

Subklinik Mastitisli Sığır Sütlerinin Mikrobiyolojik Analizi ve İzolatların Antimikrobiyal Direnç Profili

Esra BÜYÜKCANGAZ^{1*}

Burak MAT²

Mohammed KHIDER ABD ALRAHIM AHMED²

Geliş Tarihi: 04.03.2013
Kabul Tarihi: 19.04.2013

Özet: Bu çalışmada subklinik mastitisli sığır sütlerinin bakteriyolojik ve mikolojik yönden tanımlanması ve elde edilen izolatların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi hedeflendi. Bu amaçla Bursa ili ile çevre illerdeki 50 farklı sürüden 1600 adet sığıra ait 6400 meme lobu California Mastitis Testi (CMT) ile tarandı. Subklinik mastitisli olduğu tespit edilen sığırlara ait 480 adet süt örneği bakteriyolojik ve mikolojik yönden incelendi. Gram pozitif koklar API-Staphy® (bioMérieux) ve Gram negatif basiller ise API-20E® (bioMérieux) ticari identifikasyon panelleri ile tanımlandı ve sonuçlar API-web sistemi ile değerlendirildi. Örneklerden izole edilen 201 adet bakterinin 48 adedi (% 23.88) Koagülaz Negatif *Staphylococcus* spp. (KNS) ve 153 adedi (%76.11) diğer genustan bakteriler olarak tanımlandı. *S.xylosus* ve *S.epidemicus* en fazla izole edilen KNS ve *Streptococcus* spp. ve *E.coli*'de KNS'ler dışında en fazla izole edilen genus olarak tanımlandılar. İncelenen süt örneklerinde ayrıca 58 adet mantar ve maya türü saptandı. Bakteriye izolatların antimikrobiallere karşı duyarlılığını saptamak amacıyla sekiz farklı gruptan 14 antibiyotik diski ile Kirby-Bauer Antibiyotik Duyarlılık Testi uygulandı ve sonuçlar Eucast 2012 direktiflerine göre değerlendirildi. *S.hominis* dışında tanımlanan KNS'lerin tümünde çeşitli grup antibakteriyellere yüksek oranda direnç geliştiği gözlemlendi. Sonuçta iki veya daha fazla gruptaki antimikrobiyal ajana dirençli olduğu saptanan 23 adet KNS ile 26 adet diğer gruplara ait bakterinin çoklu antibiyotik direncine (MDR) sahip olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Sığır, subklinik mastitis, Koagülaz Negatif *Staphylococcus* spp (KNS), antimikrobiyal direnç.

Microbiological Analysis and Antimicrobial Resistance Pattern of the Isolates Derived From Dairy Cattle With Subclinical Mastitis

Abstract: The aims of this study are (i) to identify the bovine subclinical mastitis cases of dairy cattles in bacteriological and mycological manner, (ii) to determine antibiotic susceptibility patterns of the isolates. For these purposes, 6400 quarters of 1600 cattle from 50 different herds were scanned with California Mastitis Test (CMT) in Bursa and vicinity. 480 milk samples within bovine subclinical mastitis cases investigated by bacteriological and mycological analysis. Gram-positive cocci and Gram-negative bacilli were identified by API-Staphy® (bioMérieux) and API-20E® (bioMérieux) commercial identification panels, respectively and the results were evaluated by API-web system. Out of 201 bacteria isolated from samples, 48 (23.88%) and 153 (76.11%) were identified as CNS and other genus of bacteria, respectively. *S.xylosus*, *S.epidemicus* from CoNs and *Streptococcus* spp., *E.coli* from other bacteria genuses were mostly isolated forms. Beside this, 58 yeast and fungi were also identified within the investigated samples. Kirby-Bauer Antibiotic Susceptibility Test was applied with 14 different antibiotics from 8 different groups to determine the antimicrobial susceptibility patterns of the isolates and the results were evaluated according to the guideline of Eucast 2012. Out of *S.hominis*, all CoNs isolates showed extremely high resistance to the antibacterials based on findings. As a result, 23 of CoNs and 26 placed in the

¹ Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Görükle Kampüsü Bursa, Türkiye. kocakaya@uludag.edu.tr

² Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Görükle Kampüsü Bursa, Türkiye.

other genus of bacteria were found to be resistant to two or more antimicrobial agents. It may be concluded that they have multiple antibiotic resistance (MDR) patterns.

Key Words: Cattle, subclinical mastitis, Coagulase Negative *Staphylococcus* spp (CoNs), Antimicrobial resistance.

Giriş

Mastitis meme bezinin yangısı olup sütçü özellikteki sığır, koyun ve keçilerde süt veriminde ve kalitesinde azalma ile karakterize, ekonomik yönden kayıplara neden olan bir hastalıktır. Sığırlarda mastitis fiziksel, kimyasal ve büyük çoğunlukla da infeksiyöz etiyojisiye sahiptir. Mastitisin infeksiyöz etiyojisinde, *Streptococcus agalactia* (*Str.agalactia*), *Streptococcus dysgalactia* (*Str. dysgalactia*), *Streptococcus uberis* (*Str.uberis*), *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*), *Esherichia coli* (*E.coli*), *Klebsiella pneumoniae* (*K.pneumoniae*), *Enterobacter aerogenes* (*E.aerogenes*), *Actinomyces pyogenes* (*A.pyogenes*) sık rastlanmakta olup, *Staphylococcus epidermidis* başta olmak üzere Koagulaz Negatif *Staphylococcus*'lar (KNS) ile *Pasteurella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*), *Mycoplasma bovis* (*M.bovis*), *Bacillus cereus* (*B.cereus*) gibi birçok bakteri sayılabilir. Bakterilerin yanı sıra mantarlar da mastitislerden sıklıkla izole edilmektedir ve *Candida albicans* (*C.albicans*), *Aspergillus fumigatus* (*A.fumigatus*), *Cryptococcus neoformans* (*C.neoformans*) bunların başlıcalarıdır³⁷. Tedavide izole edilen etkene yönelik doğru antimikrobiyel seçimi sağaltımda kilit noktadır bunun yanında antimikrobiyal maddelerin intramammal yolla uygulanabilmesi de genellikle pratik ve kullanışlı kabul edilir. Antimikrobiyal duyarlılık testlerinde geniş bir spektrumda antimikrobiyel madde taranması gerekmektedir. Genellikle Penisilin grubu antibiyotikler *Streptococcus* spp, *Staphylococcus* spp ve *A. pyogenes* kaynaklı mastitislerde etkili olmasına rağmen son yıllarda önemli oranda β -laktamaz aktivitesine sahip *Staphylococcus* türleri izole edilmiştir ve bu özellikleri nedeniyle etkin tedavi yapılamamaktadır. Koliform mastitisi genellikle aminoglikozidlere iyi yanıt vermektedir. Endotoksin oluşumuna neden olan perakut mastitis olgularında, sistemik ve lokal tedavinin bir arada yapılması ve her iki saatte bir memelerin içinin boşaltılması önemlidir^{12,21,37}.

