

ANKARA BÖLGESİNDEKİ MASTİTİSLİ İNEK SÜTLERİNDE BACILLUS CEREUS ARANMASI

Bacillus cereus detection in milk samples from cows with mastitis in
Ankara Region.

Mübeccel YUMUŞAK ** Ugur KÜÇÜKAYAN **

ÖZET

Bu çalışmada 366 adet mastitisli inek sütü incelemeye alındı. Bunlardan 4 (%1.1)'ünde B. cereus izole ve identifiye edildi. İzole edilen bu suşlar koyunlara intramammal olarak 2 ml. (8×10^{13} germ/ml) verildi. 5. gün kesilen koyunların meme dokusu kesitlerinin histopatolojik muayenesinde Galactophoritis et mastitis catarrhalis acuta, 7. günden sonra kesilenlerde ise mastitis interstitialis nonpurulenta geliştiği saptandı.

B. cereus'un ineklerde ve koyunlarda bir mastitis etkeni olarak düşünülmesi gerektiği kanısına varıldı.

SUMMARY

In this research project 366 cow milk samples with mastitis were examined. B. cereus was isolated and identified from 4 samples (1.1 %). This isolated strains were inoculated to sheep by intramammary 2 ml (8×10^{13} germ/ml) each. In histopathologic examination of mammary tissue sections from sheep slaughtered five days after inoculation, Galactophoritis et mastitis catarrhals acuta and slaughtered seven days after inoculation, mastitis. interstitialis nonpurulenta was observed. It was concluded that B. cereus should be considered as a mastitis agent in cattle and sheep.

* TAGEM - HSA - 04-B-19 Nolu Bakanlık Araştırması

** Etlik Veteriner Kont. ve Araşt. Enst. - ANKARA

GİRİŞ

Temel gıda maddelerinden birisi olan süt, yurdumuzda inek, koyun, keçi ve mandadan elde edilmektedir. Bilindiği gibi sütünden en çok yararlanan hayvan inektir. Ülkemizde süt ineği sayısı çok olmasına rağmen süt verimi oldukça düşüktür, bunun nedenlerinden birisi de mastitistir. Bu bakımdan süt üretiminin azalmasına ve kalitesinin bozulmasına neden olan mastitis düşünülmesi gereken önemli bir hastalıktır.

Mastitis hastalığının şekillenmesinde çevresel, edinsel, sağım faktörlerinin etkisinin yanında en önemli faktör mikroorganizmalardır. Mastitis polimikrobiel etyolojiye sahip olan bir hastalıktır. Başta bakteriyel, viral mantar ve nonspesifik etkenler gelmektedir. Bakteriyel etkenlerden stafilokoklar, streptokoklar, koliform bakteriler (E.coli, Aerobacter aerogenes, vs.) C.pyogenès, Pseudomonas Aeruginosa, Mycobacterium tuberculosis, brucellalar, Pasteurella multocida P.hemolitica, B.cereus ve B.subtilis sayılabilir.

B.cereus bir toprak basili olup gıda maddelerine bulaşarak hijyenik olmayan koşullarda uygun çevre faktörlerinin de etkisi ile bol miktarda üreyerek gıda zehirlenmelerine neden olan bir mikroorganizmdir (27).

B.cereus, gram pozitif, aerob spor veren, kısa, hareketli, toprakta bulunan bir basildir ve bu nedenle özellikle bitkilerle çabuk bulaşır. (6,10,23)

B.cereus'un üremesi için gerekli optimal ısı 22°C dir ve üzerindeki derecelerde süratla çoğalırlar. Sporları, yüksek ısı derecelerinde de hayatiyetlerini korurlar. (115 °C 1 saat). Diğer aerob spor verenlerde olduğu gibi çıkardığı proteolitik fermentleriyle proteinleri parçalar ve amokyaka kadar devam eden toksik substansları oluşturur ayrıca endotoksini de vardır (19).

Kanlı agarda, 37°C de 24 saat inkubasyondan sonra, alfa hemoliz veren üzerleri ipek gibi parlak, kenarları gayri muntazam, kısmen R formu veren ve yeşilimsi sarı bir parlaklık gösteren koloniler şeklinde ürer (6).

Mikroskopik bakıda, 24 saatlik taze kültürlerden yapılan frotilerde zincir şeklinde diziler halinde, kısmen saç örgüsü manzarasında, uzunluğu 1-5 mikron arasında değişen, sporlu ve sporsuz çomaklar görülür. Bu gram pozitif çomakların, sporlarının santral ve subterminal bulunuşları ve de basilin orta kısımlarının şişkinliği dikkat çekmektedir. (19).

B.cereus, buyyon kültüründe 30°C de 24 saat inkubasyondan sonra

bulanıklık yapar, yumurta sarılı agarda tipik Lesitinaz reaksiyonu verir (8).

Araştırmacılar *B.cereus*'un göz enfeksiyonları, apse formasyonları, meningitis, septisemi, yara enfeksiyonları, gastroenteritis, koyun ve ineklerde mastitise neden olduğunu bildirmişlerdir (5,11,35).

B.cereus'un neden olduğu sığır mastitisi üzerinde ilk rapor 1957 yılında Brown ve Scherer (1957) tarafından 2 vaka ile bildirilmektedir. Biri hemoraji ve öteki gangrenle karakterize iki sığır mastitis olayından *B.cereus* organizmlerini izole etmişlerdir.

