeksiyonlardaki boyutta bir tehdit olmadığı şeklinde açıklanabilir.

Sonuç olarak, Bölgedeki inek mastitisine sebep olan koagulaz pozitif Stafilokok suşlarında gözlenen  $\beta$ -laktamaz üretimi ile antibiyotik direnci arasında bir ilişki olduğu kanısına varıldı.

### Kaynaklar

Akan, M., Kökçü, L., Öncel, T., Eken, H.S. (2001) Mastitislerden izole edilen Stafilokok suşlarının beta laktamaz aktivitesi ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Dergisi, 1(2): 31-34.

Alaşam, E., Dinç, D.A., Erganiş, O., Tekeli, T., Uçan, U.S., Sezen, S. (1994) Sağlıklı ve subklinik mastitisli ineklerde kuru dönemde antibiyotik uygulamalarının etkisi. Tr.J.of Veterinary and Animal Sciences. 18: 241-250.

Arda, M. ve İstanbulluoğlu, E. (1979) Mastitise sebep olan aerobik, mikroaerofilik, anerobik bakterilerin izolasyon ve identifikasyonu üzerinde çalışmalar. TÜBİTAK VHAG-304, Kesin Rapor.

Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Turck, M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardised single disc method. Amer.J.Clin.Pathol., 45: 493-496.

Carter, G.R., Chengappa, M.M. (1991) Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology, 4th Ed. Lea & Febiger, Pennsylvania.

Collins, C.H., Lyne, P.M., Grange, J.M. (1995) Microbiological Methods. 7th Ed. Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford.

De Oliveira, A.P., Watts, J.L., Salmon, S.A., Aerstrup, F. (2000) Antibacterial susceptibility of Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis in Europa and the United States. J.Dair.Sci., 83: 855-862.

Dinç, D.A., Erganiş, O., Güler, M., Uçan, U.S. (1991) İneklerin subklinik mastitislerinde Baytril'in Etkisi. Hay.Araş.Derg. 1(1): 12-15.

Erganiş, O., Kuyucuoğlu, Y., Ok, Ü. (1995) İnek ve koyun Mastitislerine sebep olan koagulaz negatif ve pozitif Stafilokokların biyotiplendirilmesi. Veterinarium. 6 (1-2), 23-27.

Eskiizmirliler, S., Öncel, T. (2001) İzmir Bölgesinde görülen

mastitis olgularından izole edilen  $\beta$ -laktamaz (+) ve  $\beta$ -laktamaz (-) Staphylococcus türlerinin amoksisilin ve amoksisilin+klavulanik asit'e duyarlılıklarının karşılaştırılması. Süt İnelçiliğinde Mastitis Sempozyumu, 4-5 Mayıs, Burdur.

Francis, P.G. (1989) Update on mastitis: III. Mastitis Therapy. Br.Vet.J., 145(4): 302-311.

Hadimli, H.H., Ateş, M., Güler, L., Kav, K., Öncel, T. (2001) Mastitisli süt ineklerinden izole edilen Stafilokokların  $\beta$ -laktamaz aktiviteleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları. Vet. Bil.Derg., 17(4): 21-25.

Jones, T.O., Health, P.J. (1985) Beta lactamase production in Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis milk. Vet.Rec. 117: 340-342.

Kuyucuoğlu, Y., Uçar, M. (2001) Afyon Bölgesi süt ineklerinde subklinik ve klinik mastitislerin görülme oranları ve etkili antibiyotiklerin tespiti. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Dergisi. 1(1): 19-25.

Mutlu, B., Gündeş, S., Kolaylı, F. (1997) Hastane personelinin burun kültürlerinden izole edilen Stafilokok türlerinin metisilin duyarlılığı. VIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 6-10 Ekim, Antalya.

Nazer, A.H.K., Tavakoli, A.H. (1994) Prevalance of antibiotic resistance and beta-lactamase production by bacteria isolated from cases of bovine mastitis. J.Appl.Anim.Res., 6: 167-176.

Sezen, İ.Y., Erganiş, O., Çorlu, M., Ateş, M. (1986) Mastitisli inek sütlerinden izole edilen Staphylococcus aureus'larda, penisilin rezistansı ile bazı enzim karakterleri ve biyokimyasal testler üzerinde çalışmalar. Selçuk Üniversitesi Vet. Fak. Dergisi, 2(1): 91-101.

Türütoğlu, H., Mudul, Ş., Öncel, T. (2001) Burdur bölgesinde mastitislerden izole edilen mikroorganizmalarda  $\beta$ -laktamaz varlığı. Süt İnelçiliğinde Mastitis Sempozyumu, 4-5 Mayıs, Burdur.

Watts, J.L., Salmon, S.A. (1997) Activity of selected antimicrobial agents against strains of Staphylococcus aureus isolated from bovine intramammary infections that produce beta lactamase. J.Dairy.Sci., 80: 788-791.