

İNEKLERDE SUBKLİNİK MASTİTİSLERİN BİYOKİMYASAL
VE MİKROBİYOLOJİK YÖNDEN İNCELENMESİ (*)

*Biochemical and microbiological investigations
of subclinical mastitis in cows.*

Mehmet NİZAMLIOĞLU¹
Tevfik TEKELİ²
Osman ERGANİŞ³
Nuri BAŞPINAR⁴

Summary : The aim of this study was to investigate some biochemical and microbiological values for the early diagnosis of subclinical mastitis in healthy and mastitic cows.

In the present study, a total of 30 Brown-Swiss cows, in 5-7 years old, supplied by Konya Animal Research Centre, were used as materials.

Blood samples were taken from the animals at the same time as the milk. All the biochemical and microbiological determinations were performed on the same day. ALP, albumin, Na and K values were determined in the blood serum samples. The counting of the PMN, LDH, ALP, Na and K values were measured in the milk samples.

In the subclinical mastitic cows, milk LDH, ALP, Na ve K values were found statistically significant. Furthermore, the counting of the PMN increased significantly. Blood serum sample values were not found statistically significant.

As a result, it was useful to determine of the LDH, ALP, Na, K and the counting of the PMN in milk for the early diagnosis subclinic mastitis. Other tests, blood serum albumin, Na and K values were not found mainly important for the early diagnosis of the subclinic mastitis.

(*) Bu Araştırma Selçuk Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

- (1) Doç. Dr., S. Ü. Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı - Konya.
- (2) Doç. Dr., S. Ü. Veteriner Fakültesi, Doğum ve Rejrodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı - Konya.
- (3) Yrd. Doç. Dr., S. Ü. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı - Konya
- (4) Arş. Gör. Dr., S. Ü. Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı - Konya.

Özet : Sunulan bu çalışma, subklinik mastitislerin erken tanısı amacıyla sağlam ve mastitisli ineklerin kan ve sütlerinde biyokimyasal ve mikrobiyolojik yönden araştırma yapmak üzere yapıldı.

Çalışmada materyal olarak, Konya Hayvancılık Araştırma Merkezin-den sağlanan 3-7 yaş arasında toplam 30 baş İsviçre Esmeri ırkı inek kullanıldı.

Deneme hayvanlarından aynı zamanda alınan kan ve süt örneklerinde, biyokimyasal ve mikrobiyolojik yönden incelemeler aynı günde yapıldı. Kan örneklerinde ALP, albumin, Na ve K değerleri tayin edildi. Süt örneklerinde PMN lökosit sayısı, mikrobiyolojik testler, LDH, ALP, Na ve K değerleri ölçüldü.

Subklinik mastitisli ineklerin süt serumlarında LDH, ALP, Na ve K değerleri istatistiki yönden önemli farklılıklar göstermiştir. Kan serumlarında ölçülen değerlerde meydana gelen değişmeler ise istatistiki yönden önemli bulunmamıştır. PMN lökosit sayıları subklinik mastitisli ineklerde önemli ölçüde artışlar göstermiştir.

Sonuç olarak, subklinik mastitislerin erken tanısında PMN lökosit sayılarının tayini, süt LDH, ALP, Na ve K değerlerinin ölçülmesi teşhise önemli ölçüde yardımcı olacaktır. Çalışmada tayin edilen diğer değerlerin ise teşhise birinci derecede yardımcı olmayacağı kanısına varılmıştır.

Giriş

Sütçü ineklerde görülen en önemli hastalıklardan birisi mastitis (meme yangısı) tir. Ülkemiz hayvancılığında da sık görülen mastitis büyük ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Memede meydana gelen yangı ile karakterize olan mastitisin değişik formları vardır. Süt inekçiliğinde en sık rastlanan şekli subklinik mastitistir.

Subklinik mastitiste sistemik veya lokal bir belirtiyeye rastlanmaz. Bu gibi mastitisler sütte lökosit sayısının artışı, patojen etkenlerin izolasyonu ve biyokimyasal değerlerde meydana gelen değişmelerle tanınırlar (3, 19). Parantainen ve ark. (15) ise, meme bölgelerinin bir ya da birden fazlasında patojen bakterilerin görülmesi ve somatik hücre sayısının 500×10^3 hücre/ml'den fazla olması halinde mastitisten söz edilebileceğini belirtmektedirler. Süt inekçiliğinde subklinik mastitislerin klinik mastitislere göre 40-50 defa daha fazla görüldüğü bildirilmektedir (17).

