

SIĞIR VE KOYUN MASTİTİSLERİNDEN İZOLE EDİLEN *ESCHERICHIA COLI*'LERİN ÇEŞİTLİ ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI*

“Investigation of Various Characteristics of *E. Coli* Isolated From Cattle and Sheep Mastitis**”

Hürriyet BÜLBÜL**

Kabul Tarihi: 05.10.2001

ÖZET

Sığır ve Koyun Mastitislerinden İzole Edilen *Escherichia coli*'lerin Çeşitli Özelliklerinin Araştırılması

Bu çalışmada, mastitisli inek ve koyunlara ait süt, rektal svap ve altlık örneklerinden izole edilen *Escherichia coli* suşlarının biyokimyasal özellikleri ve bazı virülens faktörleri yönünden karşılaştırılması amaçlandı. Bu amaçla, süt inekçiliği yapılan 25 işletmeden 845 süt, 215 rektal svap ve 25 altlık örneği alındı. Süt örneklerinin Somatik Hücre Sayıları belirlenerek SHS 150×10^3 /ml ve üzerinde bulunan 243 süt örneği ile bu hayvanlara ait 55 rektal svap ve 25 altlık örneği ve 10 koyun ünitesinden 1300 süt örneğine Kalifornia Mastitis Test uygulanarak CMT pozitif olan 170 süt ve bu hayvanlara ait 85 rektal svap ve 10 altlık örneği izolasyon çalışmalarında kullanıldı.

İzole edilen tüm suşlar biyokimyasal testlerle tanımlanarak ineklerin ve koyunların süt, rektal svap ve altlık örneklerinden izole ve tanımlanarak sırasıyla 68 ve 36 *E. coli* suşu hemaglutinasyon özelliği, serum dirençliliği, kolisin aktivitesi, enteropatojenite ve enterotoksijenite yönünden test edildi.

Bu çalışmada, ineklere ve koyunlara ait süt örneklerinden sırasıyla %16,4 ve %14,8 oranlarında koliform bakteri izole edildi. İnek ve koyun sütlerinden izole edilen koliform bakterilerin ise sırasıyla %91,9'unun ve %87'sinin *E. coli* olduğu saptandı. İnek rektal svap örneklerinin %87,3'ünden ve altlık örneklerinin %80'inden, koyun rektal svap örneklerinin %82,4'ünden, altlık örneklerinin %80'inden *E. coli* izole ve tanımlanarak edildi. Altmışsekizi ineklere, 36'sı koyunlara ait olmak üzere izole edilen toplam 104 *E. coli* suşu kobay, tavşan ve sığır eritrositleriyle sırasıyla %16,4, %11,5 ve %4,8 oranlarında Mannoze Sensitiv Hemaglutinasyon verdi, diğer hayvanlara ait eritrositlerle MSHA oranları düşüktü. Suşların yaklaşık %1'i sığır, tavşan ve %5,8'i kobay eritrositleri ile MRHA verirken koyun eritrositleri ile Mannoze Rezistan Hemaglutinasyon vermedi ve *E. coli* suşları 11 hemaglutinasyon formülü oluşturdu. *E. coli* suşlarının %98,1'inin sığır serumuna dirençli, %1,9'unun kolisin aktif ve %4,8'inin kolisin aktif suşlara karşı duyarlı, %45,8'inin enteropatojenik ve %16,2'sinin enterotoksijenik olduğu belirlendi.

Sonuç olarak, mastitisli hayvanlara ait materyallerden izole edilen *E. coli* suşları virülens faktörleri yönünden farklılıklar gösterdiklerinden, serum dirençliliği dışında incelenen faktörlerin mastitisin patogeneziyle doğrudan ilişkili olmadığı kanaatine varıldı.

Anahtar sözcükler : *E.coli*, mastitis, patojenite

* Aynı isimli Doktora tezinden özetlenmiştir.

** Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Etlik-ANKARA

SUMMARY

Investigation of Various Characteristics of *E. coli* Isolated From Cattle and Sheep Mastitis.

The aim of this study was to compare the biochemical characteristics and some virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from milk, rectal swap and litter samples of mastitic cows and sheep. For this purpose, 845 milk, 215 rectal swap and 25 litter samples were collected from 25 dairy establishments. After determining Somatic Culture Counting, 243 milk, with $150 \cdot 10^3$ / ml and 55 rectal swaps and 25 litter samples of the cows, and after performing California Mastitis Test in 1300 milk samples collected from 10 dairy sheep establishments, 170 CMT positive milk, 85 rectal swap and 10 litter samples were used for isolation. All of the isolated strains were identified with biochemical tests. 68 and 36 *E. coli* strain isolated and sheep milk, rectal swap and litter respectively were tested for the haemagglutinating activity, resistance to serum, colicine activity, enterpathogenicity and enterotoxigenicity.

In this study, 16,4% and 14,4% of coliform bacteria were isolated from the milk of cows and sheep respectively. The ratio of *E. coli* in coliform bacteria were 91,9% and 87% of the isolates from cow and sheep respectively. *E. coli* was isolated at a ratio of 87,3% of rectal swap and 80% of litter of cows, and 82,4% of rectal swap and 80% of litter of sheep. A total of 104 *E. coli* strains consisting of 68 from cows and 36 from sheep were Mannose Sensitive Hemaglutinasyon positive for guineapig, rabbit and cattle erythrocytes at a ratio of 16,4%, 11,5% and 4,8% respectively, the MSHA ratios were lower with the erythrocytes of other animal species. While approximately 1% of strains were Mannose Resistance Hemaglutinasyon positive with cattle, rabbit and %5,8 guineapig erythrocytes. All of the strains were MRHA negative with sheep erythrocytes and *E. coli* strains gave 11 haemagglutination formulas. It was found that 98,1% of *E. coli* strains were resistant to cattle serum, 1,9% were colicinogenic and 4,8% were sensitive to colicinogenic strains, 45,8% were enteropathogenic and 16,2% were enterotoxigenic.