Hayvanlarda *Staphylococcus* kaynaklı mastitislere sıklıkla rastlanmakta olup Koagulaz negatif *Staphylococcus*lar (KNS) da dünyada yaygın olarak izole edilmektedir. 90'lı yıllara kadar *Streptococcus agalactia* ile *S.aureus*'un

bakteriyel mastitisin temel nedenleri olduğu kabul edilmiştir. Ancak KNS'lerin birçok ülkede gittikçe artan oranlarda sığırlarda subklinik mastitislerden predominant patojen olarak izole edilmeye başlandığı bildirilmektedir^{17,23,24,35}. Son yıllarda yapılan çalışmalarda intensif hayvancılık yapılan işletmelerdeki KNS prevalansı %50'ye varan oranlarda¹⁸ saptansa da açık besi meralarda otlayan hayvanlarındaki izolasyon oranının % 16 gibi daha düşük olduğu dikkat çekmektedir²⁰. Genel olarak KNS'lere bağlı oluşan mastitisin Koagulaz pozitiflere oranla, genellikle subklinik özellikte olduğu ve ılımlı klinik semptomlarla seyrederken tedaviye iyi yanıt alındığı bildirilmektedir^{25,26}. Dünyada ve Türkiye'de yapılan çalışmalarda Gram pozitif kokların dışında diğer bakterilerin de mastitis etkenleri olarak izole edildiği bildirilmektedir^{4,12,37,38,40}.

Bakterilerde antimikrobiyellere karşı direnç gelişimi Veteriner Hekimlikte tedavinin etkinliği açısından büyük önem taşımaktadır. *S.aureus* dışında son yıllarda Koagulaz negatif *Staphylococcus* spp. (KNS) türlerinde de *mecA* geni varlığı saptanmış ve bu izolatların bir veya birden fazla antimikrobiyale karşı direnç geliştirdikleri bildirilmiştir^{1,10}. Hayvanlarda fenotipik olarak dirençli veya *mecA* geni varlığı saptanmış *S.aureus* dışındaki diğer *Staphylococcus* spp. türleri, *S.pseudointermeius*, *S.felis*, *S.schleiferi*, *S.simulans*, *S.sciuri*, *S.hominis*, *S.xylosus*, *S.haemolyticus*, *S.epidermidis*, *S.vitulinus*, *S.warneri* ve *S.saprophyticus* olduğu rapor edilmiştir¹. Spellberg ve arkadaşları²⁹ yayınladıkları IDSA raporunda, hayvanlarda ve insanlardaki birçok patojenin son yıllarda çoklu antibiyotik direnci (ÇAD-MDR) geliştirdiklerini belirtmiştir. Son yıllarda Karbapenemase üreten *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ile extended spektrum beta laktamaz (ESBL) aktiviteli *E.coli* ve *Enterobacter* spp. türleri rapor edilmiş ayrıca New Delhi Metallo- β -Lactamase 1 (NDM1) adlı *E.coli* ve *Klebsiella* suşları da Hindistan ve İngiltere'den izole edilmiştir. Aynı çalışmada çoklu antibiyotik direnç özelliği taşıyan bu bakterilere toplu olarak ESKAPE (*Enterococcus* spp, *Staphylococcus* spp, *Klebsiella* spp, *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp. ve ESBL (*Enterobacter* spp, *E. coli*) adı verilmektedir.

Bakterilere karşı gelişen antimikrobiyal direnç şablonlarının düzenli olarak izlenmesi, tedavide seçilecek ilaçların belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Bu amaç doğrultusunda çalışmamızda, subklinik mastitisli sığırlardan alınan süt örneklerinde *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) dışındaki diğer bakterilerin prevalansı saptanmıştır. İzole edilen bakterilerin Kirby Bauer Disk Difüzyon Tekniği ile sekiz farklı antibiyotik grubuna ait antimikrobiyale karşı duyarlılıkları ile MDR varlığı değerlendirilmiştir.

Materyal ve Metod

Örneklerin Toplanması

Ekim 2010 ile Temmuz 2012 tarihleri arasında Bursa ve ilçeleri (Nilüfer, Karacabey, Yenişehir, Büyükorhan, Orhaneli) ile Edirne, Lüleburgaz, Çanakkale, Afyonkarahisar ve Balıkesir illerinde yer alan 100 baştan büyük kapasiteli 50 farklı Holstein sürüsünden California Mastitis Testi (CMT) ile toplam 1600 hayvana ait 6400 meme lobu subklinik mastitis yönünden tarandı. Örneklerin elde edildiği bütün çiftliklerde rutin monitoring uygulamaları yapılmaktaydı. Subklinik mastitisli olduğu saptanan 480 adet CMT pozitif süt örneği bakteriyolojik analiz amacıyla steril santrifüj tüplerine prosedürüne uygun şekilde alındı ve bakteriyolojik inceleme amacıyla Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına soğuk zincirde getirilerek analiz edildi.

Bakteriyolojik inceleme

Süt örnekleri 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra dipteki sedimentten %7 defibrine koyun kanlı Colombia Agar (Biomérieux®-1001499590), Mac Conkey Agar (Oxoid CM115) ve Levine Eosine Methylen Blue Agar (Oxoid®- CM0069B) ile % 5 Egg Yolk Tellurite Emulsion (Oxoid®-SR0054C) içeren Baired Parker Agara (Oxoid® CM 961) ekimler yapıldı. Besiyerleri 24 saat 37 °C aerobik koşullarda inkübe edildi. Brucella Medium Base (Oxoid®-CM0169) içeren *Brucella* Selective Supplement (Oxoid® SR83) ve *Listeria* Selective Supplement (Oxoid®-SR0140E) içeren *Listeria* Selective Agar (Oxoid®-CM0856B), sırasıyla *Brucella* spp. ve *Listeria* spp izolasyonu amacıyla kullanıldı. Örnekler ayrıca *Mycoplasma* Agar Base (Oxoid®-CM0401B) içeren *Mycoplasma* Supplement G (Oxoid-SR0059C) 'ye ekildi. Ayrıca tüm örnekler Sabouraud Dextrose Agara (Oxoid CM41)

fungal üremenin saptanması amacıyla direkt olarak ekildi. Tüm besiyerleri uygun koşullarda inkübe edildiler. Inkübasyon süresi sonunda besiyerleri yüzeyindeki şüpheli koloniler ilgili etkenler yönünden değerlendirildi. İdentifikasyon amacıyla *Staphylococcus* spp. şüpheli koloniler API-Staph® (bioMérieux, Lyon, France), Gram negatif basiller ise API-20E® (bioMérieux, Lyon, France) ticari identifikasyon paneli ile kullanım kılavuzunda belirtilen şekilde identifiye edildi ve sonuçlar API-Web® sisteminde değerlendirildi. Diğer bakterilerin identifikasyonu ise rutin tanı yöntemleri doğrultusunda yapıldı³⁷.