Subklinik mastitislerin tanısı amacıyla, sütteki hücre sayısının araştırılması çeşitli araştırmacılar (10, 12, 16, 21) tarafından baş vuralan ve güvenilir bir yöntem olarak bildirilmektedir. Sütteki somatik hücrelerin

sayımı için direkt mikroskopi, DNA filter metod, Coulter Counter (EEC), Fosomatik (FOSSA) gibi direkt ve CMT gibi endirekt testleri ihtiva eden farklı metodlar uygulanmaktadır, ancak bu uygulamalardan farklı sonuçlar alınmaktadır. En iyi sonuçların DNA filtre yöntemi ile alındığı ve bazı ineklerin sütlerinde sitoplazmik fragmentlerin ve diğer partiküllerin somatik hücreler gibi sayılmaları nedeniyle sütteki somatik hücre sayımlarının ECC ile tesbit edilmelerinin uygun olmadığı bildirilmektedir (22, 23).

Sütteki polimorf lökosit (PMN) sayısının artışı tesbit eden testlerden Kalifornia Mastitis Testi (CMT) her türlü saha şartlarında uygulanabilmesi bakımından oldukça sık kullanılan bir testtir. CMT dolaylı olarak lökosit artışı gösterir ve lökositlerin miktarına göre hafif bir pre-sipitasyondan yoğun bir jel şekillenmesine kadar değişik tepkileri sergiler. Test eriyiği içine katılan BCP (Brom Croosol Purple), BTP (Brom Tymol Blue) ile sütün pH'sındaki değişimler de izlenebilir. Bunların dışında lökosit sayısındaki artışları tesbit eden ve % 5'lik sodyum hidroksit ile yapılan White Side Testi, CMT'nin daha fazla teste uygulanmasını sağlayan Barabant Mastitis Testi gibi testler uygulama sahası bulan testlerdir (3, 19).

Subklinik mastitislerin erken tanısında direkt ve endirekt PMN lökosit sayılarının yanında plazma albumin değerlerinin de araştırılması etkili yöntemler arasındadır. Subklinik mastitisli ineklerin kan serum albumin değerlerinde $P < 0.05$ istatistiki önem derecesinde değişimler olmuş, hücre sayıları ise sağlamlarda $SSC < 100 \times 10^3$, mastitislerde $SSC > 100 \times 10^3$ olarak belirlenmiştir. Ayrıca hücre sayılarındaki artışların prostaglandin ile de ilişkili olduğu, bu ilişkinin $r = 0.49 - 0.57$ arasında değiştiği görülmüştür (1, 2).

Son zamanlarda subklinik mastitislerin tanısı amacıyla birçok testlerin uygulandığı bilinmektedir. Bunlardan bazıları; Süt ve kanda Na, K, Cl, laktoz, sütte anyon ve katyon değişikliği, N-asetil β -D-glukozaminidaz (NAG-ase), süt antitripsin aktivitesi, stafilokol ve streptokokal nükleazlar ile antinükleazlar ve diğer bazı enzimlerin tayin edilmesi gibi testlerdir (9, 13, 14, 15, 20).

Mastitis sonucunda meme bezlerinde meydana gelen patolojik değişiklikler süt salgısını azaltmak suretiyle sütteki Na, K miktarlarının ve dolayısıyla ozmotik basıncın değişmesine yol açarlar (18).

Mastitisli sütlerde Laktat Dehidrogenaz (LDH), Glutamik Okzaloasetat Transaminaz (GOT), Ca, Mg ve inorganik fosfor değerlerinin tayin edilmesiyle mastitis hakkında bilgi edinilmesi mümkündür. LDH değer-

leri normal süt değerlerine göre 18 kat, GOT değerleri 7 kat, ALP değerleri ise yaklaşık 6 kat artmaktadır. Subklinik mastitiste artan LDH aktivitesi ile birlikte hücre sayısı da artarak pozitif bir ilişki göstermektedir (4, 5, 6, 7, 24).