Schiefer ve ark. (1976), hemorajik ve nekrotik odaklarla karakterize ve akut inflamasyon gözlenen inek memesinden *B.cereus*'u izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Ukrayna'da 5 sürüden alınan 325 süt örneğinin bakteriyolojik denemesinin 17 sinde *B.cereus* izole etmişlerdir. (29)

Moustafa ve ark. (1989), Mısırdaki 40 süt ineği üzerinde yaptıkları çalışmalarda önce CMT yaparak subklinik mastitis oranlarını tesbit ettiler. % 60 CMT pozitif olan süt örneklerinin bakteriyolojik yoklamasında % 9.4 den *B.cereus*'u izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Wong ve ark. (1987), yerel marketlerden satın aldıkları 293 süt ürünleri üzerinde yaptıkları çalışmalarda fermente sütlerin % 17 sinde, dondurmanın % 52 sinde, pastörize sütün % 2 sinde ve pastörize meyva veya fındık aromalı içine su karıştırılmış süt ve süt tozunun % 29 unda *B.cereus*'u izole etmişlerdir. Fakat çiğ materyallerde bu oranın daha yüksek oranlarda bulunabileceğini, Ahmet ve ark. (1983), ise fermente sütlerde hiç bir kontaminasyonun olmadığını açıklamışlardır.

Fabbi ve arkadaşları (1989) bir sürüde akut mastitis olduğu tespit edilen 4 inekten aldıkları süt numunesinde *B.cereus*'u izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Jasper ve arkadaşları (1972), kuru ve laktasyon devresindeki ineklere antibiyotik uygulaması sonucu oluşan mastitli 17 inekte ve antibiyotikte *B.cereus*'u izole etmişlerdir.

Ateş ve arkadaşları (1990) mastitisli 81 koyun süt örneklerinin 5 adedinde *B.cereus*'un varlığını tespit etmişlerdir.

Jones ve Turnbull (1981) de bir keçi ve ineklerde 29 *B.cereus* mastitisini rapor etti. Histolojik olarak bir ineğin memesinde interstitial ödem ve fokal alveolitisleri teşhis ettiklerini bildirmişlerdir.

Gloor (1968), enfekte memeden izole edilen B.cereus suşunun 24 saatlik kültüründen 5 ml'sini meme lobuna inokule ederek mastitis oluşturmuştur.

Weidlich (1961) bakteriyolojik denemelerle 5 inekte B.cereus mastitisi geliştirdiğini açıklamışlardır.

Merck ve Burrow (1973), yeni kuzulmuş inekte B.cereus mastitisin ortaya çıkışını rapor etmişler ve izole edilen bu suşlarla bir inek ve bir koyunda deneysel olarak akut mastitisi oluşturmayı başarmışlardır.

MATERYAL ve METOD

Süt örnekleri: Enstitümüzün Mastitis Laboratuvarına gelen mastitisli inek sütlerinden yararlanılmıştır. Çalışmada 366 adet süt numunesi işlenmiştir.

B. cereus deneme suşu (NCTC 10320 and ATCC 11778): Enstitümüzün Mastitis Laboratuvarından temin edilmiştir.

Bacillus anthracis suşu: Enstitümüzün Anthrax Laboratuvarından alınmıştır. (Koyunların eprüvesinde kullanılan laboratuvar suşu)

CMT Ayracı: Auril alkil sülfat= Enstitümüzün Mastitis Laboratuvarından alınmıştır.

A. Besiyerleri;

1. Katı Besiyerleri:

a) Bacillus cereus selective medium (Oxoid)

Bacillus cereus Agar Base (CM 617) 20.5 gr.

Bacillus cereus selective supplement (SR 99) 1 vial

Egg yolk emulsion (SR 47) 25 ml.

Distile su 475 ml

Bu besiyerleri distile suya katılarak laboratuvarlarımızda hazırlandı.

b) Kanlı Agar

c) Plate Count Agar (difco)

2. Sıvı besiyerleri:

a) Nutrient Buyyon

b) Serumlu Buyyon

c) Peptonlu su

B. İdentifikasyon için;

Arabinoz, ramnoz, Ksiloz, fructoz, galactoz, glukoz, mannoz, laktoz, maltoz, rafinoz, deksrin, inulin, salisin, dulsitol, inositol, mannitol, sorbitol, eskulin gibi karbonhidrat fermentasyon testleri kullanıldı (2, 4, 10, 23).

Jelatin hidroliz, sitrat kullanım, nitrat redüksiyon, nişasta hidroliz, indol teşekkülü, kazein hidroliz, üreaz, VP, MR, penisilinaz, yumuşak Jelözde hareket muayenesi, inci testi (neclase fenomeni), koyun kanında kapsül teşekkülü gibi biyokimyasal testler yapıldı (2, 4, 10, 23).

C) Deneysel Enfeksiyon İçin;

Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsünden temin edilen 5 adet 1 aylık kuzulmuş sağmal koyun kullanıldı.

Enstitümüzün Mastitis Laboratuvarından gönderilen mastitisli inek sütleri *Bacillus cereus* selective Besiyerine ve %7 koyun kanlı agara 0.1 cc. direk olarak ekildi. Platelere 30°C 18 saat ve 37 °C 24 saat inkube edildi. İnkubasyondan sonra üreyen koloniler morfolojik ve koloni mikroskobu ile incelendikten sonra şüpheli bulunan izolatlar gramla boyanarak mikroskopla bakıldı. Şüpheli kolonileri çoğaltmak amacıyla nütrient Buyyona ekildi. 37 °C de 24 saatlik kültüründen hareket muayenesi yapılarak hareketli olup olmadıkları incelendi. İzolatlar karbonhidrat fermentasyon ve biyokimyasal aktivite testlerine tabi tutuldu (2, 4, 10, 23). Anthraxtan ayırmak için yumuşak agarda hareket muayenesi, koyun kan kültüründe kapsül oluşumu, inci testi (neclase fenomeni) yapıldı (4,13).