Antibiyogram

Bakterilerin antibiyotik dirençleri Kirby Bauer Disk Diffusion testi ile incelendi. Bu amaçla izolatların her biri Mueller Hinton Agara (Oxoid- CM0337) prosedürüne uygun şekilde ekildi ve inkübasyon süresi sonunda oluşan zonlar Eucast 2012'nin direktiflerine uygun olarak değerlendirildi². Çalışmada, KNS izolatlarının antimikrobiyal duyarlılıklarını belirlemek amacıyla penisilin, sefalosporin, florokinolon, makrolid, aminoglikozid, glikopeptid, tetrasiklin ve diğerleri olmak üzere sekiz farklı gruptan toplam 14 antibiyotik diski kullanıldı. KNS izolatları için kullanılan antibiyotik diskleri Meticillin (5 mg), Oxacilin (1 mg), Vankomisin (30 mg), Cefoxitin (30 mg), Erithromycin (15 mg), Mupirocin (10 mg), Tetracycline (30 mg), Gentamicin (10 mg), Penicilin (10 unit), Ampicillin (10 mg), Enrofloxacin (5mg), Trimethoprim/Sulph (25 g), Clindamycin (2mg), Ciprofloxacin (5mg) olarak belirlendi. Diğer bakteriler için ise karbapenem, makrolid, penisilin, sefalosporin, tetrasiklin, aminoglikozid, florokinolon ve diğerleri olmak üzere toplam sekiz farklı gruptan toplam 14 farklı antibiyotik diski; Imipenem (10µg) Tilmicosin (15µg), Amoxycillin (30µg) Cefoxitin (30 mg) Erityromycin (15µg) Mupirocin (10 mg) Tetracycline (30 mg) Gentamicin (10 mg) Penicilin (10 unit) Cefazolin (30µg) Enrofloxacin (5mg) Trimethoprim/Sulph (25 g) Clindamycin (2mg) Ciprofloxacin (5mg) kullanıldı. *Mycoplasma* spp, *Brucella* spp ve mantar etkenleri için antibiyogram uygulanmadı. Çalışmada, referans suş olarak *S. aureus* ATCC 25923 ve *E.coli* 25922 (Microbiologics®) kullanıldı.

Bulgular

Çalışmamızda bakteriyolojik olarak subklinik mastitise neden olan *S.aureus* dışındaki

diğer izolatlar değerlendirildi. Aynı proje kapsamında saptanan 151 adet (%31.45) *Staphylococcus aureus* izolatu bu çalışmaya dahil edilmedi. Çalışmada toplam 201 adet bakteri izole edildi ve bunlardan 48 adedi (%23.88) KNS olarak tanımlandı. KNS içinde yer alan izolatlar 15 adet *S.xylosus* (% 7.46), 14 adet *S.epidermidis* (% 6.96), 7 adet *S.hyicus* (% 3.48), 7 adet *S.chromogenes* (% 3.48), 2 adet *S.hominis* (% 0.99), 1 adet *S.saprophyticus* (% 0.49), 1 adet *S.haemolyticus* (% 0.49) ve 1 adet *S. cohnii* (% 0.49) olarak tanımlanıp tanımlanmadı. Çalışmada saptanan KNS'lerin antibiyotik duyarlılık yüzdeleri Tablo 1'de sunulmaktadır.

Çalışmada KNS dışında elde edilen diğer bakteri türleri ve ilgili bakterilerin çeşitli antibiyotiklere duyarlılık yüzdeleri Tablo 2'de yer almaktadır. Buna göre subklinik mastitisli sütlerden *Staphylococcus* spp. dışında farklı türlerden olmak üzere toplam 153 adet bakteri izole edildi. Çalışmamızda en sık izole edilen bakteriyel ve mikotik etkenler dikkate alındığında; 32

adet *Streptococcus agalactia* (% 15.92) , 23 adet *E.coli* (% 11.44), 21 adet *Streptococcus uberis* (% 10.44), 21 adet *Bacillus subtilis* (% 10.44), 19 adet *Corynebacterium* spp (% 9.45), 11 adet *Mycoplasma bovis* (% 5.47), 8 adet *Brucella abortus* (% 3.98), 6 adet *Arcanobacter pyogenes* (% 2.98), 3 adet *Klebsiella pneumonia* (% 1.49), 3 adet *Proteus mirabilis* (% 1.49), 2 adet *Pseudomonas aeruginosa* (% 0.99), 2 adet *Enterococcus faecalis* (% 0.99) , 2 adet *Neisseria* spp. (% 0.99) olarak sıralanmaktadır. Ayrıca çalışmada elde edilen fungal izolatlar ise 53 adet *Candida albicans* (% 91.37), 2 adet *Aspergillus* spp. (%3.44) , 2 adet *Penicillium* spp. (%3.44) ve 1 adet *Rhizopus* spp (%1.72) olarak tanımlanıp tanımlanmadı. Çalışmamızda KNS izolatlarının çoklu antibiyotik dirençleri (ÇAD-MDR) ise Tablo 3'de yer almaktadır. Sonuçta toplam 201 adet bakteri izolasyonu yapılmış ve 49 adet izolatın (%24.37) birden fazla antimikrobiyal ajana karşı direnç geliştirdiği saptanmıştır.

Tablo 1: Çalışmada elde edilen Koagulaz negatif *Staphylococcus* türleri ve antibiyotik duyarlılıkları

Table 1: Coagulase negative *Staphylococcus* species isolated in this study and their antibiotic susceptibility