Sütte LDH aktivitesinin düşük düzeyde olması memelerin sağlıklı olduğunun bir işaretidir veya paraneomal irritasyonun ilk safhası sayılabilir. Yüksek konsantrasyondaki LDH aktivitesi ise plazma membranları permeabilitesinin artması sonucu kan ve epitel hücrelerinin stoplazmasından süte geğerler. Bu nedenle hücre sayısı ile LDH aktivitesinin beraberce değerlendirilmesi uygun bir yöntem kabul edilmektedir (6, 24, 25).

Enzimatik mtodlar daha pratik ve güvenilir oldukları için subklinik mastitislerin tanısında kullanılırlar. Subklinik mastitisli ineklerin sütlerinde laktat dehidrogenaz, izositrat dehidrogenaz (ICDH), malik dehidrogenaz (MDH) gibi enzimlerde önemli değişmelerin olduğu, alkali fosfataz (ALP), asit fosfataz (ACP), Glutamik okzalasetat transaminaz (GOT) ve Glutamik pruvat kinaz (GPT)'da ise fazla bir değişikliğin olmadığı görülmüştür. Subklinik mastitislerin teşhisinde N-asetil β -D-glukozaminidaz tayinin başarı ile uygulandığı da bildirilmektedir (11).

Sunulan bu çalışmanın amacı, büyük ekonomik kayıplara sebep olan subklinik mastitislerin erken teşhisi amacıyla, sağlıklı ve mastitisli ineklerin kan ve süt serumlarında bazı biyokimyasal değerlerin ve mikrobiyolojik araştırmaların yapılmasıdır.

Materyal ve Metot

Materyal :

Bu çalışmada materyal olarak, Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı, Konya Hayvancılık Araştırma Merkezine ait 3-7 yaş arasında, aynı evre koşullarında bulunan toplam 30 baş İsviçre Esmeri inek kullanılmıştır. Dengeli ve normal olarak beslenen hayvanlar geceleri kapalı barınaklarda, gündüzleri ise merada bırakılmıştır.

Araştırmaya alınan hayvan materyali, laktasyonda bulunan hayvanların tümüne Kalifornia Mastitis Testi (CMT) uygulandıktan sonra elde edilen CMT bulgularına göre seçilmiştir. CMT'nin dört meme bölümünde (—) verdiği 15 inek de subklinik mastitisli olarak kabul edilmiştir.

Metot :

CMT'nin uygulanması : Sağıam ve mastitisli hayvanların seçiminde uygulanan bu test için, akşam sağımından önce herbir meme bölümün-

den birkaç çekim süt dışarı atıldıktan sonra CMT test küreğine bir miktar süt alınmış ve test küreği hafifçe eğilerek her bir bölüm eşitlendikten sonra üzerine aynı miktarda test solusyonu ilave edilmiş ve test sonuçları Schalm ve ark. (19)'nın bildirdikleri şekilde değerlendirilmiştir.

Kan ve süt örneklerinin alınması : CMT'nin uygulanmasından sonra ayrılan 15 sağlam ve 15 subklinik mastitisli inekten kan ve süt örnekleri alınmıştır. Süt örnekleri CMT'nin (—) gösterdiği ineklerin tek memesinden, (+) gösteren ineklerin ise sadece hasta olan meme bölmelerinden alınmıştır.

Kan ve Süt serumlarının Biyokimyasal Yönden Araştırılması :

Albumin ve Alkali Fosfataz değerleri Biöberg Diagnostics(*) test kiti ile ölçülmüş, LDH tayini ise Wake (**)'nin test kiti ile yapılmıştır.

Sütteki Somatik Hücrelerin Sayımı :

Sütteki somatik hücreler IDF (8)'nin bildirdiği şekilde sayılmıştır.

