

## Sığır mastitislerinde Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin filtrasyon-boyama yöntemi ile çabuk tanısı

Serap SAVAŞAN, Osman KAYA

Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın

**Özet:** Bu çalışmada, filtrasyon-boyama yönteminin klinik ve subklinik mastitisli sütlerde Gram pozitif ve Gram negatif bakteri varlığını belirlemedeki etkinliği incelendi. Filtrasyon tekniğinde, ayrıca karıştırılan sütler filtrasyon işlemlerinden geçirildikten sonra boyandı ve sonuçlar değerlendirildi. Yöntemin minimal tanı limitlerini belirlemek için deneysel olarak inokule edilen normal süt örneklerinde, filtrasyon yöntemi ile Gram pozitif bakterilerin  $8.96 \times 10^5$ - $3.80 \times 10^6$ /ml ve Gram negatif bakterilerin  $6.56 \times 10^5$ - $8.40 \times 10^5$ /ml miktarları saptanabildi. İncelenen tüm bakteri türleri, filtrasyon yöntemi ile referans Gram reaksiyonuna uygun sonuçlar verdi ve bakteri inokule edilmeyen kontrol süt örneklerinde filtrasyon ile hatalı pozitif sonuç alınmadı. Yöntemin saha performansını belirlemek için klinik mastitisli 66 ve subklinik mastitisli 52 süt örneği filtrasyon yöntemi ile ve bakteriyolojik olarak incelendi. İncelenen klinik mastitis vakalarının %95.5'inde ve subklinik mastitis vakalarının %86.5'inde kültür ile uyumlu sonuçlar alındı. Filtrasyon yöntemindeki hatalı bulgular bakteri varlığının saptanamamasından veya boyanmadan kaynaklandı. Mastitis belirtisi bulunmayan hayvanlara ait 30 süt örneğinden hatalı sonuç alınmadı. Yöntemin klinik mastitislerdeki sensitivite ve spesifitesi, bakteri varlığını saptama yönünden %96 ve %100, Gram pozitif-negatif ayırma yönünden %98-100; aynı değerler için subklinik mastitislerde sırasıyla %85 ve %100, ve %93-100 olarak bulundu. Sonuçta, kolayca uygulanabilen ve kısa sürede sonuç veren filtrasyon yönteminin, saha koşullarında özellikle klinik mastitislerin etiyojisi hakkında ön bilgiler verebileceği kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: çabuk tanı, Gram negatif, Gram pozitif, mastitis, sığır, süt

### Rapid detection of Gram-positive and Gram-negative bacteria in bovine mastitis

**Summary:** In this study, the ability of a filtration-staining method to detect Gram-positive and -negative bacteria in milk from cows with mastitis was evaluated. The technique consisted of filtration of milk and concentration of bacteria on filter, followed by staining and decoloration of filter. In normal milks inoculated with several bacteria, to determine the minimal detection limits of method,  $8.96 \times 10^5$ - $3.80 \times 10^6$ /ml of Gram-positive and  $6.56 \times 10^5$ - $8.40 \times 10^5$ /ml of Gram-negative bacteria could be detected. No false-positive result was observed in uninoculated control milks. To evaluate the performance of filtration method in mastitic milk, technique was applied to 66 samples from clinical mastitis and 52 samples from subclinical mastitis. Filtration method correctly showed the presence of bacteria in 95.5% of culture-positive milks with clinical mastitis, corresponding to a 96% sensitivity. Bacteria were correctly detected in 86.5% of milk samples from subclinical mastitis with filtration method, which corresponds to a sensitivity of 85%. The test correctly identified all milk samples without the presence of bacteria both in clinical and subclinical mastitis, corresponding to 100% specificity. Gram-positive and -negative bacteria were correctly identified with a sensitivity of 98 and 100% and specificity of 100 and 98%, in milk samples from clinical mastitis. Sensitivity and specificity for predicting Gram reaction were between 93 and 100 percent in samples from subclinical mastitis. False-staining reactions were observed only in Gram-positive bacteria, including two *Streptococcus* sp. and one *Corynebacterium* sp.. It was concluded that filtration method may be used to make a quick decision for gross etiology and treatment of clinical mastitis and with a lesser extent subclinical mastitis, in field conditions.