Antibiyotik Diski	<i>S.xylosus</i>	<i>S.hyicus</i>	<i>S.chromogenes</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.hominis</i>	<i>S.saprophyticus</i>	<i>S.cohnii</i>
Izolasyon Sayısı***	15	7	7	14	2	1	1
Meticillin (5 mg)	S* (%53.3)	S (%100)	S (%100)	S (%92.8)	S (%100)	S (%100)	S (%100)
Oxacilin (1 mg)	S(%60) I** (%6.6)	S (%85.71) I (%14.28)	S (%100)	S (%85.71) I (%7.2)	S (%100)	S (%100)	S (%100)
Vankomisin (30 mg)	S (%100)	S (%100)	I (%14.28) S (% 85.71)	S (%92.8) I (%7.2)	S (%100)	S (%100)	S (%100)
Cefoxitin (30 mg)	S (%46.6) I (13,3)	S (%85.71)	S (%100)	S(%92.8)	S (%100)	S (%100)	S (%100)
Eritromycin (15 mg)	S (%13.4) I(%20)	S (%71.42)	S (%28.57)	S (%64.28)	S (%100)	S (%100)	S (%50) I (%50)
Mupirocin (10 mg)	S (%93.3)	S (%100)	S (%100)	S (%71.42)	S (%100)	S (%100)	S (%100)
Tetracycline (30 mg)	S(%26.66) I (%6.66)	S (%85.71)	S (%71.42)	S (%57.14)	S (%100)	S (%100)	S (%50)
Gentamicin (10 mg)	S(%15) I (%6.66)	S (%100)	S (% 85.71)	S(%100)	S (%100)	S (%100)	S (%100)
Penicilin (10 unit)	S (%20)	S (%57.1)	S (%42.85)	S (%57.14)	S (%100)	S (% 0)	S (%100)
Ampicilin (10 mg)	S (%100)	S (%100)	S (%100)	S (%71.42)	S (%100)	S (%100)	S (%100)
Enrofloxacin (5mg)	S (%20) I (%60)	S (%100)	S (%100)	S (%92.8) I (%7.2)	S (%100)	S (%100)	S (%100)
Trimethoprim/Sulph (25g)	S (%93.33)	S (%100)	S (%100)	S (%85.71)	S (%100)	S (%100)	S (%100)
Clindamycin (2mg)	S (%26.6)	S (%71.42)	S (%42.85)	S (%100)	S (%100)	S (%100)	S (%100)
Ciprofloxacin (5mg)	S (%80)	S (%100)	S (%100)	S (%100)	S (%100)	S (%100)	S (%100)

S (Susceptible): Duyarlı **I (Intermediate):Orta derecede duyarlı ****S.haemolyticus* izolatına antibiyogram uygulanmadı.

Tablo 2: Çalışmada elde edilen diğer bakteriyel izolatlar ve antibiyotik duyarlılıkları**Table 2: Other bacterial isolates obtained in this study and their antibiotic susceptibility**

Antibiyotik Diski	<i>E.coli</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Coynebacterium</i> spp.	<i>A. pyogenes</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Klebsiella</i> spp.
Izolasyon sayısı*	23	53	19	6	2	3
Tilmicosin (15µg)	**S (%50) ***I (%20)	S (%80)	S (%0)	S (%100)	S (% 0)	S (%0)
Amoxycillin (30µg)	I (%60) S (%20)	I (%45) S (%20)	S (%33.3)	S (%33.3)	S (%100)	S (%100)
Cefoxitin (30 mg)	I (%20) S (%50)	S (%40)	S (%33.3)	S (%0)	S (% 0)	S (%100)
Erythromycin (15 mg)	S (%10)	I (%25) S (%30)	S (%33.3)	S (%33.3)	S (% 0)	S (%0)
Mupirocin (10 mg)	S (%70)	S (%80)	S (%33.3)	S (%33.3)	S (% 100)	S (%0)
Tetracycline (30 mg)	S (%20)	S (%85)	S (%33.3)	S (%0)	S (% 0)	S (%0)
Gentamicin (10 mg)	S (%90)	I (%10) S (%40)	S (%33.3)	S (%100)	S (% 100)	S (%100)
Penicilin (10 unit)	S (%10)	S (%30)	S (%0)	S (%33.3)	S (% 0)	S (% 0)
Imipenem (10µg)	S (%100)	S (%85)	S (%66.6)	S (%33.3)	S (% 100)	S (%100)
Enrofloxacin (5mg)	S (%40)	I (%50) S (%25)	I (%100)	S (%33.3)	S (% 0)	S (%100)
Trimethoprim/Sulph (25g)	S (%80)	S (%80)	S (%100)	S (%66.6)	S (% 0)	S (%100)
Clindamycin (2mg)	I (%20) S (%20)	S (%70)	S (%33.3)	S (%33.3)	S (% 0)	S (%0)
Ciprofloxacin (5mg)	I (%60)	S (%40)	S (%66.6)	S (%33.3)	S (% 0)	S (%100)

* *Mycoplasma* spp., *Brucella* spp., dışında *Bacillus* spp, *Neisseria* spp., *Proteus* spp, ve *Pseudomonas* spp izolatlarına antibiyogram uygulanmadı.

** S(Susceptible): Duyarlı ***I (Intermediate): Orta derecede duyarlı

Tablo 3: İzole edilen KNS'lerde çoklu antibiyotik direnç (MDR)**Table 3: Multiple Drug Resistance of CoNS isolated in this study**

KNS	Antibakteriyel grubu	Izolasyon sayısı
2'li antibakteriyel grubu	Macrolid+Penicillin	5
	Macrolid+Tetracycline	3
	Penicillin+Aminoglikozid	1
3'lü antibakteriyel grubu	Cephalosporin + Penicillin+Makrolid	3
	Tetrasilin+Penicillin+Makrolid	4
4'lü antibakteriyel grubu	Cephalosporin	1
	+Penicillin+Makrolid+Florokinolon	1
	Tetracycline+ Cephalosporin +Penicillin+Makrolid	1
5'li antibakteriyel grubu	Penicilin+Makrolid+Florokinolon+Aminoglikozid+ Cephalosporin	1
	Penicillin+Makrolid+Florokinolon+ Cephalosporin +Tetracycline	1
	Penicillin+Makrolid+ Aminoglikozid+Tetracycline+ Cephalosporin	2
	Penicilin+Makrolid+Florokinolon+Aminoglikozid+ Cephalosporin +Tetracycline	1

Tartışma

Süt sığırlarında mastitise neden olan başta *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. olmak üzere birçok patojen bulunmaktadır^{4,37}. Dünya-

da ve Türkiye'de subklinik sığır mastitislerinde bakteriyel patojenlerin dağılımı ile ilgili raporlar bildirilmektedir^{5,12,16,22,30,34,38}. Fox¹¹, ilk doğumunu yapan düvelerdeki infeksiyöz mastitis etkenlerinin prevalansını araştırmış ve farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda % 43 ile % 87.7 arasında değişen oranlarda etken saptandığını belirtmiştir. Aynı çalışmada KNS kaynaklı mastitis olgularının % 5.2 ile % 43 arasında olduğu belirtilmiştir. İsveç'te yapılan bir çalışmada²² 226 farklı çiftlikten 583 meme lobu sublinik mastitis yönünden taranmış, bakteriyolojik açıdan pozitif olan örnekler baz alındığında izole edilen bakterilerin dağılımının; *S. aureus* %,31, CNS %27, *Str. dysgalactiae* %15, *Str. uberis* %14, *E. coli* % 4.8, ve *Streptococcus* spp. %3.1 şeklinde olduğu saptanmıştır. İrlanda'da yapılan başka bir çalışmada ise 15 farklı işletmeden 285 sığır taranmış, sırasıyla *Staphylococcus aureus* (21%), *Streptococcus uberis* (% 19), KNS (% 9) ve koliform bakteri (% 3) izole etmişlerdir⁵. Türkiye'nin birçok bölgesinde benzer özellikte çalışmalar yapılmıştır^{15,16,30}. Bandırma'da Çokal ve Konuş⁷ mastitisli süt örneklerinden %75 oranında aerobik bakteri izole etmişler ve sırasıyla *S.aureus* (% 41), KNS (% 17), *Enterobacter aerogenes* (% 12), *E.coli* (% 9.4), *Streptococcus* spp. (% 8.5), *Klebsiella pneumonia* (% 6.8), *Citrobacter* spp. (% 5.1) ile