In conclusion, because isolated *E. coli* strains showed different patterns for the investigated virulence factors except resistance to serum, these factors have no direct relationship with the pathogenesis of masitis.

Key words: *E.coli*, mastitis, pathogenicity

1. GİRİŞ

Koliform bakterilerden ileri gelen mastitislerde subklinik infeksiyonlara nadiren rastlanmasına karşın perakut ve akut seyreden infeksiyonlar sık şekillenmektedir. En fazla kış mevsiminde ortaya çıkan koliform mastitislere neden olan etkenler arasında sindirim sisteminin normal florası olan *E. coli*'nin yanısıra *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella spp.*, *Citrobacter spp.* ve *Proteus vulgaris* bulunmaktadır. Bunlar arasında en sık görüleni *E. coli* mastitisleridir. Kötü hijyenik koşullar ve meme başlarının dışkı ile kontaminasyonu *E. coli* mastitislerinin oluşmasında önemli rol oynamaktadır. Sığırlarda *E. coli* mastitislerinden izole edilen *E. coli* suşları genellikle fimbriyalı olmakla birlikte, fimbriyalı *E. coli*'nin meme

epiteline adhezyonu *E. coli* mastitisine özgü bir durum değildir (1).

Sığır serumundaki antikorların koliformların bazı suşlarını öldürme yeteneğinde olduğu saptanmış ve *E. coli*, fütal sığır serumunda üreme durumuna göre serum duyarlı (SS) veya serum dirençli (SR) olarak sınıflandırılmıştır (28). Serum dirençliliğinin, K1 kapsüler antijen, lipopolisakkarit, plasmidle kodlanan dış membran proteinleri olan TraT ve iss gibi çeşitli rezistans faktörlerine bağlı olduğu bildirilmektedir (44, 9, 35, 40). Çeşitli araştırmacılar tarafından (1, 13, 9) koliform mastitise neden olan *E. coli*'lerin virulensinde serum dirençliliğinin önemli rol oynadığı saptanmıştır.

Değişik *E. coli*'ler tarafından sentezlenen antibiyotik benzeri maddeler olan kolisinler ve diğer bakteriler tarafından sentezlenen kolisin benzeri maddeler bakteriyosinler olarak adlandırılmaktadır. Kolisinler bakteri yüzeyindeki bazı özel reseptörlere bağlanarak etki etmekle birlikte kolisine dirençli mutantlar da görülebilmektedir. Kolisinlerin bağlanması için özel reseptörleri olmayan bakteriler kolisin dirençli, kolisini bağlayabilen ancak sitoplazması kolisin aktivitesi için uygun olmayan bakteriler ise kolisin tolerant olarak adlandırılmaktadır. Genellikle kolisin sentezleyen türler bu maddeyi sentezlemeyenlere antimikrobiyal etki gösterirler (27).

Enterotoksinlerin belirlenmesinde en çok kullanılan tekniklerden birisi bağırsak ligatür (lup) testidir (29, 2). Bu teste laparotomi yapılarak bağırsakları 8-10 cm'lik bölümler halinde ligatüre edilen tavşanların bu bağırsak bölümlerinde *E. coli* kültür filtratı enjeksiyonunu takiben 24 saat içerisinde oluşan sıvı ve gaz oluşumuna bağlı şişlikler pozitif olarak değerlendirilmektedir (23). CNF2'nin tavşan ileal lup testinde orta düzeyde sıvı toplanmasına yol açtığı bildirilmiştir (12).

Stabil toksinin belirlenmesi amacıyla kullanılan infant fare testi'nde, 3-4 günlük farelere %1'lik Evans Blue ile birlikte *E. coli* kültür filtratı verilerek 28°C'de 4 saat tutulan fareler öldürülüp bağırsak ağırlıkları vücut ağırlıklarına oranlanarak değerlendirme yapılmaktadır (29, 2).

Bu tez çalışmasında; mastitisli inek ve koyunlardan alınan süt, rektal svap ve barınaklardan alınan altlık örneklerinden izole ve identifiye edilen *E. coli* suşlarının biyokimyasal özellikleri, hemaglutinasyon özellikleri, serum dirençliliği, kolisin aktivitesi, enteropatogenite ve enterotoksijenite gibi virülens faktörleri yönünden karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Örneklerin Toplanması

E. coli izolasyonu için gerekli olan süt, rektal svap ve altlık örnekleri Yozgat İli'nde bulunan süt inekçiliği yapılan 25 üniteden alındı. Toplam 845 süt, 215 rektal svap, 25 altlık örneği ve Ankara yöresindeki 10 koyun ünitesinde, 1300 süt örneğine California Mastitis Test (CMT) uygulanarak pozitif ve şüpheli 170 süt örneği ve 85 rektal svap ve 10 altlık örneği alındı ve soğuk zincir içerisinde laboratuvara getirildi.

2.2. *E. coli* Suşlarının İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Süt, rektal svap ve altlık örnekleri kanlı agar, MacConkey agar ve EMB agar besiyerlerine inokule edildi ve 37 °C de 18-24 saat inkübe edildikten sonra *E. coli* morfolojisi gösteren laktoz pozitif kolonilerden buyyona geçildi. İzole edilen *E. coli* suşlarının biyokimyasal özellikleri Lassen (3)'in 'üçlü tüp' yöntemi ile saptandı. Metil Red, Voges Proskauer ve Simmon's Sitrat testleri sonucunda *E. coli* olarak tanımlanan suşlar daha sonra patojenite testleri yapılmak üzere yatık nutrient agara inokule edilerek +4 °C' de, nutrient buyyona inokule edilerek -70 °C' de saklandı.