Key words: bovine, Gram-negative, Gram-positive, mastitis, milk, rapid diagnosis

### Giriş

Mikrobiyal kökenli mastitis, tüm dünyada sığırcılığın en çok ekonomik kayba neden olan hastalığı olarak kabul edilmektedir. Klinik ve subklinik karekterde, akut ve kronik seyirli olabilen mastitisler, sığırlarda verim düşüklüğü, ürün kaybı ve tedavi masrafları nedeniyle ekonomik kayıplara yol açabildiği gibi, insan sağlığı açısından da risk oluşturabilmektedir (11,18,24). Mastitis neden olan etkenler arasında ilk sıraları *Staphylococcus* ve *Streptococcus* gibi Gram pozitif bakteriler almakta, bunları başta *Escherichia coli* olmak üzere Gram negatif

bakteriler izlemektedir (1,2,4,7,14,19). Mastitis etiyojisinin incelendiği bir derlemede, mastitis vakalarından 150'den fazla bakteri türünün izole edildiği bildirilmiştir (22). Mastitisin klinik belirtileri, birkaç istisna dışında etiyojik ajana özel olmadığından, sağaltım açısından mastitisin mikrobiyal kökeninin veya neden olan mikroorganizma grubunun ayırt edilmesi önem taşımaktadır (5). Etiyojik ajanın bulunmasında en etkili fakat geç sonuç veren bakteriyolojik kültüre alternatif olarak çeşitli çabuk tanı yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden elektriksel konduktivite ölçümü (3), flow sitometri (8),

çabuk hücre sayımı (13), filtrasyon-epiflorasans mikroskopisi (15), direkt veya indirekt bakteri varlığını göstermekte; limulus testi (9) Gram negatif bakterileri; polimeraz zincir reaksiyonu (17) spesifik etkenleri; serumkan biyokimyasal analizi (20) ve filtrasyon-boyama yöntemi (25), Gram pozitif ve Gram negatif bakterileri ayırmaktadır.

Bu çalışmada, filtrasyon-boyama yönteminin klinik ve subklinik mastitisli sütlerde Gram pozitif ve Gram negatif bakteri varlığını belirlemedeki etkinliğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

### Materyal ve Metot

**Bakteri suşları:** Filtrasyon yönteminin saptayabildiği minimal bakteri sayısını incelemek için, mastitis vakalarından izole edilen aşağıdaki bakteri suşları kullanıldı; *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*. Bakteri suşlarının üretilmesinde ve canlı bakteri sayımlarının yapılmasında kanlı agar kullanıldı.