Bacillus spp. (% 2.6) olarak tanımlanmışlardır. Arda ve İstanbulluoğlu³ ise Türkiye’de bölgesel olarak mastitislere sebep olan aerobik, mikroaerofilik ve anaerobik bakterileri araştırmış ve çalışma sonucunda *S.aureus* (% 50.3), *S.epidermidis* (% 11.4), *Streptococcus agalactia* (% 8.7), *Klebsiella pneumonia* (% 6.7), *E.coli* (% 5.3), *Streptococcus uberis* (% 4.6), *Proteus vulgaris* (% 4.6), *Corynebacterium bovis* (% 4), *Corynebacterium pyogenes* (% 1.3), *Pseudomonas aeruginosa* (% 1.3), ile *Candida albicans* (% 1.3) olarak tanımlanmışlardır. Kaya ve arkadaşları¹⁴ tarafından yapılan bir araştırmada klinik mastitisli ineklerden alınan 141 adet süt örneği patojenik mikroorganizmalar yönünden araştırılmış ve örneklerden *S.aureus* 80 (% 57), *Streptococcus* spp (%12), *E.coli* 7 (%5), *Lactobacillus* 7 (%5), *Klebsiella pneumonia* 7 (%5), *Corynebacterium pyogenes* 6 (%4), *Pseudomonas aeruginosa* 4 (%3) ile *Candida albicans* 18 (%13) oranında tanımlanmıştır. Bu çalışmada izole edilen toplam bakteri sayısı dikkate alındığında aerobik ve mikroaerofilik bakteriler, sırası ile; *S.xylosum* (15; % 7.46), *S.epidermidis* (14; % 6.96), *S.hyicus* (7; % 3.48), *S.chromogenes* (7; % 3.48), *S.hominis* (2; % 0.99), *S.saprophyticus* (1 % 0.49), *S.haemolyticus* (1; % 0.49) ve *S. cohnii* (1; % 0.49) ile *Streptococcus agalactia* (n: 32; % 15.92) , *E.coli* (n:23; % 11.44), *Streptococcus uberis* (n:21; % 10.44), *Bacillus subtilis* (n:21; % 10.44), *Corynebacterium* spp (n:19; % 9.45), *Mycoplasma bovis* (n:11; % 5.47), *Brucella abortus* (n:8, % 3.98), *Arcanobacter pyogenes* (n:6; % 2.98), *Klebsiella pneumonia* (n: 3; % 1.49), *Proteus mirabilis* (n:3; % 1.49), *Pseudomonas aeruginosa* (n:2; % 0.99), *Enterococcus faecalis* (n:2; % 0.99), *Neisseria* spp. (n:2 % 0.99) olarak saptanmıştır. Ayrıca çalışmada elde edilen fungal izolatlar ise *Candida albicans* (n:53; % 91.37), *Aspergillus* spp. (n:2; %3.44), *Penicillium* spp.(n:2; %3.44), *Rhizopus* spp (n:1; %1.72) olarak tanımlanmıştır. Çalışmada bakteriyel izolatlar ele alındığında KNS kaynaklı mastitis etkenleri %23.88’lik oranıyla etiyolojik açıdan ilk sırada yer almaktadır. Aynı proje kapsamında incelenen süt örneklerinden ayrıca 151 adet *Staphylococcus aureus* tanımlanmış olup, bu veri henüz yayınlanmamıştır. KNS ve *S.aureus* izolasyon oranı bir arada değerlendirildiğinde bakteriyel izolatlar içinde % 56.53’lük oranıyla *Staphylococcus* spp.’ler mastitisin infeksiyöz nedenleri arasında başı çektiği görülmektedir. Ardından, çalışmamızda izole edilen bakterilere oranlandığında %26.36’lık payıyla *Streptococcus* spp.’ler ikinci

sırada gelmektedir. Koliform bakterilerin (*E.coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp.) izole edilen toplam bakteri popülasyonu içinde oranı ise %14.42 olarak saptanmıştır. Çalışmamız ayrıca daha önce meme patojenleri arasında ön sıralarda yer almayan etkenlerin (*Mycoplasma* spp., *Brucella* spp.) de izole edilmiş olması ve özellikle generalize infeksiyon etkeni olan *Brucella* spp.’nin sığır sütlerinden saçılımının saptanması açısından da dikkat çekicidir.

Son yıllarda KNS’lerin entansif işletmelerde izolasyon oranının dikkate değer şekilde arttığı bildirilmektedir^{18,25}. Persson ve arkadaşları²², KNS kaynaklı mastitislerin oranını %16.4 olarak saptarken Schukken ve arkadaşları²⁸, yaptıkları çalışma sonrasında sürülerdeki KNS kaynaklı mastitis olgularının oranının sürü bazında hesaplandığında %15 ve hayvan bazında ise % 9 olduğunu saptamışlardır. Dünyada ve ülkemizde KNS kaynaklı mastitislerde tür dağılımına yönelik birçok çalışma bildirilmiştir^{10,25,33,36,40}. Buna göre sığırlarda subklinik mastitislerden sorumlu KNS’lerin en çok *S.chromogenes* ve *S.simulans* daha az sıklıkta ise *S. hyicus* ve *S.epidermidis* kaynaklı oldukları belirtilmiştir^{25,32,33}. Febler ve arkadaşları¹⁰ Almanya’da sığır mastitislerinden API 32 *Staphylococcus* ticari identifikasyon kitiyle izole ettikleri 121 adet KNS suşunu sırasıyla *S.chromogenes* (n: 27), *S.simulans* (n:22), *S. warneri* (n:16), *S.epidermidis* (n: 14), *S.haemolyticus* (n:13), *S.xylosum* (n:9) olarak tanımlanmıştır. Diyarbakır ve çevresinde yapılan bir araştırmada subklinik mastitisli ineklerden Phoenix ID/AST (BD Phoenix™) paneli ile etken identifikasyonu sonucunda *S.epidermidis* (%7.46) ve *S.haemolyticus* (% 10.07) tanımlanmış ve toplam mikroorganizma sayısı ile oranlandığında KNS kaynaklı mastitis etkenlerinin % 18.65 oranında olduğunu saptanmıştır⁴⁰. Çalışmamızda izole edilen KNS’ler arasında *S.xylosum* (15; % 7.46) ve *S.epidermidis* (14; % 6.96) en çok tanımlanmış türler olarak saptanmıştır. Diğer çalışmalardaki KNS profili ile karşılaştırıldığında bu çalışmadaki bulguların, Türkiye’den izole edilen KNS türleri ile kısmen uyum gösterdiği ancak diğer ülkelerdeki izolat profili ile aralarında farklılıklarının bulunduğu dikkati çekmiştir. Bu farklılıkların coğrafi özelliklerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Mastitis etiyolojisinde yer alan bakterilerin antimikrobiyal ajanlara duyarlılık ve dirençlilik özellikleri klinik olgularda efektif tedavinin yapılabilmesi için oldukça önem taşımaktadır. Mastitis olgularından elde edilen KNS izolatla-