Sütün Mikrobiyolojik Muayenesi :

CMT ile (+) veya sağlıklı bulunan hayvanlara ait süt örnekleri aseptik şartlarda alınmış ve homojenize edildikten sonra % 7 koyun kanlı agar ve mac-Congkay agarlara ekilerek aerobik, anaerobik ve mikroaerofilik ortamlarda 37 °C de 27-72 saat inkübe edilmiştir. Mantar izolasyonu için Saborround dekstroze agar'a ekim yapılarak oda ısısında 1 hafta bırakılmıştır (8).

Bulgular

Çalışmada elde edilen bulgular tablo 1, 2 ve 3 de özetlenmiştir. Tablo 1 de sağlam ve subklinik mastitisli ineklerin kan serumlarında ALP, Albumin, Na ve K değerlerinin istatistiki karşılaştırması, Tablo 2'de sağlam ve subklinik mastitisli ineklerin süt serumlarında LDH, ALP Na ve K değerlerinin istatistiki karşılaştırması verilmiştir. Tablo 3'de ise normal ve subklinik mastitisli ineklerin süt nünunelerinde somatik hücre sayısı ve izole edilen bakteriler gösterilmiştir.

(*) Pan European Media Co inc., Suite 202., Toronto, 7266 Summint Aue.

(**) Wako Chemicals GmbH Nissantr., 2, 4040 Neuss 1, Wast Germany.

Tablo 1. Sağlam ve subklinik mastitisli hayvanların kan serumlarında ALP, Albumin, Na K değerler..

Biyokimyasal Değerler	Sağlam İneklerde	Subklinik Mastitisli İneklerde	T
ALP U/L	39.44 ± 3.97	39.25 ± 2.24	0.04
Albumin g/dl	3.83 ± 0.05	3.84 ± 0.09	0.07
Na mg/dl	301.87 ± 8.08	316.21 ± 3.13	1.61
K mg/dl	15.55 ± 0.87	17.03 ± 0.48	1.48

Tablo 2. Sağlam ve subklinik mastitisli hayvanların sđt serumlarında LDH, ALP, Na ve K değerleri.

Biyokimyasal Değerler	Sağlam İneklerde	Subklinik Mastitisli İneklerde	T
LDH unite/ml	2.67 ± 2.05	526.67 ± 125.61	4.13**
ALP U/L	179.96 ± 25.23	269.39 ± 29.48	2.31*
Na mg/dl	71.67 ± 3.33	167.27 ± 16.16	5.79**
K mg/dl	117.89 ± 4.10	88.36 ± 8.82	3.04**

(**). P < 0.01

(*). P < 0.05

Tablo 3. Sağlam ve subklinik mastitisli hayvanların sđt örneklerinde somatik hđcre sayısı ve izole edilen bakteriler.

	PMN Lökosit/ml	İzole Edilen Bakteriler ve Sayısı
Sağlam İneklerde	178350 ± 29353**	İzole edilemedi
Subklinik Mastitisli İneklerde	870819 ± 115622**	Staph aureus (3) Coryn. ssp. (3) Coryn. pyogenes (2) Candida albicans (2) E. coli (1) İzole edilemeyen (4)

Tartışma ve Sonuç

Memelerde belirgin lokal ve sistemik bir belirti göstermeden seyreden subklinik mastitiste, biyokimyasal ve fizyolojik değişmelerin yanında patolojik değişmeler de söz konusudur. Süt inekçiliğinde subklinik mastitislerin tanısında, CMT testi uygulanıp sütte hücre sayımı ve mikrobiyolojik testler yapılarak sağlamlarla subklinik mastitisli hayvanların ayırımı sağlanmaktadır (12, 16, 22, 23).

Son zamanlarda subklinik mastitislerin teşhisinde sadece CMT testinin yeterli olmadığı, bunun yanında süt ve kanda bazı enzimlerin ve mineral maddelerin tayin edilmesiyle teşhise önemli derecede katkıda bulunacağı çeşitli araştırmacılar (14, 20) tarafından bildirilmektedir.

Mastitisli sütlerde LDH değerlerinin normal değerlere göre 18 kat, LAP değerlerinin ise 6 kat arttığı bildirilmiştir (6). Yapılan bu çalışmada da subklinik mastitisli sütlerde LDH aktivitesinin değiştiği ve sonucun istatistiksel bakımdan önemli ($P < 0.01$), ALP değerleri de istatistiksel yönden önem ($P < 0.05$) arz etmiştir. Kan serumu ALP değerlerinde görülen farklılıklar ise önemsiz bulunmuştur.