Deneysel enfeksiyon oluşturmak için izolatlar kanlı agara ekilerek 37 °C 24 saat inkubasyona bırakıldı. Üreyen kolonilerden serumlu buyyona geçildi. 4 ve 18 saatlik kültürlerinden 1/10¹³'e kadar FTS ile dilasyonları yapıldı (24). Koloni sayımı yöntemiyle (2) plate count agarda sayımları yapıldı. Çıkan sonuçlara göre orjinal kültürlerden 8x10¹³ mikrop/ml (24). olacak şekilde 2 ml. koyunlara intramammal olarak verildi. İnjesiyondan sonra 4. saat ve 24 saatlik aralarla hergün beden ısıları ölçüldü sütleri alınarak, genel durumları muayene edildi. Aseptik koşullarda alınan süt örneğinden bakteriyolojik ekimler yapılarak etken izole edildi (24).

BULGULAR

Enstitümüzün Antibiyotik Disk Üretimi Laboratuvarlarından alınan *Bacillus cereus* (NCTC 10320 and ATCC 11778) deneme suşu ve Mastit Laboratuvarından alınan sütler kanlı agar ve selektif besiyerlerine ekildikten sonra plakeler 30 °C'de 18 saat ve 37 °C'de 24 saat inkube edildi. 37 °C'de 24 saat üremenin daha uygun olduğu görüldü. 366 adet süt örneğinden izole ve identifiye edilen 4 suşun ve deneme suşunun test sonuçları Tablo-1'de gösterilmektedir. Karbonhidratlardan fruktoz, glukoz, maltoz bütün suşlarda pozitif reaksiyon verirken arabinoz, ramnoz, ksiloz, laktoz, rafinoz, inülin, dulsitol, inositol, mannitol, sorbitol, eskulin negatif reaksiyon göstermiştir. Biyoşimik karakterlerinde ise jelatin hidroliz, nitrat redüksiyonu, nişasta hidroliz, kazein hidroliz, VP, penisilinaz ve lesitinaz 4 suştada pozitif, indol teşekkülü ise hepsinde negatif olduğu görüldü.

B. cereus'u *B. anthracis*'ten ayırmak için yapılan muayenelerin sonuçları Tablo-2'de görülmektedir. Elde edilen 4 suşta buyyonda bulanıklık, kanlı agarda hemoliz yaptığı ve hareket muayenesinde hareketli olduğu tespit edildi. Koyun kanında hiçbir *B. cereus* suşu kapsül oluşturmadı. *B. anthracis* suşunda ise buyyon berrak, hareket yok ve hemoliz oluşturmadı. Fakat koyun kanında kapsül teşekkül etmiş inci testinin ise pozitif olduğu görülmüştür.

Koyunlarda deneysel enfeksiyon oluşturmak için alınan 5 koyun önce muayene edilerek genel durumları kontrol edildi. Sağılan her meme lobundan alınan sütlerde CMT (-) ve yapılan ekim sonuçlarında ise bir kaç tane gram (+) koklar üredi.

Bir kaç gün sağılan 5 koyundan 073 kulak nolu koyunun sütü kesildiğinden bu koyun denemeden çıkarılmıştır. Bu bakımdan 313 kulak nolu koyunun iki meme lobuda kullanılmıştır.

Koyunlara intramammal enjeksiyon yapmak için yapılan koloni sayım sonuçları Tablo-3 te görülmektedir. Bu sonuçlara göre vereceğimiz mikrop miktarı 8×10^{12} mikrop/ml. den 2ml. meme loblarına verilecek şekilde dilusyonlar ayarlandı.

Koyunların inokulasyonundan sonra hergün yapılan muayene sonuçları Tablo-4' te çıkarılmıştır. 3 Nolu *B. cereus* suşu verilen 176 kulak nolu Koyun 4. gün, 1 nolu suş verilen Koyun 7. gün *B. cereus* deneme suşu verilen 448

kulak nolu koyun 5. gün 2 ve 4 nolu suş aynı hayvana (Kulak No 313) 5 gün arayla ayrı ayrı meme loplarna verilerek 2 nolu suş için 5 gün 4 nolu suş için 10 gün kontrol edilerek koyunlar kesilmiştir. Bu sonuçlara göre tabloda da görüleceği gibi *B.cereus* bakterileri bir hafta boyunca izole edildi. Hayvanların beden ısısı enjeksiyondan sonra 4. saatten itibaren yükseldiği ve 48. saatten sonra düştüğü gözlemlendi. Enfekte meme lobları diğer meme loblarına göre enjeksiyondan 4 saat sonra daha fazla şişkin olduğu ve 48 saat sonra normale dönmeye başladığı görülmüştür. Süt sekresyonu ise giderek azalmıştır.

Histopatolojik Bulgular:

3 nolu suş verilen hayvanın gerek klinik muayenesi ve gerekse labarotuar yoklamalarında akut mastitis tespit edilmesine rağmen histopatolojik muayenesinde bir lezyon olmadığı tesbit edildi. Diğer suşlarda ise 5. günde kesilen (suş 2 ve deneme suşu) koyunlarda galactophoritis mastitis catarrhalis acuta gelişmiştir. Buna göre histopatolojik yoklamalarda enfekte memede intralobular interstitial dokuda arteriollerin çevresinde az sayıda nötrofilik ve lenfositik hücre kolleksiyonlarının varlığı saptanmıştır.