rının penisilin grubu antibiyotiklere karşı oluşan direnç durumu son yıllarda birçok araştırmaya konu olmuştur^{10,19,22,36,38}. Sawant ve arkadaşları²⁷ tarafından sığır sütlerinden izole edilen 10 farklı KNS türüne ait izolatın antimikrobiyal duyarlılığı Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ile araştırılmış ve KNS'lerin çoğunluğunun ampicillin, oksasillin, cephalothin ve ceftiofour'a duyarlı olduğu bulunmuştur. Ancak izole edilen MDR özellikli *S.epidermidis* (n: 12) türlerinin ampicillin, erythromycin, methiciline dirençli oldukları ve Pulsed Field Gel Elektroforezle (PFGE) yapılan tiplendirmeler sonrasında genotipik olarak insanlardan izole edilen türlerdeki aynı antimikrobiyal direnç ve virulens özelliklerini paylaştıkları raporlanmıştır. Türütoğlu ve arkadaşları³⁶ 136 adet KNS suşu ile yaptıkları antibiyotik duyarlılık çalışmasında 31 adet izolatın fenotipik olarak metisilin, penisilin G, ampicillin ve amoxycillin clavulanic acid'e karşı dirençli olduklarını saptamıştır. Afyonkarahisar bölgesinde yapılan bir çalışmadan izole edilen 146 adet KNS izolatının antibiyotik direnç özellikleri incelenmiş, buna göre %74'lük oranla penisilin G'nin en yüksek direnç oranına sahip olduğu ve bu oranı ampisilin (%68.5), amoksisilin (%62.3), sefoksitin (%61.6), kloksasilin (%59.6) ve oksasilin (%58.9)'in izlediği belirtmiştir³¹. Çalışmamızda Kirby Bauer Disk Diffüzyon Testi ile fenotipik olarak incelenen *S.xylosus*'larda ampisilin dışındaki penicillin grubu antibiyotiklere %40-80 arasındaki oranlarda direnç geliştiği ve bu direncin ülkemizde yapılan diğer çalışmalarla da benzer oranlarda olduğu saptanmıştır. Aynı etken ampisiline %100 duyarlılık göstermiştir. Aynı etkenin tetrasiklin grubu antibiyotiklere %66.68 ve *S.aureus*'larda β -laktam direncinin belirlenmesinde kullanılan Cephoxitine ise % 40.1 oranında dirençli olduğu saptanmıştır. Çalışmada elde edilen *S.xylosus* izolatları makrolid grubu antibiyotiklere %66.6 ile %73.4 dirençliyken, florokinolonlardan enrofloksasine %60 oranında orta derecede duyarlılık (I) ve %20-80 arasında direnç göstermiştir. *S.epidermidis*'te ise β -laktam direnci %7.92 ile %42.86 arasında ölçülmüştür. Aynı tür etkenin tetracycline grubu antibiyotiklere direnci %42.86 olarak saptanmıştır. Sütten izole edilen diğer KNS'lerden olan *S.hyicus*'un ise penisilin-G'ye % 42.9, sefalosporinlere %14.29 dirençli olduğu, florokinolonlara %100 duyarlılık gösterdiği tespit edilmiştir. *S.xylosus* ve *S.epidermidis* dışında diğer KNS izolatlarının enrofloksasin ve mupirosine, *S.epidermidis* dışındaki diğer KNS izolatlarının ise ampisiline %100 duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Subklinik mastitislerde koliform grubu etkenlerin de büyük önemi vardır. Hogan ve Smith¹² genellikle perakut mastitisten sorumlu olan *E.coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Proteus spp.*'nin sıklıkla izole edilen türler olduğunu ve genellikle perakut mastitisten sorumlu olup bazen tekrarlayan enfeksiyonlara da neden olabildiklerini belirtmişlerdir. Son yıllarda hayvanlardan izole edilen koliform grubu bakterilerin de florokinolonlar başta olmak üzere antibakteriyellere karşı direnç geliştirdiği bilinmektedir^{6,8}. Kaya ve ark.¹⁴, Aydın ve yöresinde ineklerde klinik mastitise neden olan mikroorganizmaları ve bunların antibiyotiklere olan duyarlılıklarını araştırmışlar ve izole edilen *E.coli* izolatlarının % 28.5'inin enrofloksasine,% 41.6'sının danofloksasin'e, %14.2'sinin gentamisine duyarlı olduğunu saptamışlardır. Antimikrobiyellere yüksek oranda direnç gelişimi (ESBL-Extended spectrum β -lactamase activity) araştırılan diğer bir çalışma da Dinç ve ark. tarafından⁸ yapılmıştır. Çalışmada sığırlarda mastitis kaynaklı *E. coli* suşlarında Kirby Bauer disk diffüzyon yöntemi ile GSBL tarama testi, fenotipik GSBL doğrulama testi ve 12 adet antibiyotik için *in vitro* duyarlılık testleri yapmış ve incelenen izolatlarda en yüksek dirençlilik oranlarının sırasıyla eritromisine (%69.6), ampisiline (%39.1), tetrasikline (%34.8), nalidiksik aside (%25.0), kloramfenikole (%22.8), trimetoprim-sülfametaksazole (%21.7) ve amoksisilin klavulonik aside (%21.7) olduğunu belirtilmiştir. Ayrıca izolatların %54.3'ünün iki veya daha fazla sayıda antibiyotiğe karşı dirençli olduğu belirlenerek mastitise neden olan *E. coli* suşlarında yüksek oranda çoğul ilaç direncinin geliştiğini saptamışlardır. Çalışmamızda elde edilen *E.coli* izolatlarında ise β -lactamlardan Penisilin-G'ye karşı %90 direnç geliştiği, amoxycillin'e ise %60 oranında orta derecede duyarlılık ve % 20 oranında da direnç geliştiği saptanmıştır. Aynı grup etkenlerde sefalosporinlere %0-%30 oranında direnç ortaya konulmuştur. Çalışmada elde edilen *E.coli* izolatlarının florokinolon direnci ciprofloxacin ve enrofloksasine göre sırasıyla %40-%60 değerlerinde olup dikkat çekicidir. *E.coli* izolatlarının makrolid direnci ise %60-%90 olarak bulunmuştur. Karbapenemlere karşı koliform bakterilerin (*E.coli*, *Klebsiella spp.*) %100 duyarlı olduğu saptanmıştır. Çalışmada izole edilen diğer bakterilerin de birçok grup antibakteriyelle yüksek oranda dirençli olduğu dikkat çekmektedir.