2.3. Virülens Faktörlerinin Araştırılması

İneklere ait 30 süt, 21 rektal svap ve 17 altlık olmak üzere 68 ve koyunlara ait 17 süt, 12 rektal svap ve 7 altlık olmak üzere 36 materyalden izole edilen toplam 104 *E. coli* suşuna mannoz rezistans hemaglutinasyon testi (44, 41), serum dirençliliği (41) ve kolisin üretimi (25) uygulandı. Fakat ineklere ait 6 süt, 4 rektal svap ve 4 altlık olmak üzere toplam 14 *E. coli* suşuna ve koyunlara ait 5 süt, 3 rektal svap ve 2 altlık olmak üzere toplam 10 *E. coli* suşuna bağırsak lup testi (23) uygulandı. Ayrıca 20 süt, 14 rektal svap ve 12 altlık olmak üzere toplam 46 *E. coli* suşuna ve koyunlara ait 12

süt, 6 rektal svap ve 4 altlık olmak üzere toplam 22 *E. coli* suşuna ise infant fare testi (19) uygulandı.

3. BULGULAR

3.1. Virülens Faktörleri

İneklerin süt, rektal svap ve altlık örneklerinden izole edilen 68 ve koyunların süt,

rektal svap ve altlık örneklerinden izole edilen 36 *E. coli* suşuna (toplam 104 suş) uygulanan serum dirençliliği, kolisin testi, infant fare testi ve bağırsak lup testi sonuçları Tablo 3.1'de verildi.

Tablo 3.1. İnek ve Koyunlardan Alınan Süt ve Rektal Svap Örnekleri ile Altlık Örneklerinden İzole Edilen *E. coli* Suşlarının Virülens Faktörleri Oranları

HAYVAN TÜRÜ	SUŞ SAYISI N	SERUM DİRENÇLİLİĞİ		KOLİSİN		INFANT FARE TESTİ			BAĞIRSAK LUP TESTİ			
		N (+)	%	N (+)	%	N	N (+)	%	N	N (+)	%	
İnek	Süt	30	29	96,7	2	6,7	20	3	15	6	2	33,3
	Rektal svap	21	21	100	1	4,8	14	2	14,3	4	2	50
	Altılık	17	16	94,1	3	17,7	12	2	16,7	4	2	50
Koyun	Süt	17	17	100	0	0	12	2	16,7	5	3	60
	Rektal svap	12	12	100	0	0	6	1	16,7	3	1	33,3
	Altılık	7	7	100	0	0	4	1	25	2	1	50

3.1.1. Hemaglutinasyon Özelliği

İneklerin süt, rektal svap ve altlık örneklerinden izole edilen 68, koyunların süt, rektal svap ve altlık örneklerinden izole edilen 36 (toplam 104) *E. coli* suşunun 71'i sığır,

koyun, tavşan ve kobay eritrositlerine karşı HA (-) bulundu, geri kalan 33 *E. coli* suşu farklı hayvan eritrositlerini farklı oranlarda hemaglutine ettiği Tablo 3.2'de belirtilmiştir.

Tablo 3.2. İzole Edilen 104 *E. coli* Suşunun Değişik Hayvan Eritrositlerine Karşı Saptanan Hemaglutinasyon Özellikleri ve Oranları (%)

HA	SIĞIR		KOYUN		TAVŞAN		KOBAY	
	N	%	N	%	N	%	N	%
MSHA	5	4,8	1	0,96	12	11,5	17	16,4
MRHA	1	0,96	0	0	1	0,96	6	5,8
HA(-)	98	94,2	103	99,04	91	87,5	81	77,8

Siğır, koyun, tavşan ve kobay eritrositleri ile *E. coli* suşları 11 hemaglutinasyon formülü oluşturdu. NNNN, NNNS, NNSN ve NNNR formülleri sırasıyla %68,2, %11,5, %5 ve %4,9 oranlarında, diğerleri daha düşük oranlarda bulundu. Hemaglutinasyon özelliği gösteren 33 *E. coli* suşundan 1'i (%3) siğır, koyun, tavşan ve kobay eritrostlerinin tümünü hemaglutine etti. İzole edilen *E. coli* suşları en fazla kobay eritrositlerini hemaglutine etme özelliğine sahipti, bunu tavşan eritrositleri izledi.

3.1.2. Serum Dirençliliği

Toplam 104 *E. coli* suşunun 102'sinin (%98,1) serum dirençli, 2'sinin (%1,9) ise serum duyarlı olduğu saptandı (Tablo 3.1). Serum duyarlı suşlar aynı zamanda kolisin aktivitesi yönünden de pozitif bulundu. Siğır serumuna karşı inek süt örneklerinden izole edilen 30 *E. coli* suşunun 29'unun (%96,7), 21 rektal svap örneğinin 21'inin (%100) ve 17 altlık örneğinin 16'sinin (%94,1) ve koyun serumuna karşı ise bu 68 suşun tümünün (%100) dirençli olduğu saptandı. Koyun süt, dışkı ve altlık örneklerinden izole edilen 36 *E. coli* suşunun tümünün (%100) siğır serumuna ve koyun serumuna serum dirençli olduğu belirlendi.

3.1.3. Kolisin Aktivitesi

Kolisin aktivitesi yönünden test edilen 104 *E. coli* suşunun 2 (%1,9)'sinin kolisin aktif olduğu belirlendi. Yapılan çaprazlamalarda inek

sütü ve inek barınaklarının altlığından saptanan kolisin aktif olan bu 2 suşa karşı, 2'si süt, 1'i rektal svap ve 2'si altlıktan izole edilen 5 (%4,8) *E. coli* suşunun duyarlı olduğu saptandı. Kolisin yönünden aktif bulunan ve süttten izole edilen 27 no'lu suşa karşı aynı ahırın altlığından izole edilen 32 no'lu suş duyarlı bulunurken, altlıktan izole edilen 46 no'lu suşa karşı ise aynı ahırdaki hayvana ait rektal svaptan izole edilen 45 no'lu suş duyarlı bulundu.