**Filtrasyon yöntemi:** Her bakteri suşu, türe uygun koşullarda üretildikten sonra, kanlı agarda sayım yapılarak FTS (% 0.85 fizyolojik tuzlu su) içinde  $10^9$  cfu/ml (colony forming unit/ml) canlı bakteri içeren stok kültür hazırlandı. Stok kültürün FTS içinde  $10^2$ 'ye kadar 10 katlı sulandırılmaları yapıldı. Her sulandırmadan 1 ml alınarak, mastitis belirtisi göstermeyen sağlıklı sığırlardan toplanan, bakteri kültürü negatif ve somatik hücre sayısı 50.000/ml'den az olan süt örneklerinin 9 ml'sine katıldı. Bakteri içermeyen süt örnekleri negatif kontrol olarak kullanıldı. Filtrasyon yöntemi, Yazdankhah ve ark.(25) tarafından bildirilen yöntemde yapılan modifikasyonlarla uygulandı. Hazırlanan 1 ml süt örneğine 4 ml A ayırıcı (1 M NaCl, %0.5 Triton X-100, 0.1 M EDTA [pH 12.5]) eklendi. Ön filtrasyon işleminde, süt-ayırıcı karışımı 0.80 µm por çaplı polipropilen filtreden geçirildi. Elde edilen filtrat 0.65 µm por çaplı polisulfon filtreden süzüldü. Filtre membranının yıkanması için, 1 ml %1 Triton X-100 (Ayırıcı B) filtreden geçirildi. Filtre 1 ml C ayırıcı (133 µm toludin mavisi) ile 1-2 dakika boyandıktan sonra 2 ml B ayırıcı ile yıkandı (Bu aşamada filtre membranının boyanmış olarak kalması, süt örneğinde bakteri varlığını; membranın boyanmaması bakterinin saptanamadığını gösterdi). Daha sonra filtre, 1ml D ayırıcı (%10 etanol, asetik asit ile pH 2.8-3.0'e ayarlanmış) ile dokolorize edildi (Bu aşamada, filtrede açık-mavi rengin kalması sütte Gram pozitif bakterilerin bulunduğunu, renk kalmaması Gram negatif bakterilerin bulunduğunu gösterdi). Tüm aşamalarda filtrasyon işlemi enjektör basıncı ile gerçekleştirildi. Dilue bakterileri içeren süt örneklerinden

elde edilen bulguları karşılaştırmak için, işlemde geçirilmemiş deneysel inokule sütlerden 3 adet kanlı agar üzerinde bakteri sayımı yapıldı.

**Mastitisli süt örnekleri:** Filtrasyon yönteminin klinik mastitis vakalarındaki geçerliliğini saptamak için, memesinde ağrı, lokal ısı artışı, şişkinlik, sertlik ve anormal sekresyon belirtileri bulunan sığırlar saptandı. Mastitis belirtileri gösteren ve CMT (California Mastitis Test) ile sütte yüksek hücre sayısı bulunan 48 sığırın 66 meme lobundan süt örnekleri alındı. CMT ile yüksek hücre içeriği saptanan subklinik mastitisli 43 hayvandan 52 süt örneği toplandı. Ayrıca, mastitis belirtisi göstermeyen, CMT negatif olan ve bakteri üretilemeyen 30 hayvana ait 30 süt örneği kontrol amacıyla kullanıldı. Her meme lobuna ait süt örneği, ayrı steril kaplara alınarak sahada incelendi veya +4°C'de saklanarak 6 saat içinde incelendi.

Mastitisli süt örneklerinin incelenmesinde, aşağıda belirtilen değişiklikler ile filtrasyon yöntemi uygulandı. İşlemin başlangıcında, 1 ml mastitisli süt örneği doğrudan 4 ml A ayırıcıya katılarak, 50-55°C su banyosunda 2 dakika bekletildi. Ön filtrasyon işleminde, örnek, 150 mg hidrofobik poliuretan içeren 10 ml'lik enjektöre çekilerek, monte edilmiş filtreden geçirildi. Kontrol amaçlı normal süt örneklerinde poliuretanlı enjektör kullanılmadı. Sonuçlar, yukarıda belirtilen şekilde değerlendirildi.

**Bakteriyolojik inceleme:** Mastitisli ve normal süt örneklerinden kalibre öze ile 50 µl alınarak kanlı agara ekim yapıldı. Besiyerleri 37°C'de 24-48 saat inkube edildi. İzole edilen bakteriler morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre cins veya tür düzeyinde identifiye edildi (16). İzole edilen bakterilerin Gram boyanma özellikleri belirlendi.

**Spesifite ve sensitivite:** Klinik ve subklinik mastitisli süt örneklerinden elde edilen bulgular, filtrasyon yönteminin kültür yöntemine karşı spesifite, sensitivite ve prediktif değerlerinin hesaplanmasında kullanıldı (21). Bu değerler, filtrasyon yönteminin bakteri varlığını göstermesi, Gram pozitif bakterileri ayırması ve Gram negatif bakterileri ayırması yönünden incelendi.