Schalm ve ark. (19), subklinik mastitisli ve sağlam ineklerin sütlerinde maksimum ve minimum hücre sayılarını değerlendirirken somatik hücre sayısı 500.000 den az olanları sağlam, somatik hücre sayısı 500.000'den fazla olanları ise subklinik mastitisli olarak kabul etmişlerdir. Sunulan bu çalışmada da CMT testi ile sağlam diye ayrılan ineklerin sütlerinde somatik hücre sayısı 500.000'den az, mastitisli diye ayrılan ineklerin sütlerinde ise somatik hücre sayısı 500.000'den fazla bulunmuştur.

Alınan süt örneklerinde hücre sayısı ile LDH artışı arasında pozitif bir ilişkinin olduğu, en yüksek hücre sayısına sahip olan subklinik mastitisli örneklerde LDH aktivitesinin çok fazla, düşük hücre sayısına sahip olan numunelerde ise LDH aktivitesinin az olduğu tespit edilmiştir. Bundan dolayı subklinik mastitislerin teşhisinde hücre sayısı ve LDH aktivitelerinin erken tanıda önemli bulgular olacağı kanısına varılmıştır. Bu durum çeşitli araştırmacılar (6, 24) tarafından da doğrulanmaktadır.

Rook ve ark. (18), mastitis olgularında meme bezlerinde meydana gelen patolojik ve fizyolojik değişmeler neticesinde süt ve dolayısıyla kandaki Na, K değerleri ile ozmotik basınçta bazı farklılıklar meydana geldiğini belirtmektedir. Sunulan bu çalışmada da mastitisli sütlerin serumlarında Na ve K değerlerinde istatistiki yönden oldukça önemli ($P < 0.01$) farklılıklar görülmüştür. Sağlam ve subklinik mastitisli ineklerin kan serumlarında Na ve K değerleri arasında görülen değişmeler ise önemli bulunmamıştır.

Subklinik mastitislerin teşhisinde, direkt ve indirekt PMN lökositlerin sayıları yanında kan serum albumin değerlerinin de teşhise yardımcı olabileceği bildirilmektedir (2). Bu çalışmada ise sağlam ve mastitisli ineklerin kan serumlarının albumin değerlerinde meydana gelen değişmelerin istatistiki yönden önemsiz olduğu görülmüştür.

Subklinik mastitisli 15 örneğin 11'inde mikroorganizma izole edilirken, sağlıklı CMT (—) süt örneklerinden hiçbir bakteri izole edilememiştir. Bu durum Schultze (20) tarafından da doğrulanmaktadır.

Sonuç olarak, subklinik mastitislerin erken teşhisi amacıyla 15 baş sağlam ve 15 baş subklinik mastitisli inek materyal olarak kullanılan bu çalışmada, somatik hücre sayıları yanında süt serumunda LDH, ALP, Na ve K değerlerinin ölçülmesi etkili metotlar olarak tespit edilmiştir. Çalışmada elde edilen diğer değerler istatistiki yönden önemli bulunmadığından bu değişmelerin tanıda birinci derecede önemli olmadıkları kanısına varılmıştır.