3.1.4. Bağırsak Lup Testi

Bağırsak lup testi ile, ineklere ait 6 süt örneğinin 2'sinden (%33,3), 4 rektal svap örneğinin 2'sinden (%50) ve 4 altlık örneğinin 2'sinden (%50), koyunlara ait 5 süt örneğinin 3'ünden (%60), 3 rektal svap örneğinin 1'inden (%33,3) ve 2 altlık örneğinin 1'inden (%50) izole edilen toplam 11 (%45,8) *E. coli* suşu, tavşanların ince bağırsak bölmelerindeki gaz, sıvı birikimi ve hemoraji oluşumuna göre pozitif olarak değerlendirildi.

3.1.5. İnfant Fare Testi

İnfant farelere mide içi yola verilen, ineklere ait 20 süt örneğinin 3'ünden (%15), 14 rektal svap örneğinin 2'sinden (%14,3) ve 12 altlık örneğinin 2'sinden (%16,7), koyunlara ait 12 süt örneğinin 2'sinden (%16,7), 6 rektal svap örneğinin 1'inden

(%16,7) ve 4 altlık örneğinin 1'inden (%25) izole edilen toplam 11 (%16,2) *E. coli* suşu pozitif bulundu.

4. TARTIŞMA

Çeşitli ülkelerde ve ülkemizde ineklerde yaygın olarak görülen mastitis olguları içinde koliform mastitisler ve özellikle *E. coli*'lerden ileri gelen mastitis oranları farklılıklar göstermektedir. İngiltere ve Galler'de inek mastitislerinden izole edilen Gram negatif fakültatif anaerob 470 izolatın %90'ının *E. coli* olduğu bildirilirken (9), Avusturya'da akut ve subakut mastitis infeksiyonlarından izole edilen *E. coli* oranının %93 gibi yüksek düzeylerde olduğu (15) bildirilmiştir. Buna karşın Hollanda'da %27,71 (34) ve bu çalışmada ineklerde %15,2 olarak saptanan orana oldukça yakın bir oran olarak Macaristan'da saptanan %13,5 (31) gibi daha düşük oranlar bildirilmiştir. Ülkemizde ise, Batu ve ark. (11) mastitisli sütlerden izole edilen 481 etkenin %6,6'sının, Aydın ve Coşkuner (6) 564 etkenin %8,5'inin *E. coli* olduğunu belirlemişlerdir. Kaya ve ark. (30) 71 mastitisli süt örneğinin %23,58'inden *E. coli* izole ettiklerini açıklamışlar, Pir ve ark. (39) ise mastitisli inek sütlerinden izole edilen 421 etkenin %39'unun *E. coli* olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada 225 süt örneğinden izole edilen etkenlerin %16,4'ünün koliform grubu mikroorganizmalar olduğu ve *E. coli*'den ileri gelen mastitis oranı ise %15,1 olarak belirlenmiştir. Bu oran ülkemizde yapılan bazı çalışmalarda (11, 6) bildirilen oranlardan yüksek iken, bazı çalışmalarda bildirilen oranlardan (39, 30) ise düşüktür.

Koyun mastitislerinden izole edilen *E. coli* oranlarını Ateş ve ark. (1990) %9 olarak saptarken aynı araştırmacılar daha sonraki bir başka çalışmalarında (5) *E. coli*'lerden ileri gelen mastitis oranını %1,2 olarak saptamışlardır. Arslan (23) ve Erer ve ark. (18)'na göre *E.*

coli'nin neden olduğu mastitis oranları %6,2-6,66 arasında değişmektedir. Bu çalışmada *E. coli*'nin neden olduğu mastitis oranı (%12,9) daha yüksektir.

Sesli (43) ineklerden alınan 45 rektal svap örneğinin 26'sında koliform grubu mikroorganizma ürettiğini, bunların ise %33,3'ünün *E. coli* olduğunu bildirmektedir. Bu çalışmada ise mastitisli olduğu belirlenen ineklerden alınan rektal svap örneklerinin %87,3'ünden ve koyunlardan alınan örneklerin ise %82,4'ünden *E. coli* izole edilmiştir. İzgür (25) normal erişkin koyunlardan alınan 220 dışkı örneğinin 196'sından *E. coli* izole etmiştir. Carroll ve Jasper (13) ve Ayhan (7) sığırlardan alınan dışkı örneklerinden %100 oranında, yine Ayhan (7) koyunlardan ise %75 oranında *E. coli* izole edildiğini bildirmişlerdir. Mastitisli olduğu saptanan inek ve koyunların altlıklarından alınan örneklerin % 80'inden *E. coli* izole edilen bu çalışmanın sonuçları 133 altlık örneğinin 110'undan *E. coli* izole edildiğini bildiren Carroll ve Jasper (13)'in bulgularıyla uyum göstermektedir.

Bakterilerin epitel hücrelerinin yüzeyine yapışma yeteneğini sağlayan fimbriaların varlığının göstergesi olarak kabul edilen hemaglutinasyon özellikleri (32) yönünden inek mastitislerinden izole edilen 95 *E. coli* suşunu inceleyen Wray ve ark. (44), 10 *E. coli* suşunun sığır, koyun, domuz, keçi, kobay ve tavuk eritrositlerini %2 mannozlu ortamda aglutine ettiğini bildirmişlerdir. Hogan ve ark. (22) sığır meme infeksiyonlarından izole ettikleri 76 *E. coli* suşunun %57'sinin sığır eritrositlerini, %46'sının kobay eritrositlerini, %28'inin ise hem sığır hem de kobay eritrositlerini aglutine ettiğini ve bu izolatların sadece %14,5'inin sığır eritrositleri ve %2,6'sının kobay eritrositleri için MRHA pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Buna karşın Barrow ve Hill (9) sığır meme