### Bulgular

Filtrasyon yönteminin minimal tanı limitlerini belirlemek için yapılan çalışmalarda, Gram negatif bakterilerden *E.coli*'nin en düşük  $7.16 \times 10^5$ , *P.aeruginosa*'nın  $6.56 \times 10^5$  ve *K.pneumonia*'nın  $8.40 \times 10^5$  sayıları 1 ml sütte saptanabildi (Tablo 1). Gram pozitif bakterilerden *S.aureus*, *S.agalactiae* ve *A.pyogenes*'in filtrasyon yöntemiyle 1 ml sütte saptanabilen minimal sayıları sırasıyla  $8.96 \times 10^5$ ,  $2.83 \times 10^6$  ve  $3.80 \times 10^6$  olarak bulundu. Bakteri ile inokule edilmeyen kontrol süt örneklerinde, filt-

rasyon ile hatalı pozitif sonuç alınmadı. Filtrasyon yöntemi ile incelenen tüm bakteri türleri, referans Gram reaksiyonuna uygun sonuçlar verdi. İşlemler sonunda polisulfon filtreler Gram pozitif türlerde mavi renkte kahrken, Gram negatif türlerde dekolore olarak filtrenin beyaz rengini aldı.

Tablo 1. İnokule edilen normal sütlerde, filtrasyon yöntemi ile saptanabilen en düşük bakteri sayıları.

Table 1. Minimal detection limits in milks experimentally inoculated with bacteria.

Bakteri Türü	Bakteri Sayısı (cfu/ml)	Standart Sapma (cfu/ml)
<i>S.aureus</i>	8.96 x 10 <sup>5</sup>	1.98 x 10 <sup>5</sup>
<i>S.agalactiae</i>	2.83 x 10 <sup>6</sup>	1.61 x 10 <sup>6</sup>
<i>A.pyogenes</i>	3.80 x 10 <sup>6</sup>	2.26 x 10 <sup>6</sup>
<i>E.coli</i>	7.16 x 10 <sup>5</sup>	1.33 x 10 <sup>5</sup>
<i>P.aeruginosa</i>	6.56 x 10 <sup>5</sup>	1.72 x 10 <sup>5</sup>
<i>K.pneumonia</i>	8.40 x 10 <sup>5</sup>	0.70 x 10 <sup>5</sup>

Filtrasyon yönteminin doğal olarak infekte sütlerdeki performansını incelemek için 66 adet klinik mastitisli ve 52 adet subklinik mastitisli süt örneği toplandı. Bu örneklerle filtrasyon yöntemi uygulandı ve bakteri kültürü yapıldı. Kültür bulguları referans alındığında, filtrasyon yönteminin klinik mastitisli sütlerde bakteri varlığını ve grubunu %95.5 oranında doğru olarak belirlediği bulundu (Tablo 2). Bu örneklerde saptanan 3 hatalı sonuçtan 2'si bakterilerin saptanamamasından, biri yanlış bakteri grubunu göstermesinden kaynaklandı. Filtrasyon yöntemi ile incelenen 52 subklinik mastitisli örneğin 45'inde (%86.5) kültür ile uyumlu sonuç alınırken, 7 (%13.5) örnekte hatalı sonuçlar saptandı (Tablo 2). Bu örneklerin 5'inde bakteri varlığının saptanamaması ve 2'sinde farklı grubun bulunması, hatalı sonuçların nedenini oluşturdu. Filtrasyon yönteminde, klinik ve subklinik mastitisli süt örneklerindeki hatalı sonuçların tümü Gram pozitif bakteriler ile ilişkili bulundu; Gram negatif bakterilerden kaynaklanan hatalı sonuca rastlanmadı. Klinik veya subklinik mastitis belirtisi bulunmayan hayvanlara ait 30 süt örneğinde hatalı pozitif sonuç alınmadı.