Nötrofilik hücreler az sayıda da olsa cellular debrislerle beraber alveollerde de bulunmaktadır. Bazı alveollerde lümeni tıkayan kireçleşmiş kitleler görülmektedir. Bu kireç presipitatları bazı alveollerin lümenlerinde ise daha küçük granüller halinde göze çarpar. memenin çeşitli kesimlerindeki ductus laktiferilerde dökülmüş epitellere karışık çok sayıda nötrofilik hücre infiltrasyonları bulunmaktadır. Ductus epitellerinde yer yer erozyonlar ve bazı kesimlerinde de epithelial proliferasyonlar dikkati çekmektedir. 7. gün ve 10. gün kesilen (1 ve 4. suş) yani uzun süren olaylarda koyunlarda mastitis interstitialis nonprulenta tesbit edilmiştir. Bu hayvanların meme loblarının histopatolojik muayenesinde interstitial dokuda özellikle corpus glandulae'lerin çevresinde lenfosit, histiosit ve plazma hücreleri görülmüştür.

Tablo-1. B. cereus Yönünden Yapılan Biyokimyasal Aktivite ve Karbonhidrat testleri

İzolat No					
Karbonhidratlar	I	II	III	IV	Deneme suşu
Arabinoz	-	-	-	-	-
Ramnoz	-	-	-	-	-
Ksiloz	-	-	-	-	-
Fruktoz	+	+	+	+	+
Galaktoz	+	-	-	+	+
Glukoz	+	+	+	+	+
Mannoz	-	+	+	-	-
Laktoz	-	-	-	-	-
Maltoz	+	+	+	+	+
Rafinoz	-	-	-	-	-
Dekstrin	+	-	+	+	+
İnulin	-	-	-	-	-
Salisin	-	-	+	+	+
Dulsitol	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-
Eskulin	-	-	-	-	+

Biyokimyasal testler	I	II	III	IV	Deneme suşu
Jelatin Hidroliz testi	+	+	+	+	+
Sitrat Kullanım testi	+	-	-	-	+
Nitrat redüksiyonu	+	+	+	+	+
Nişasta hidroliz testi	+	+	+	+	+
İndol teşekkülü	-	-	-	-	-
Kazein hidroliz testi	+	+	+	+	+
Ureaz	+	-	-	+	+
VP	+	+	+	+	+
MR	+	-	+	-	-
Penisilinaz	+	+	+	+	+
Lesitinaz	+	+	+	+	+

Tablo- 2. B.cereus İzolatlarının B.anthraxis'ten ayırmak için yapılan test sonuçları

B.cereus Suş	Buyyon Bulanıklık	Hareket	Hemoliz	İnci Testi		Kapsül Teşekkülü
				0.5 ü	0.05 ü	
1	+	+	+	-	-	-
2	+	+	+	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-
4	+	+	+	-	-	-
B.cereus Deneme Suşu NCTC 10320 and ATCC 11778,	+	+	+	-	-	-
B.anthraxis	-	-	-	+	+	+

Tablo 3. B.cereus İzolatlarının Plate count agarda bakteri sayım sonuçları

İzolatlar	Dilüsyonlara göre ortalama Koloni miktarları			Sonuçlar
	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹²	10 ⁻¹³	
İzolat 1	36	12	4	4.68x10 ¹³ mikrop/ml
İzolat 2	148	94	54	26.64x10 ¹² mikrop/ml
İzolat 3	147	96	56	26.91x10 ¹³ mikrop/ml
İzolat 4	177	131	44	31.68x10 ¹³ mikrop/ml
Deneme Suşu	208	157	111	42.84x10 ¹³ mikrop/ml

Koyunlarda B. cereus izolatlarının intramanmal injeksiyon sonrası bulguları

Gün	Suş No1 K.No:418 Sağ Meme Lobu	Suş 2 K.No:313 Sağ Meme Lobu	Suş 3 K.No:176 Sol Meme Lobu	Suş 4 K.No:313 Sol Meme Lobu	Deneme Suşu K.No:448 Sağ Meme Lobu
4.Saat	T:39°C Meme Lobu normal görünümünde	T:39.5°C Sağ Meme Lobu şişkin, kızarıklık, ağrılı Sert, Siyanotik.	T:40.5°C Meme lobu şişkin, kızarıklık sıcak ve ağrılı.	T:40.7°C Meme lobu kızarıklık oldukça şişkin sert ve ağrılı	T:39.7°C. Meme Lobu normal görünümünde.
1.Gün	T:39.7°C Meme lobu hafifçe şişkin, sıcak ve ağrılı. CMT (+) Sütten B.cereus izole edilemedi	T:39.2°C Meme lobu sıcak ve ağrılı. Süt kirli sarı renkte, pıhtılaşma var. CMT (+) Sütten İzolasyon (+)	T:39.5°C Meme lobu hafifçe şişkin sıcak ve ağrılı süt gri, kirli sarı renkte pıhtı ve yoğurt kıvamında. CMT(+) Sütten İzolasyon (+)	T:40°C Meme lobu şişkin sıcak ve ağrılı. Sütte pıhtılaşma CMT(+) B.cereus izolasyon.(+)	T:39°C Meme lobu normal süt kirli sarı renkte sulu ve pıhtılı CMT(+)
2.Gün	T:39°C CMT(+) Süt yapışkan ve yeşilimsi mukoid karakterde meme lobu normal. B. cereus izole edildi.	T:39.3°C CMT(+) Meme lobu sert süt kirli sarı mukoz ve peynirleşmiş.	T:39.5°C CMT(+) Süt kirli sarı renkte yapışkan ve iltahaplı.	T:39°C Meme lobu normal CMT(+) B.cereus İzolasyon (+) Süt yapışkan ve kirli sarı renkte.	T:39.2°C Meme hafif şişkin ve hassasiyet var. Süt kirli sarımtırak renkte. CMT (+)