infeksiyonlarından izole edilen *E. coli* suşlarının %86'sının kobay eritrositlerine karşı hemaglutinin oluşturduğunu ve %12'sinin D-mannoza dirençli olduğunu saptamışlardır. Sanchez-Carlo ve ark. (41)'nin bildirdikleri gibi, bu çalışmada da izolatların büyük çoğunluğu kobay ve tavşan eritrositlerine karşı mannoz duyarlı bulundu. İzole edilen 104 *E. coli* suşunun %16,4'ü kobay, %11,5'i tavşan, %0,96'sı koyun ve %4,8'i sığır eritrositlerine karşı duyarlı bulunurken %5,8'i kobay, %0,96'sı tavşan ve sığır eritrositlerine karşı dirençli bulundu. Hogan ve ark. (21, 22) hemaglutinasyon pozitif ve hemaglutinasyon negatif suşların izole edildiği infeksiyonlar arasında infeksiyon süresi ve şiddeti yönünden farklılık saptanmadığından hemaglutinasyon özelliğinin sığırlarda meme infeksiyonlarından izole edilen *E. coli*'ler için virülens faktörü olarak değerlendirilemeyeceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada ineklerden SHS'na ve koyunlardan ise CMT sonuçlarına göre örnekler toplanarak değerlendirmeye alındığından ve örneklerin alındığı hayvanlarda klinik belirtiler bulunmadığından infeksiyonun şiddeti ve süresi ile hemaglutinasyon özellikleri arasında bir bağlantı kurulması mümkün olamadı.

Kapsül oluşumu veya hücre duvarının kompozisyonu gibi bakterileri serumun bakterisidal aktivitesine karşı koruyan çeşitli mekanizmalar sonucu oluşan (44) serum dirençliliğine bağlı olarak, *E. coli*'lerin şiddetli mastitise neden olduğu (13) ve serum dirençliliğinin, özellikle etkenin memede canlı kalabilmesi ile ilişkili olan bir virülens faktörü olduğu pek çok araştırmacı tarafından kabul edilmektedir (44, 41, 9 13). Carroll ve Jasper (13), izole ettikleri *E. coli*'lerin %96'sını, Sanchez-Carlo ve ark. (41) ise %100'ünü serum dirençli bulmuşlardır. Wray ve ark. (44), inek mastitislerinden izole ettikleri 71 *E. coli* suşunun

41'inin kapsüler veya zarf K-antijenlerine sahip olduklarını göstermişlerdir. Barrow ve Hill (9), yine inek mastitisinden izole edilen 237 *E. coli* suşunun %99'unu serum dirençli bulurken suşların sadece %6'sının sığır serumunda üreyebildiğini ve suşların %75'inde mikroskopla görülebilir kapsül bulunduğunu saptamışlardır. Mastitisli meme loblarından ve hayvanların buldukları ortamlardan izole edilen koliform grubu mikroorganizmaların serum dirençli oldukları (13,36) bu çalışmada da mastitisli ineklerden alınan süt örneklerinden izole edilen *E. coli* suşlarının %96,7'sinin, fekal örneklerin %100'ünün ve altlık örneklerinin %94,1'inin, mastitisli koyunlardan alınan süt, dışkı ve atlık örneklerinden izole edilen *E. coli* suşlarının ise %100'nün serum dirençli olmalarıyla bir kez daha doğrulanmaktadır.

Patojenik *E. coli* suşlarında patojenik özelliklerle ilişkili olan genleri taşıyan plazmidler üzerinde taşındığından, serumda canlı kalmayı, fagositoza direnci ve bağırsak epitel hücrelerine yapışmayı arttıran col V'in, (36) virulensle bağlantılı olduğu (38) belirtilmekle birlikte, Wray ve ark. (44) 71 *E. coli* suşunun 15'inin kolisinojenik olduğunu, bunların da sadece 3'ünün col V üretebildiğini saptamışlardır. Barrow ve Hill (9) inek mastitisi kökenli 237 *E. coli* suşunun %18'inin kolisin ve %5'inin ise col V ürettiğini, Nemeth ve ark. (36) da 50 süt örneğinin 14'ünün kolisin ve 6'sının col V ürettiğini saptamışlardır. Sağlıklı sığır, koyun ve keçilerden alınan fekal örneklerden 300 *E. coli* suşu izole edilen bir çalışmada (37), koyun izolatlarının %46'sının, keçi izolatlarının % 38'inin ve sığır izolatlarının % 16'sının Brain Heart Infusion Blood Agarda kolisin aktivitesine sahip olduğu belirtilmektedir. İzgür (25) tarafından sağlıklı erişkin koyunlardan alınan dışkı örneklerinin % 3'ünün, İzgür ve İstanbulluoğlu (26) sağlıklı koyunların

dışkılardan izole edilen *E. coli*'lerin %6'sının, Ayhan ve Aydın (8) sağlıklı ve hasta hayvanlardan izole ettikleri *E. coli*'lerden sığır kökenli olanların % 5,1'inin, Diker ve İstanbulluoğlu (17) sağlıklı kanatlıların dışkılardan izole ettikleri *E. coli*'lerin %14'ünün, Erganiş (19) ise hindi kloakal svaplarından izole ettiği *E. coli* suşlarının %4,2'sinin kolisinojenik olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada, koyunlardan ve koyun barınaklarından alınan örneklerden izole edilen *E. coli* suşlarının hiçbirisinin kolisin sentezlememesi ve ineklere ait süt, rektal svap ve altlık örneklerinden izole edilen 68 *E. coli* suşunun sadece 2'sinin (%2,9) kolisin üretmesi ve 5 suşun (%7,4) kolisin üreten bu iki suşa karşı duyarlı olması, kolisin üretiminin mastitisli ineklerden alınan örneklerden izole edilen *E. coli* suşları arasında yaygın olmadığını belirten araştırmacıların (9, 16, 36, 44) görüşlerini destekler niteliktedir. Ancak, süt ve altlıktan izole edilen kolisin aktif bu iki *E. coli* suşunun biyokimyasal özellikler ve diğer virülens faktörleri yönünden benzerlik göstermesi, bu hayvanlardaki mastitis olgularının çevresel kökenli olabileceğini düşündürmektedir.