Hayvanlardan izole edilen bakterilerdeki çoklu antibiyotik direnci ve çözüm önerileri son yıllarda sıklıkla tartışılmaktadır^{13,39}. Hayvanlarda MRSA ile (Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*), ESBL aktiviteli Gram negatif bakterilerin MDR özellikleri günümüzde araştırılmaktadır^{9,10}. Çalışmamızda da birden çok antibakteriyeye dirençli olduğu saptanan toplam 23 adet KNS izolatının direnç profili Tablo 3'de yer almaktadır. Çalışmamızda saptanan 10 adet *S.xyloso*, 8 adet *S.epidermidis*, 3 adet *S.chromogenes*, bir adet *S.hyicus* ve bir adet *S.haemolyticus* MDR özelliği taşımaktadır. KNS dışında antibiyogramı yapılmış 26 adet bakterinin de MDR özelliği taşıdığı saptanmıştır. Buna göre 2'li, 3'lü, 4'lü,5'li, ve 6'lı antibakteriyel grubuna direnç gelişen izolat sayıları sırasıyla 1,3,7,10, ve 5 olarak saptanmıştır. Bu çalışmada Kirby-Bauer Antibiyotik duyarlılık testi yapılan toplam 154 adet izolatın 49'unun (%31.81) birden fazla antimikrobiyal ajana karşı direnç geliştirdiği ortaya konmuştur.

Sonuç olarak subklinik mastitis kökenli bakterilerde antibiyotik direncinin dikkat çekici düzeyde olduğu gözlenmiştir. Çoklu antibiyotik direnci de göz önünde bulundurulduğunda, ülkemizde antimikrobiyal direnç izleme programlarının oluşturulması ve bu program çerçevesinde Veteriner Hekimlik uygulamalarında kontrollü antibiyotik kullanımının sağlanması büyük önem taşımaktadır.

Teşekkür

Yazarlar, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Sayın Aysin ŞEN'e editöriyel katkılarından dolayı teşekkür eder. Bu çalışmanın bir bölümü Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi UAP(V) -2009/12 no'lu proje tarafından desteklenmiştir.

Referanslar

1. Anon. 2011. Iowa State University. The Center for Food Security and Public Health & Institute for International Cooperation in Animal Biologics. Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA). <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/mrsa.pdf>
2. Anon, 2012. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_3.1.pdf (Accessed at 20 December 2012)
3. Arda M., İstanbulluoğlu E., 1980. Mastitislere sebep olan aerobik, mikroaerofilik anaerobik bakterilerin izolasyon ve idantifikasyonu üzerinde çalışmalar, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu Veterinerlik ve Hayvancılık Araştırma Grubu, Proje no: VHAG-304.
4. Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N., Kahraman, M., Akay, Ö., Ilgaz, A., İzgür, M., Diker, K.S., 1997. Özel Mikrobiyoloji. Epidemiyoloji, Bakteriyel ve Mikotik infeksiyonlar. Gram Pozitif Koklar, bölüm 2. Prof. Dr. Necdet Leloğlu pp: 31-44, Fakültatif Anaerobik Gram negatif çomaklar, Bölüm 3, Prof.Dr.Müjgan İzgür, pp: 45-58. Editör: Mustafa Arda, 4. Baskı, Medisan Yayın serisi No: 26, Dışkapı, Ankara.
5. Barrett, D.J., Healy, A.M., Leonard F.C., Doherty M.L., 2005. Prevalence of pathogens causing subclinical mastitis in 15 dairy herds in the R. I. Irish Vet. J., 58, 333-337.
6. Cengiz, M., Buyukcangaz, E., Arslan, E., Mat, B., Sahinturk, P., Sonal, S., Gocmen, H., Sen, A., 2012. Molecular characterisation of quinolone resistance in *Escherichia coli* from animals in Turkey. Vet Rec. doi: 10.1136/vr.100719, 1-4.
7. Çokal, Y., Konuş, R., 2012. Subklinik mastitisli ineklerin sutlerinden aerobik bakterilerin izolasyonu, Balıkesir Sağlık Bil. Derg. 1, (2) 65-69.
8. Dinç G., Ata, Z., Temelli, S., 2012. Sığır mastitislerinden izole edilen *Escherichia coli* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz aktivitesi ve antibiyotik dirençlilik profilinin incelenmesi Ankara. Üniv. Vet. Fak. Derg., 59, 85-88.
9. Fernandez, A.G., Chiaretto, G., Bertini, A., Villa, L., Fortini, D., Ricci, A., Carattoli, A., 2008. Multilocus sequence typing of IncI1 plasmids carrying extended-spectrum b-lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin J. Antimicrob. Chemother. 61, 1229-1233 doi:10.1093/jac/dkn131.
10. Feßler, A.T., Billerbeck, C., Kadlec, K., Schwarz, S., 2010. Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. J Antimicrob Chemother 65: 1576-1582.
11. Fox, L.K., 2009. Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis. Vet. Microbiol. 134, 82-88.
12. Hogan, J., Smith, K.L., 2003. Coliform mastitis. Vet.Res. 34, 507-519.
13. Hunter, P. A., Dawson, S., French, G.L., Goossens, H., Hawkey, P.M., Kuijper, E.J., Nathwani, D., Taylor, D.J., Teale, C.J., Warren, R.E., Wilcox, M.H., Woodford N., Wulf, M.W., Piddock, L.J.V., 2010. Antimicrobial-resistant pathogens in animals and man: prescribing, practices and policies Antimicrob Chemother; 65, Suppl. 1, i3-i17 doi:10.1093/jac/dkp433.