Kaynaklar

1. Alaçam, E., Nizamlioğlu, M., Erganiş, O. ve Sezer, N.A. (1988). İneklerde subklinik mastitislerin tanısı amacıyla süt ve kanda prostaglandin $F_2\alpha$ ile bazı mikrobiyolojik, hücresel ve biyokimyasal değerlerin araştırılması. Doğa Tu Vet. Ve Hay. D. 12, 1, 11-18.
2. Atroshi, F., Parantainen, J., Sankari, S. and Österman, T. (1986). Prostaglandins and glutathione peroxidase in bovine mastitis. Res. Vet. Sci., 40, 4, 361-366.
3. Aytuğ, C. N., Alaçam, E. ve Görgül, S. (1989). Sığır hastalıkları, Tekno Grafik İstanbul.
4. Bogin, E. and Ziv, G. (1972). Enzymes and minerals in normal and mastitic milk. Cornell Vet., 63, 666-676.
5. Bogin, E. and Ziv, G. (1973). Enzymes and minerals in normal and mastitic cows milk. Br. Vet. J., 121-154.
6. Bogin, E., Ziv, G. and Avidar, J. (1976). Enzyme activities in normal and inflamed bovine udder tissue. Zbl. Vet. Med. A., 23, 460-466.
7. Hambitzer, R. and Sommer, H. (1987). Determination of lactate dehydrogenase in bovine milk. J. Vet. Med. A., 34, 721-727.
8. International Dairy Federation (1981). Laboratory methods for use in mastitis work. Document 132, England.
9. Kalaycioğlu, L. ve Ergun, H. (1980). Atatürk Orman Çiftliği Süt İneklerinde Subklinik Mastitiste Biyokimyasal Yönden Araştırmalar. A. Ü. Vet. Fak. Derg. XXIV, 1-2, 190-200.

10. Kirk, J. H. (1984). Somatic Cell in Milk. Continuing Education Article, 6, 4, 237-246.
11. Kitchen, B. J., Middleton, G. and Salmon, M. (1978). Bovine milk N-acetyl- β -D-Glucoseaminidase and its significance in the detection of abnormal udder secretions. J. of dairy Res., 1578, 45, 15-20.
12. Leslie, K. E., Dohoo, I. and Meek, A. H. (1983). Somatic Cell Counts in Bovine Milk. Continuing Education Article, 5, 11, 601-612.
13. Marscvhke, R. J. and Kitchen, B. J. (1989). Glucose levels in normal and mastitic milk. J. of Dairy Res., 51, 233-237.
14. Mijnen, E., Jaartsveld, F. H. J., Albers, G. A. A., Verstegen, M. W. A. and Tielen, M. J. M. (1982). The value of cell count lactose content, pH and conductivity of milk for mastitis detection in individual cows. Neth. Milk Dairy J., 36, 1, 65-77.
15. Parantainen, J., Tenhunen, E., Kangasniemi, R., Sankari, S. and Atroski, F. (1987). Milk and blood levels of silicon and selenium status in bovine mastitis. Veterinary Research Communications, 11, 467-477.
16. Pearson, J. K. L., Greer, D. O. and Spence, B. K. (1971). The relationship between bulk milk cell counts and cows and quarter mastitis incidence. Vet. Rec. 88, 488-494.
17. Philpot, W. N. (1979). Control of mastitis by hygiene and therapy. J. Dairy Sci., 62, 168-176.
18. Rook, J. A. and Wheelock, J. V. (1967). Reviews of the progress of dairy science. J. Dairy, Res., 34, 273.
19. Schalm, O. W., Carrols, E. J. and Jain, N. C. (1971) Bovine mastitis, Lea and Febiger, Philadelphia.
20. Schultze, W. D. (1985) Developments in the identification of diseased udder quarters or cows. IDF seminar "Progress in the control of bovine mastitis" Kiel, F. R. Germany, 319-328.
21. Schultze, W. D., Smith, J. W., Jasper, D. E., Klastrup, O., Newbould, F. H. S., Pastle, D. S. and Ullman, W. W. (1971). Performance in microscopic counting of somatic cell in milk. J. Milk, Food Tech., 34, 9, 453-457.
22. Sednova, V., Skarda, J., Skardova, O., Urbanova, E. and Bilek, J. (1984). Direct Enumeration of milk somatic cell collected on membrane filters. Arch. exper. Vet. Med., 38, 6, 884-893.
23. Skarda, J., Hemrova, S. V., Mikulas, L., Urbanova, E. and Skardova, O. (1989) Methods of determining the number of somatic cell in cows milk. Zivoc. Uyr., 34, 323-332.
24. Sommer, H. und Sonneck, R. (1980). Beziehung zwischen dem Zellgehalt der Kuhmilch und den Aktivitäten der Enzyme LDH und a. HBHH. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 93, 84-86.
25. Sommer, H., Hambitzer, R. and Aydın, I. (1986). LDH activity and correlation to pathogenic and non pathogenic microorganism dairy milk. Isr. J. Vet. Med., 42, 4, 373-376.