E. coli suşlarının in vivo patojenite denemelerinde sık kullanılan bir test olan tavşan lup testi ile ineklere ait 6 süt, 4 rektal svap ve 4 altlık örneğinden izole edilen 14 *E. coli* suşunda sırasıyla %33,3, %50 ve %50 oranlarında ve koyunlara ait 5 süt, 3 rektal svap ve 2 altlık örneğinden izole edilen 10 *E. coli* suşunun ise sırasıyla %60, %33,3 ve %50 oranlarında pozitiflik saptanan bu çalışmanın sonuçları, septisemili buzağılardan izole ettiği 104 *E. coli* suşunun % 64,3'ünü (23), yine septisemili buzağılardan izole ettikleri 104 *E. coli* suşunun % 64,3'ünü (24), pozitif bulan araştırmacıların sonuçlarıyla uygunluk göstermektedir. Erganiş ve ark. (20) ise ishali buzağılardan izole ettikleri

94 *E. coli* suşunun %36,2'sinin, Erganiş (19) hindi kloakal svaplarından izole ettiği 188 *E. coli* suşunun %30,8'inin, İzgür (25) sağlıklı koyunlardan izole ettiği 196 suşun %24'ünün tavşan lup testinde pozitif sonuç verdiğini bildirmektedirler.

Erganiş ve ark. (20) ishali buzağılardan izole ettikleri 94 *E. coli* suşunun %16'sının enterotoksijenik olduğunu belirlemişlerdir. Erganiş (19) hindi fekal florasyndan izole ettiği *E. coli* suşlarının %11,2'sinin infant fare testinde pozitif sonuç verdiğini açıklamıştır. Blanco ve ark. (12) 197 ishali ve 112 sağlıklı sığırdan izole ettikleri 1524 *E. coli* kolonisini termo-labil ve termo-stabil enterotoksin, verotoksin ve CNF1 ve CNF2 yönünden incelemişler ve sadece 2 (%1) ishali ve 5 (%4) sağlıklı buzağıdan ETEC izole ettiklerini bildirmişlerdir. Akut mastitisli ineklerden izole edilen 184 *E. coli* suşunun sadece 1'inin ST ve 2'sinin ise LT ürettiği saptanmıştır (41). İneklere ait 20 süt, 14 rektal svap ve 12 altlıktan izole edilen 46 *E. coli* suşuna ve koyunlara ait 2 süt, 6 rektal svap ve 4 altlıktan izole edilen 22 *E. coli* suşuna uygulanan infant fare testi sonuçlarına göre sırasıyla ineklere ait 3 süt (%15), 2 rektal svap (%14,3) ve 2 altlık (%16,7) ve koyunlara ait 2 süt (%16,7), 1 rektal svap (%16,7) ve 1 altlık (%25) örneğinden izole edilen *E. coli* suşlarının enterotoksijenik olduğu belirlenen bu çalışmanın sonuçları da enterotoksin üretiminin mastitisli hayvanlardan izole edilen *E. coli*'lerde yaygın bir özellik olmadığı (41) görüşü ile uyum içerisindedir. Bu çalışmada, infant fare testinde pozitif sonuç veren *E. coli* suşlarının tümünün tavşan bağırsak lup testinde de pozitif sonuç vermesi, farklı enterotoksinlerin üretildiğini ve her enteropatojen suşun enterotoksin sentezlemediğini göstermektedir.

5. SONUÇ

İnek ve koyun mastitislerinden izole edilen koliform grubu mikroorganizmalar içerisinde oldukça yüksek düzeylerde *E. coli* saptaması, *E. coli* mastitislerinin önemini ve dolayısıyla mastitisli hayvanların süt, dışkı ve altlıklarından alınan örneklerden izole edilen *E. coli* suşlarının biyokimyasal özellikleri ve virülens faktörlerinin karşılaştırılmasıyla *E. coli* suşlarının patojenitelerinin ve mastitis oluşumundaki rolünün belirlenmesinin üzerinde durulması gereken bir konu olduğunu göstermektedir.

En yüksek oranda kobay ve tavşan eritrositlerini hemaglutine eden *E. coli* suşlarının bu çalışmada uygulanan diğer patojenite testlerinde farklı sonuçlar vermesi HA özelliğinin mastitis etkeni *E. coli*'ler için bir virülens faktörü olarak değerlendirilemeyeceğini gösterebilir.

Biyokimyasal özellikleri yönünden tipik bulunan *E. coli* suşlarının hemen tümüne yakınının bir patojenite kriteri olarak kabul edilen serum dirençliliği yönünden pozitif bulunması, literatürlerde de belirtildiği gibi serum dirençliliğinin mastitis etkeni *E. coli*'ler için bir virülens faktörü olabileceğini göstermektedir.

Virülensle ilişkisi konusunda farklı bildirimler bulunan kolisin aktivitesine sahip *E. coli* suşları, uygulanan tüm patojenite ve toksijenite testlerinde pozitif sonuç vermesine ve birinin süt ve diğerinin ise altlık örneğinden izole edilmiş olmasına karşın, bu çalışmada çok az sayıda kolisin aktivitesi gösteren suş izole edilmiş olduğundan kolisin üretiminin mastitis neden olan *E. coli*'ler için bir virülens faktörü olarak önem taşımadığı kanaatine varılmıştır.