14. Kaya, O., Kırcan, Ş., Güllal, M., Ünal, B., 1999. Aydın yöresinde ineklerde klinik mastitise neden olan mikroorganizmaların saptanması ve bunların antibiyotiklere duyarlılıklarının incelenmesi. *Pendik Vet. Mikrobiol. Derg.*, 30, 25-29.
15. Kuyucuoğlu, Y., Hadimli, H.H., Kenar, B., Şeker, E., 2003. Mastitisli ineklerden izole edilen *Stafilococcus aureus* suşlarının beta laktamaz aktiviteleri ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları. *Vet. Hek. Mikrobiol. Derg.*, 3, 15-20.
16. Macun, H.C., Yağcı, İ.P., Ünal, N., Kalender, H., Sakarya, F., Yıldırım, M., 2011. Kırıkkale’de belirlenen subklinik mastitisli ineklerde Etkin izolasyonu ve antibiyotik direnç durumu. *J. Fac. Vet. Med. Univ. Erciyes.*, 8,(2), 83-89.
17. Myllys, V., Asplund, K., Brofeldt, E., Hirvela-Koski, V., Honkanen-Buzalski, T., Junttila, J., Kulkas, L., Myllykangas, O., Niskanen, M., Saloniemä, H., Sandholm, M., Saranpää, T., 1998. Bovine mastitis in Finland in 1988 and 1995—changes in prevalence and antimicrobial resistance. *Acta. Vet. Scand.* 39, 119–126.
18. Oliveira, M., Bexiga, R., Nunes, S.F., Carneiro, C., Cavaco, L.M., Bernardo, F., Vilela, C.L., 2006. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet. Microbiol.* 118, 133–140.
19. Öncel, T., İça, T., Akan, M., 2004. Beta laktamase production rate and antimicrobial susceptibility of *staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical mastitis cases in Turkey. *Revue Med Vet*, 2004, 155, 7, 385-388.
20. Parker, K.I., Compton, C., Annis, F.M., Weir, A., Heuer, C., McDougall, S., 2007. Subclinical and clinical mastitis in heifers following the use of a teat sealant precalving. *J. Dairy Sci.* 90, 207–218.
21. Pearson, J.K.L., Mackie, D.P., 1979. Factors associated with the occurrence, cause and outcome of clinical mastitis in dairy cattle. *Vet. Rec.* 105, 456–463.
22. Persson, Y., Nyman, A.K.J., Andersson, U.G., 2011. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Vet. Scandinavica*, 53:36.
23. Pitkälä, A., Haveri, M., Pyörälä, S., Myllys, V., Honkanen-Buzalski, T., 2004. Bovine mastitis in Finland 2001—prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci.* 87, 2433–2441.
24. Poelarends, J.J., Hogeveen, H., Sampimon, O.C., Sol, J., 2001. Monitoring subclinical mastitis in Dutch dairy herds. In: *Proceedings of the Second International Symposium on Mastitis and Milk Quality*, Vancouver, British Columbia, 145–149.
25. Pyörälä, S., Taponen, S., 2009. Coagulase-negative staphylococci-Emerging mastitis pathogens. *Vet. Microbiol.*, 134, 3-8.
26. Robertson, J.R., Fox, L.K., Hancock D.D., Gay, C.C., Besser, T.E., 1994. Coagulase positive *Staphylococcus* intramammary infections in primiparous dairy cows. *J.Dairy Sci.* 77, 958-969.
27. Sawant, A.A., Gillespie, B.E., Oliver, S.P., 2009. Antimicrobial susceptibility of Coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. *Vet. Microbiol.*, 134, 73-81.
28. Schukken, Y.H., Gonzales, R.N., Tikofsky, L.L., Schulte, H.F., Santisteban, C.G., Welcome, F.L., Bennett, G.J., Zurakowski, M.J., Zadoks, R.N., 2009. CNS mastitis: Nothing to worry about? *Vet. Microbiol.*, 134, 9–14.
29. Spellberg, B., Blaser, M., Guidos, R.J., Boucher, H.W., Bradley, J.S., Eisenstein, B.I., Gerding, D., Lynfield, R., Reller, L.B., Rex, J., Schwartz, D., Septimus, E., Tenover, F.C., Gilbert, D.N., 2011. Combating Antimicrobial Resistance: Policy Recommendations to Save Lives Infectious Diseases Society of America (IDSA)*, IDSA Policy Paper d CID:52 (Suppl 5) d S397.
30. Şahin, M., Çolak, A., Otlu, S., Aydın, F., Genç, O., Güler, M.A., Oral, O., 1997. Kars yöresi ithal simental ineklerinde sublinik ve klinik mastitislerin görülme oranı ve etkili antibiyotiklerin belirlenmesi. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.* 3, 1, 49-55.
31. Şeker, E., Özenç, E., 2010. Mastitisli inek sütlerinden izole edilen Koagulaz Negatif Stafikokolların Antibiyotik Dirençlilikleri. *Yüzüncü Yıl Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 21 107-111.
32. Taponen, S., Simojoki, H., Haveri, M., Larsen, H.D., Pyörälä, S., 2006. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. *Vet. Microbiol.* 115, 199–207.
33. Taponen, S., Pyörälä, S., 2009. Coagulase negative Staphylococci as cause of bovine mastitis-Not so different from *Staphylococcus aureus*. *Vet. Microbiol.* 134, 29-36.
34. Tel, O.Y., Keskin, O., Zonturlu, A.K., Kaya, N.B.A., 2009. Şanlıurfa yöresinde subklinik mastitislerin görülme oranı, aerobik bakteri izolasyonu ve duyarlı antibiyotiklerin belirlenmesi. *F.Ü. Sağ. Bil. Vet. Derg.* 23, 101-106.
35. Tenhagen, B.A., Koster, G., Wallmann, J., Heuvelink, W., 2006. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J. Dairy Sci.* 89, 2542–2551.
36. Türütoğlu, H., Ercelik, S., Öztürk, D., 2006. Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 50:41-45.

37. Quinn P. J., Carter M.E., Markey B., Carter G.R., 2000. *Clinical Veterinary Microbiology*. Mosby, Harcourt publishers limited, ISBN: 0 7234 1711 3, Section 36, Mastitis, pp: 327-344.
38. Ulusoy, E., İzgür, M., Akay, Ö., Diker, K.S., Aydın, N., Arda, M. 1985. Mastitisli inek sütlerinden izole edilen mikroorganizmaların identifikasyonları ve antibiyotiklere duyarlılıkları üzerinde bir araştırma. *A.Ü.Vet. Fak. Derg.*, 32, 358-370.
39. Vaarten, J., 2012. Clinical impact of antimicrobial resistance in animals *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, 31, 221-230.
40. Yeşilmen, S., Özyurtlu N., Bademkiran S., 2012. Diyarbakır yöresinde Sublinik mastitisli İneklerde etken izolasyonu ve duyarlı antibiyotiklerin belirlenmesi, *Dicle Univ. Vet. Fak. Derg.* 1, 24-29.