Gün	Suş No1 K.No:418 Sağ Meme Lobu	Suş 2 K.No:313 Sağ Meme Lobu	Suş 3 K.No:176 Sol Meme Lobu	Suş 4 K.No:313 Sol Meme Lobu	Deneme Suşu K.No:448 Sağ Meme Lobu
3.Gün	T:39°C CMT(+) Memede hassasiyet ve hafif şişlik. B.cereus izole edildi.	T:39°C CMT(+) Meme lobu atrofik Memeden kanlı bir akıntı. Pıhtılaşma yok. B. cereus izolasyon.(+)	T:39°C CMT(+) Meme lobunda hafif sertlik süt pembemsi ve yapışkan. B. cereus izole edildi.	T:39°C CMT(+) Meme lobu nor mal ve süt yapış kan iltehlaplı. B. cereus izole edildi.	T:38.9°C CMT(+) Meme lobu sert ve ağrılı sütte pıhtı- laşma. B.cereus izole edildi
4.Gün	T:39°C CMT(+) Meme lobu hafif şişkin Kızarıklık yok, süt pembemsi fazla ya- pışkan. B, cereus izole edildi.	T:39°C CMT(+) Meme lobu atrofiye olmuş. Memeden kanlı bir akıntı sütte pıhtılaşma. B.cereus izole edildi.	T:39°C CMT(+) Meme lobu atrofiye. Sütün rengi sarı-yeşil yapışkan ve iltehlaplı. B. cereus izole edildi.	T:39°C CMT(+) Meme lobu sert ve atrofik süt akış kan. Pıhtılaşma ve peynirleşme yok. Rengi hafif kırmızı.	T:39°C CMT(+) Meme lobu sert ve ağrılı, atrofi var.Mu koz bir akıntı. Süt- ten B, cereus izole edildi. Rengi hafif kırmızı.

Gün	Suş No1 K.No:418 Sağ Meme Lobu	Suş 2 K.No:313 Sağ Meme Lobu	Suş 3 K.No:176 Sol Meme Lobu	Suş 4 K.No:313 Sol Meme Lobu	Deneme Suşu K.No:448 Sağ Meme Lobu
5.Gün	T:39°C CMT(+) Meme lobu normal. Sütün rengi hafif pembe ve süt sulu B. cereus izole edildi	T:39.2°C CMT(+) Meme lobu sert ve atrofik. Memeden kanlı bir akıntı. B.ce- izole edildi. Hayvan kesime sevk edilerek meme lobu patoloji- verildi.	Hayvan kesilerek meme lobu patolojiye verildi.	T:39°C CMT(+) Meme lobu sert ve atrofik. Süt hafif kırmızimsı renkte peynirleşme ve pıhtılaşma yok. B. cereus izole edildi.	T:39.2°C CMT(+) Sütün ren- kirli sarı meme lo- bu sert-ağrılı. Süt- ten B.cereus izole edildi. Hayvan ke- sime sevk edilerek meme lobu patolo- jiye verildi
6.Gün	T39°C CMT(+) Meme lobu atrofik memeden kanlı bir kanlı bir akıntı B. cereus izole edildi.			T:39°C CMT(+) Meme lobu atrofik Süt kirli sarı sarı renkte. Akışkan B. cereus izole edildi. Fakat kolo- ni miktarı azaldı.	

Gün	Suş No1 K.No:418 Sağ Meme Lobu	Suş 2 K.No:313 Sağ Meme Lobu	Suş 3 K.No:176 Sol Meme Lobu	Suş 4 K.No:313 Sol Meme Lobu	Deneme Suşu K.No:448 Sağ Meme Lobu
7.Gün	T:39°C Meme lobu atrofik. Memeden kanlı bir akıntı. B. cereus izole edildi. Hayvan kesime verildi.			T:39°C Süt kirli sarı renkte akışkan. B. cereus izole edildi.	
8.Gün				T:39°C Süt kitirli sarı renk. te Akışkan. B cere us izole edildi.	
9.Gün				T:39°C CMT(±) B. cereus izole edilemedi.	
10.Gün				CMT(-) Hayvanlar da iyileşmeye doğ re gelişme görüldü. B.cereus izole edilemedi. Hayvan kesildi	

TARTIŐMA

Bu alıŐmada Enstitümüzün Mastitis Laboratuvarına gelen subklinik mastitis pozitif olan 366 adet süt  rneği incelenmiŐtir. Bu süt  neklerinden 4 adet B.cereus izole ve identifiye edilmiştir.

Bazı araŐtırcılar B.cereus'un izolasyonu için çeşitli selektif besiyerleri geliŐtirmiŐler ve bu besiyerlerine inhibitör maddeler katarak gıdalarda mevcut diğer bakteri ve basil florasını inhibe etmek suretiyle B.cereus'u ayırmaya çalıŐmıŐlardır (12,25,28).

Donovan (1958) Nikodemus (1962) ile Mossel ve ark (1967) tarafından geliŐtirilen selektif besiyerlerinde, inhibisyon maddesi olarak lithium chlorid, polymyxin B sülfat ve etanol kullanılmıştır (20).

Bunlardan Mossel ve arkadaşları (1967) nın kullandıkları MYP-Agarda inhibitör olarak Polymyxin B sülfat vardır. Bu selektif besiyeri gram negatif bakteri nevilerini ve B.subtilis'i kuvvetli olarak inhibe ettiğini bununla beraber besiyerlerinde streptococcus faecium ve staphylococcus aureus'un çok az olarak inhibisyona uğradıkları tesbit edilmiştir.

Bizim çalışmalarımızda kullandığımız PEMBA besiyerinde inhibitör olarak Polymyxin B kullanılmıştır. Fakat Polymyxin B'nin, staphylococcus aureus, Serratia marcescens ve Proteus vulgaris için inhibe edici olmadığı fakat bunların renk ve koloni formlarıyla B.cereustan ayrıldığını araŐtırcılar açıklamışlardır (12).