Termo-stabil endotoksinlerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bağırsak lup testinde, özellikle STA

enterotoksinine daha duyarlı olan infant fare testine göre daha yüksek oranda pozitiflik saptanması ve infant fare testi pozitif olan *E. coli* suşlarının tümünün tavşan bağırsak lup testinde de pozitif olması *E. coli* suşlarının farklı enterotoksinlere sahip olduğunu ve her enteropatojen suşun enterotoksin sentezlemediğini göstermektedir.

Mastitis olgularından izole edilen *E. coli* suşlarının virülens faktörleri farklılık gösterdiğinden, serum dirençliliği dışında incelenen faktörlerin mastitisin patogenezinde doğrudan rollerinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. ANDERSON JC, BURROWS MR, BRAMLEY AJ (1977): Bacterial adherence in mastitis caused by *E.coli*. *Vet Pathol*, **14**: 618-628.
2. ARDA M, MİNBAY A, AYDIN N, AKAY Ö, İZGÜR M, LELOĞLU N, KAHRAMAN M, ILGAZ A, DİKER KS (1997). Özel Mikrobiyoloji. 4. Baskı, Ankara: Medisan Yayın Evi, s. 45-47.
3. ARSLAN N (1981). Elazığ bölgesi koyunlarında mastitis'in etiyolojisi üzerine araştırma. Uzmanlık Tezi. Elazığ Vet Kont Araş Enst.
4. ATEŞ M, ERGANİŞ O, KAYA O, ÇORLU M (1990). Koyun mastitisleri üzerinde mikrobiyolojik incelemeler. *Selçuk Üniv Vet Fak Derg*, **6-7**: 3-6.
5. ATEŞ M, ERGANİŞ O, ÇORLU M. (1991). Konya yöresindeki mastitis'li ineklerden elde edilen süt örneklerinin mikrobiyel florası ve LDH aktivitesi. *Doğa Tr J Vet Anim Sci*, **16**: 19-29.
6. AYDIN N, COŞKUNER MR (1982-1983). Ankara bölgesinde klinik ve subklinik mastitislere neden olan aerobik mikroorganizmaların ve mantarların izolasyon

- identifikasyon ve antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının saptanması üzerinde çalışmalar. *Etlik Vet Mikrob Enst Derg*, **5**: 7-28.
7. AYHAN H (1985). İnsan ve hayvanlardan izole edilen *Escherichia coli* suşlarının biyokimyasal, antibiyotiklere duyarlılık ve kolisin plazmidi taşıma özellikleri üzerinde incelemeler. Yüksek Lisans Tezi Ankara Üniv Vet Fak
 8. AYHAN H, AYDIN N (1989). İnsan ve hayvanlardan izole edilen *Escherichia coli* suşlarının kolisin plazmidi taşıma özellikleri üzerinde incelemeler. *Etlik Vet Mikrob Derg*, **6**: 91-99.
 9. BARROW PA, HILL AW (1989). The virulence characteristics of strains of *Escherichia coli* isolated from cases of bovine mastitis in England and Wales. *Vet Microbiol*, **20**: 35-48.
 10. BATU A (1979). Sığır mastitisi. *Pendik Vet Mikrob Derg*, **11**: 80-122.
 11. BATU A, DURAK Ö, FIRAT G (1979). Marmara ve Trakya bölgesi süt ineklerinde klinik ve subklinik mastitisler ve etkenleri ile bu etkenlerin antibiyotiklere duyarlılıklarının tesbiti üzerinde araştırma. *Pendik Vet Mikrob Derg*, **11**: 25-40.
 12. BLANCO M, BLANCO J, BLANCO JE, RAMOS J (1993). Enterotoxigenic, verotoxigenic, and necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. *Am J Vet Res*, **54**: 1446-1451.
 13. CARROLL EJ, JASPER DE (1977). Bactericidal activity of standard bovine serum against coliform bacteria isolated from udders and the environment of dairy cows. *Am J Vet Res*, **38**: 2019-2022.
 14. CLEGG S, GERLACH GF (1987). Enterobacterial fimbria. *J Bacteriol*, **169**: 934-938.
 15. DEUTZ A, AWAD-MASALMEH M, KÖFER J (1995). Characteristics of *E. coli* involved in bovine mastitis. Proceedings of the Third IDF International Mastitis Seminar. Tel-Aviv, 28 May-1 June 1995, Sess.6, p.:80-81.
 16. DİKER S (1984). Koliform mastitisler, I. Mastitis Semineri. Lalahan Veteriner Zootečni Araştırma Enstitüsü Yetiştirme ve Deneme Çiftliği Müdürlüğü Ofset Tesisleri, Ankara. S.:17-79.
 17. DİKER S, İSTANBULLUOĞLU E (1980). Tavuklardan izole edilen *Escherichia coli* suşlarının biyokimyasal, kolisin, lizojenik karakterleri ve antibiyotiklere duyarlılık oranları üzerinde incelemeler. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **27**: 484-490.
 18. ERER H, ATEŞ M, KAYA O, KIRAN MM, BERKİN Ş (1990). Koyun mastitisleri üzerinde patolojik ve bakteriyolojik incelemeler. *Etlik Vet Mikrob Derg*, **6**: 79-93.
 19. ERGANİŞ O (1987). Hindilerin fekal florasyndan izole edilen *E. coli* suşlarının bazı patojenite özellikleri üzerinde incelemeler. Doktora Tezi. Selçuk Üniv. Vet. Fak.
 20. ERGANİŞ O, ATEŞ M, KAYA O, ÇORLU M (1987). Konya bölgesindeki ishalleri buzağılardan izole edilen *E. coli*'lerin biyokimyasal, serolojik, hemaglutinasyon ve enteropatojenik, özellikleri üzerinde araştırmalar. TÜBİTAK Veterinerlik ve Hayvancılık Araştırma Grubu Proje No:VHAG-687.
 21. HOGAN JS, TODHUNTER DA, SMITH K, SCHOENBERGER PS (1990a): Hemagglutination of bovine and guinea pig erythrocytes by *Escherichia coli* isolated from bovine intramammary infections. *J Dairy Sci*, **73**: 188.
 22. HOGAN JS, TODHUNTER DA, SMITH KL, SCHOENBERGER PS (1990b). Hemagglutination and hemolysis by