Yine bu besiyerinde B.cereus'un Lesitinaz pozitif bir reaksiyon meydana getirdiği gözlendi.

Peterz ve arkadaşları (1985), Gıdalardan B..cereus'un izolasyonu için 3.besiyerini karŐılaŐtırmıŐtır. Bunlar Mossel ve ark (1967) tarafından tarif edilen MYP (Mannitol-egg yolk-polymyxin agar), Hoolbrook ve Anderson (1980), tarafından geliŐtirilen PEMBA (Polymyxin pyruvate-egg yolk-mannitol-bromothymol blue agar) ve selektiv olmayan blood agar Schieman (1978) tarafından kuruldu. Bu araŐtırcılar kuru gıda ürünlerinde, süt ve süt  r nlerinde B.cereus'u izole etmişlerdir. Ancak besiyerlerinde, kuru gıdalar için üreme oranlarının hemen hemen aynı olduğunu fakat süt ve süt ürünleri için kanlı agarın öteki iki besiyerinden daha zayıf bir üreme gösterdiğini belirtmişlerdir. Kanlı agarda kontaminasyonun daha fazla olduğunu açıklamışlardır.

Çalışmalarımız da her iki besi yerindedeki üremenin aynı olduğu fakat PEMBA'nın *B.cereus* için selektif bir besiyeri olduğu görüldü.

Peterz ve ark (1985), kuru gıdaları ve süt ürünlerini % 0.1 peptonlu su ile homojenize ederek bir gece oda derecesinde ön inkubasyon yapmışlardır. % 0.1 peptonlu suda örneklerin uygun dilisyonlarından 10 ml yukarıda belirtilen 3 besiyerine inokule etmişlerdir. Plakeler, 30°C de inkube edilerek 24-48 saat sonra incelenmişlerdir. Biz mastitisli süt örneklerini sulandırmadan besiyerlerine 0.1 cc. ekerek 30°C de 18 ve 37 °C de 24 saat inkube ettiğimizde üremenin her iki ısı derecesinde de aynı olduğunu saptadık.

Gedek (1986), elde ettiği 51 izolatu kulture etti ve onların morfolojik, biyosimik karakterleri ve antimikrobiyal hassasiyet derecelerini tayin etti. Bütün izolatlarda, glukoz, fruktoz, N- acetylglucosamin, esculin, maltoz, trehaloz, amidon, glycogen, arginin dihydrolose, gelatinase ve cytochrome oxidase'in pozitif olduğunu tesbit etti. Lesitinaz reaksiyonu ise devamlı pozitif.

Bizim elde ettiğimiz izolatlarda ise fruktoz, glukoz, maltoz, jelatin hidroliz, nitrat redüksiyonu, nişasta hidroliz, kazein hidroliz, VP. penisilinaz, Lesitinaz hepsinde pozitif, arabinoz, ramnoz, Kisiloz, laktoz, rafinoz, inülin, dulcitol, inositol, mannitol, sorbitol, eskulin 4 suşta negatif. Diğer testler ise suşlar arasında değişiklikler göstermektedir.

B. cereus, kültürel ve mikroskopik muayenelerde anthrax basili ile kolayca karıştırılabilmektedir. Her iki basil arasındaki çabuk differansiyasyonun anthrax fajları lizis kabiliyeti, penisilin rezistans testi (inci testi), hareket muayenesi ve kültür formlarının gözlemi ile *B. cereus* suşlarında fosfataz yapma kabiliyeti ve lesitinaz kabiliyetinin tesbiti ile mümkün olabildiğini, Seidel (1959) bize bildirmektedir. Aynı şekilde Pawlova ve Katz (1966) bu ayırmada mikroskopik akı ve kapsül boyamasının önemi üzerine dikkat çekmektedirler.

Çalışmalarımızda *B.cereus* izolatlarını *B.anthraxis*'den ayırmak için yaptığımız çalışmada 4 suşun hepsinin buyyonu bulandırdığı ve hepsinin hareketli olduğu, kanda kapsül teşkil etmediği ve kuvvetli hemoliz yaptığını tesbit ettik. İnci testinde ise *B.anthraxis* pozitif olduğu *B. cereus* izolatlarının hepsinin negatif reaksiyon gösterdiği tesbit edildi.

Burdon ve ark (1967), 4 saatlik *B.cereus* buyyon kültüründen 2 ml (8×10^{12} jerm/ml) 4 ay önce kuzulayan bir koyuna intracisternal olarak tatbik ederek mastitis geliştirmişlerdir.

Horvath ve ark (1986) yaptıkları deneysel çalışmada 8 süt ineği kullanmışlardır. Bir enfekte ineğin sütünden izole edilen *B. cereus* suşunun saf kültürlerinden a) 2×10^{13} , 2×10^{14} b) 3×10^7 , 6×10^8 , c) 2×10^8 d) 2×10^7 koloni ihtiva eden miktarlarında ineklere intracisternal olarak vererek akut parankimal mastitisi geliştirmişlerdir.

Horvath ve ark (1986) enfektif doza bağlı olarak ineklerin genel durumunda değişimlerin 2-5 saat içinde görüldüğünü 5 ve 8. saatler arasında semptomların gittikçe şiddetlendiğini vücut ısısının bazen 41°C ye kadar yükseldiğini ve 8-10 saatler arasında en yüksek seviyeye ulaştığını açıklamışlardır. Yine bu araştırmacılar memeden *B. cereus*'un eliminasyonunun 72-120 saat sürdüğünü fakat sütün kalitesindeki değişikliklerin 3-6 hafta boyunca değişmediğini ve bu süre içinde enfekte meme lobunun atrofiye olduğu ve körleştiğini belirtmişlerdir.

Merck ve Burow (1973) koyunlara *B. cereus*la intracisternal enjeksiyondan 3 gün sonra hayvanların genel durumlarının, vücut ısısının ve hasta meme lobunun normale döndüğünü açıklamışlardır.

Bizim çalışmamızda koyunların birer memesine (8×10^{13} jerm/ml) içeren solüsyonundan 2 ml verildi. Koyunların diğer memesi kontrol olarak kullanıldı. İntramammar enjeksiyondan 4 saat sonra hafif başlayan vücut ısısı 24. saate kadar yükseldi, $39,5^\circ\text{C}$ ve $40,7^\circ\text{C}$ arasında değişen ateş izlendi. 2. gün ateşte kendiliğinden düşme gözlemlendi. 3. günün sonunda koyunlardaki genel durum normale dönmesine rağmen sütteki değişiklikler devam etti. Ayrıca koyunların kontrol bırakılan memesinde hiç bir değişiklik gözlenmezken, enfekte edilen memelerde değişiklikler gözlemlendi. (Tablo-4)

Weidlich (1961), *B. cereus* ile deneysel olarak oluşturdukları mastitis olaylarında histolojik olarak, alveollerde ve glanduler lobüllerde kanamalarla çok sayıda bakterileri içeren nekrotik adacıklar, kan ve lenf damarlarında ise trombozlar tesbit etmiştir. Nekrotik odaklar lenfosit ve granulosit infiltrasyon ile kuşatılmıştır.

Gloor (1968), memenin glanduler epithelium'unda fokal vacuoler dejenerasyon ve alveollerde diffuz nötrofil lökositlerle infiltrasyonunu bildirmiştir.

Schiefer ve ark (1976), enfekte meme loblarında akut yangı ve çok miktarda gram (+) bakterileri içeren hemorajik-nekrotik odaklar gözlemişler ve lezyonları supramammar lenf düğümlerinde de bulmuşlardır.

Jones ve Turnbull (1981), 29 inek ve bir keçide *B. cereus* mastitisini

bildirmişler ve ineklerin birinde histolojik olarak focal alveolitis interstisyel ödem tesbit etmişlerdir.

Horvath ve ark (1986) ineklerde deneysel enfeksiyonun 8. gününde histolojik olarak interstisyumda; ödem ve nötrofilik granulosit infiltrasyonu, glandular epitelyumda vakuolasyon, genişlemiş alveol ve kanallarda nötrofil lökositleri içeren eksudat tesbit etmişlerdir.

Bizim çalışmamızda histopatolojik olarak elde ettiğimiz bulgular Horvath ve arkadaşları (1986) nın deneysel enfeksiyon bulgularıyla uyumludur. Bazı araştırmacıların Weidlich (1961); Schiefer ve ark (1976) nın bildirdikleri, bakterileri kapsayan hemorajik-nekrotik odaklara incelediğimiz glandüler lobüllerde rastlanmamıştır.

Çeşitli araştırmacılarında bildirdikleri gibi *B. cereus*'un bir toprak basili olması nedeniyle uygun olmayan hijyenik koşullar, sağım tekniğinin uygun olarak yapılamaması ve tedavi esnasında intramammal enjeksiyonların kontaminasyonu sonucu *B. cereus* mastitisin meydana geldiği bilinmektedir.(7,15,18)

Çalışmamızın sonucunda elde ettiğimiz bulgulardan *B. cereus*'tan ileri gelen mastitislerin diğer mastit etkenlerine göre %1.1 gibi düşük oranda olmasına rağmen subklinik mastit olaylarında *B. cereus*'un göz önünde bulundurulması gerektiği kanısındayız.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmamızda bize yardımlarını esirgemeyen Mastit Laboratuvarı Şefi Nedret Aydın'a, Patoloji Laboratuvarı Şefi Hamdi Girgin'e, Bakteriyolojik Teşhis laboratuvarı Şefi Muhsin Bekar'a, Anthrax Laboratuvarı şefi Musa Yürüsün'e ve elemanlarına teşekkür ederiz.

LİTARETÜR

- 1- AHMED, A.A., MOUSTAFA, M.K. and MARTİN, E.H. (1983): İncidence of *Bacillus cereus* in milk and some milk products. J. Food Prot. 46: 126-128.
- 2- ARDA, M. (1978): Genel Bakteriyoloji.
- 3- ATEŞ, M., ERGANİŞ, O., KAYA, O. and ÇORLU, M. (1990): Koyun

mastitisleri üzerinde mikrobiyolojik incelemeler. S.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi 6-7: 1, 3-6; 21.

4- BEKAR, M. ve AYAZ, Y. (1994): Enfeksiyöz Hastalıkların Tanısı ve Bakteriyolojik Tanıda kullanılan önemli testler. Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü

5- BOUZA, E., GRANT, S., JORDAN, C., YOOK, R. and SULİT, H. (1979): Arch Ophthalmol, 97, 498-499.

6- BRANDLY, P.J. (1966): Meat Hygiene, Food-Bannes III nes 352-358.

7- BROWN, R.W. and SCHERER, R.K. (1957): A report on two cases of acute mastitis caused by Bacillus cereus. Cornell Vet: 226-240.

8- BUCHMAN, R.E. and GİBBONS, E. (1972): Endospore-Forming rods and cocci Determinative Bacteriology, 534-535.

9- BURDON, K.L., DAVIS, J.S. and WENDE, R.D. (1967): Experimental İnfection of mice with Bacillus cereus: Studies of pathogenesis and pathologic changes. J. Inf. Dis. 117, 307-316.