- Escherichia coli* isolated from bovine intramammary infections. *J Dairy Sci*, **73**: 3126-3131.
23. İSTANBULLUOĞLU E (1978). Septicaemia neonatoriumlu buzağılardan izole edilen *Escherichia coli* suşlarının biyokimyasal, serolojik, enterotoksijenik, antibiyotiklere duyarlılık, bulaşıcı tip plasmid (R-faktör) taşıma özellikleri ile enfekte ve normal buzağılardan elde edilen serum örneklerinin immuno globulin (IgG,IgA,IgM) miktarları üzerinde incelemeler. Doçentlik Tezi. Ankara Üniv Vet Fak.
24. İSTANBULLUOĞLU E, DİKER S (1980). Septicaemia neonatoriumlu buzağılardan izole edilen *Escherichia coli* suşlarının biyokimyasal, enterotoksijenik, antibiyotiklere duyarlılık, plasmid taşıma ve lizojenik özellikleri üzerinde incelemeler. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **27**: 474-483.
25. İZGÜR M (1981). Sağlıklı koyunlardan izole edilen *E. coli* suşlarının çeşitli özellikleri üzerinde incelemeler. Doktora Tezi. Ankara Üniv Vet Fak.
26. İZGÜR M, İSTANBULLUOĞLU E (1982). Sağlıklı koyunlardan izole edilen *Escherichia coli* suşlarının çeşitli özellikleri üzerinde incelemeler. *Doğa Vet Hay Tar Orm* **6**: 29-34.
27. İZGÜR M (1983). Kolisinler. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **30** : 234-241.
28. JONES TO (1990). *Escherichia coli* mastitis in dairy cattle – A review of the literature. *Vet Bull*, **60**: 205-231.
29. KAECKENBEECK A (1993). Le diagnostic des souches pathogenes d'*Escherichia coli*: petites et grandes histoires. *Ann Med Vet*, **137**: 337-340.
30. KAYA O, ERGANİŞ O, KUYUCUOĞLU Y (1993). İnek mastitislerine sebep olan mikroorganizmalar ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Vet Hek Derg*, **5**: 49-51.
31. KULCSAR M, GACS M, HUSZENICZA GY, KEGL T, JONSSON P (1995). Incidence of mastitis of different bacteriological background in seven large-scale dairy herds in Hungary. Proceedings of the Third IDF International Mastitis Seminar 28 may-1 June 1995, Tel-Aviv, Israel Sess.6 p. : 80-81.
32. KROGFELT KA (1991). Bacterial adhesion: genetics, biogenesis. And role in pathogenesis of fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. *Rev Infect Dis*, **13**: 721-735.
33. LASSEN J (1975) Rapid identification of gram-negative rods using a three- tube methods combined with a dichotomic key. *Acta Pathol Mikrobiol Scand Sect B*, **83**: 525-533.
34. LIPMAN LJA,LAM TJGM, NIJS A, SCHUKKEN YH, GAASTRA W (1995). Comparison of *Staphylococcus aureus* strains and *Escherichia coli* strains isolated from bovine mammary glands and implications for epidemiological studies on mastitis. Proceedings of the third IDF International Mastitis Seminar 28 may-1 June 1995, Tel-Aviv, Israel Sess.6 p. : 28-32.
35. NEMETH, J., MUCKLE, A.M., REGGIE, Y.C. (1991). Serum resistance and the *traT* gene in bovine mastitis-causing *Escherichia coli*. *Vet Microbiol*, **28**: 343-351.
36. NEMETH, J., MUCKLE, C.A., GYLES,C.L. (1994). In vitro comparison of bovine mastitis and fecal *Escherichia coli* isolates. *Vet Microbiol*, **40**: 231-238.
37. OBI SKC, CAMPBEL JA (1978). Incidence of colicinogenic *Escherichia coli* in sheep, goats and cattle. *Zbl. Vet Med B*, **25**: 652-656.
38. OU SAID AM, CONTREPOIS MG, VARTANIAN MD, GIRARDEAU JP (1988). Virulence factors and markers in *Escherichia coli* from calves with bacteremia. *Am J Vet Res*, **49** : 1657-1660.

39. PİR M, HASDEMİR F, GÜLER E (1983). İzmir bölgesinde klinik ve subklinik mastitislere neden olan aerobik mikroorganizmaların izolasyon, identifikasyon ve antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının saptanması üzerine çalışmalar. *Pendik Vet Mikrobiol Enst Derg*, **15**: 37-47.
40. POH P (1993). Les souches pathogenes d'*Escherichia coli*, histoire et classification. *Ann. Med Vet*, **137**: 325-333.
41. SANCHEZ-CARLO V, McDONALD JS, PACKER RA (1984a). Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from cows with acute mastitis. *Am J Vet Res*, **45** : 1775-1777.
42. SANCHEZ-CARLO V, WILSON RA, McDONALD JS, PACKER RA (1984b). Biochemical and serologic properties of *Escherichia coli* isolated from cows with acute mastitis. *Am J Vet Res*, **45**: 1771-1774.
43. SESLİ OT (1985). Sığırlardan izole edilen *Escherichia coli* suşlarının hemaglutinasyon yeteneklerinin incelenmesi üzerinde çalışmalar. *Etlik Vet Mikrob Derg*, **5** : 84-102.
44. WRAY C, CALLOW RJ, SOJKA WJ (1983). An examination of *Escherichia coli* strains isolated from cases of bovine mastitis for possible virulence determinants. *Vet Microbiol*. **8**: 141-145.