10- COWAN, S.T. (1975): Cowan and Steel's. Manual for the indentification of medical bacteria.

11- DAVENPORT, R. and SMITH, C. (1952): Brit.J. Ophthal, 36, 39.

12- DONOVAN, K.O. (1958): Die aeroben sporenbildner in der taglichen Praxis der bakteriologischen Unter suchungen der von Tieren Stammenden Lebensmittel. Cite: Seidel, G. (1960): Arch.f.Lebensmittelhyg., 6/11, 78-81.

13- EMRE, M.N. (1968): Anthrax'ta yeni teşhis metotları. Veteriner Mikrobiyoloji dergisi. 1 (II). 18-32.

14. FABBİ, M; SCANZİANİ, E; LUİNİ, M, M. and CERVİO, G. (1989): Un episodio di mastite acuta da Bacillus cereus in bovine da latte.

Selezione-Veterinaria. 30:5, 745-753.

15. GEDEK, von W. (1986): Bacillus cereus-Mastitiden beim Rind als folge einer Arzneimittel. kontamination. 1 Merkmale der isolate. Tierarztl. Umschau 41, 526-530.

16. GLOOR, H. (1968): Bacillus cereus mastitis in cattle. Schw. Arch. Tierheilkunde. 110, 63-80.

17. HOLBROOK, R. and ANDERSON, J.M. (1980): An Improved Selective and diagnostic medium for the isolation and enumeration of Bacillus cereus in foods. Can. J. Microbiol. 26: 753-759.

- 18- HORVATH, GY. TOTH-MARTON, E., MESZAROS, J.M. and QUARINÌ, L. (1986): Experimental Bacillus cereus Mastitis in Cows. Acta Veterinaria Hungarica, 34 (1-2), 29-35.
19. İNAL, T (1969): İzmir bölgesinde Bacillus cereus'un sebep olduğu bir zehirlenme vakası. Bornova Vet. Araş. Enst. Derg. 10/19.1-5
20. İNAL, T. (1970): Bacillus cereus'un Gıda Maddelerinde Kantitatif ve Kalitatif Tayinine yarıyan selektif Besi yerleri üzerinde mukayeseli Araştırmalar. Doçentlik Tezi.
21. JASPER, D.E, D.V.M., Ph, D., BUSHNELL, R.B., DELLİNGER, J.D. and STANG, A.M. (1972): Bovine Mastitis Due to Bacillus cereus. J.A.V.M.A., Vol. 160 No:5.
22. JONES, T.O. and TURNBULL, P.C. (1981): Bovine mastitis caused by bacillus cereus. Vet. Rec. 108, 271-274
23. Krieg R.N. and Holt G.J. (1984): Bergey's Manual of systematic bacteriology.
24. MERCK, C.C. und BUROW, H. (1973): Bacillus cereus als Ursache einer Mastitis beim Rind. Zbl.Vet.Med. B.20, 810-817.
25. MOSSEL, D.A.A., KOOPMAN, M.J. and Jongerius, E. (1967): Enumeration of Bacillus cereus in Foods. Appl. Microbiol. 15/3:650-653
26. MOUSTAFA, S. and SAAD, NM. (1989): Studies on bovine udder infection with Bacillus cereus. Assiut-Veterinary-Medical-Journal 22: 43,40-46.
27. NAZLI, B. ve İNAL.T. (1989): Bacillus cereus'tan ileri gelen gıda zehirlenmeleri. Pendik Hayv. Hast. Merk.Araşt.Enst.Derg. XX (1). 57-66.
28. NIKODEMUSZ, I. (1962): Über einen neuen Elektivrahboden, der zur Isolierung von B.cereus aus Mischflora geeignet ist. Arch.f.Lebensmittelhyg. 13/3, 56.
29. OKSAMİTNYİ, -NK (1989): Bacteriological diagnosis of mastitis. Veterinariya-Moskva. No.7, 50-52
30. PETERZ, M. WIBERG, C. and NORBERG, G, P. (1985): Comprasion of Media for isolation of Bacillus cereus from Foods. Journal of Food Protection. Vol. 48, No:11 969-970
31. POWLOWA, J.B. und KATZ, L.M. (1966): Vergleichende elektronen mikkopische und zytochemische untersuchung von B. cereus und B. anthracis. Zh. Mikrobiol (Moskva) 2,90.Ref. (1967): Zbl.f. Bakt.Refevate 205/5, 458.

mikropishe und ztochemishe

32. SCHIEFER, B. MACDONALD, K.R. KLAVAND, G.G. and VAN DREUMEL, A.A. (1976): Pathology of *Bacillus cereus* mastitis in dairy cows. *Can. Vet. J.*, 17, 239-243.

33. SCHIEMANN, D.A. (1978): Occurrence of *Bacillus cereus* and the bacteriological quality of chinese "take-out" foods. *J.Food.Prot.* 41: 450-454.

34. SEIDEL, G. (1959): Ein Versuch zur Differenzierung von *B. cereus* und *B. anthracis* innerhalb eines Labortages. *Zbl.f. Bakt. I. Orig.* 175/5-6, 433-436.

35. TURNBULL, P.C.B., JORGENSEN, K., KRAMER J.M., GILBERT. R.J. and PARRY, J. (1979). *J. Clin.Path.*, 32, 289-293.

36. WEIDLICH, N. (1961) : Über Infektionen der Milchdrüse des Rindes mit *Bac. cereus*. *Mh. Vet. Med.* 16, 816-818.

37. WONG, H.C., CHANG, M.H. and F.J.H. (1988) : incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy Products. *Applied and environmental Microbiology.* 699-702.