Tablo 2. Bakteri kültürüne göre filtrasyon yöntemi ile alınan doğru ve hatalı sonuçlar.

Table 2. True and false results in filtration method on the basis of culture in mastitic milk samples.

Kültür sonucu	Filtrasyon Yöntemi Sonuçları (%)				
	Klinik Mastitis (n=66)		Sublinik Mastitis (n=52)		Normal Süt (n=30)
	Doğru	Hatalı	Doğru	Hatalı	Hatalı
Bakteri var	54	3	27	7	0
Gram (+)	46	3	25	7	
Gram (-)	8	0	2	0	
Bakteri yok	9	0	18	0	0
Toplam	63(95.5)	3(4.5)	45(86.5)	7(13.5)	0

İncelenen 66 klinik mastitisli süt örneğinden 31 *Staphylococcus*, 15 *Streptococcus*, 3 *Corynebacterium bovis*, 5 *E.coli*, 2 *Pseudomonas* ve 1 *Klebsiella* suşu izole edildi (birden fazla bakteri türünün izole edildiği örneklerde, mutlaka bir tür baskın bulundu ve değerlendirilmeye bu tür alındı). *Streptococcus* ve *C.bovis* izole edilen birer örnekte filtrasyon yöntemi ile bakteri varlığı saptanamadı. *Streptococcus* izole edilen bir sütte ise, filtrasyon yöntemi hatalı olarak Gram negatif bakteri bulgusu verdi. İzole edilen diğer bakteri türleri ile ilgili hatalı sonuçlar gözlenmedi. İncelenen 52 subklinik mastitisli süt örneğinden 22 *Staphylococcus*, 8 *Streptococcus*, 2 *C.bovis* ve 2 *Klebsiella* suşu izole edildi. *Staphylococcus* izole edilen 4 ve *Streptococcus* izole edilen bir örnekte filtrasyon yöntemi ile bakteri varlığı saptanamadı. *Streptococcus* ve *C.bovis* izole edilen birer örnekte, filtrasyon yöntemi hatalı olarak Gram negatif bakteri bulgusu verdi. Filtrasyon yönteminde farklı boyanma hatası veren 2 *Streptococcus* ve bir *C.bovis* suşunun katı kültüründen lam üzerinde yapılan Gram boyamada, bu suşların daha kolay dekolore oldukları ve değişken Gram reaksiyonu gösterdikleri gözlemlendi. Çalışmada izole edilen diğer suşlar, tipik Gram boyanma özelliklerini gösterdiler.

Tablo 3. İzole edilen bakterilere göre filtrasyon yöntemi ile belirlenen doğru ve hatalı sonuçlar.

Table 3. True and false results in filtration method on the basis of cultured bacteria.

Bakteri	Klinik Mastitis (n=66)			Subklinik Mastitis (n=52)		
	izolasyon	filtrasyon		izolasyon	filtrasyon	
		doğru	hatalı		doğru	hatalı
<i>Staphylococcus</i>	31	31	0	22	18	4
<i>Streptococcus</i>	15	13	2	8	6	2
<i>C.bovis</i>	3	2	1	2	1	1
<i>E.coli</i>	5	5	0	0	-	0
<i>Pseudomonas</i>	2	2	0	0	-	0
<i>Klebsiella</i>	1	1	0	2	2	0

Tablo 4. Filtrasyon yönteminin kültür yöntemine karşı sensitivite, spesifite ve prediktif değerleri (PD- pozitif sonuç, negatif sonuç).

Table 4. Sensitivity, specificity and predicitive values (PD- positive and negative results) of filtration method against bacterial culture.

Belirti	İstatistik Değer	Bakteri Varlığı	Gram (+) Ayrımı	Gram (-) Ayrımı
Klinik Mastitis	sensitivite	%96	%98	%100
	spesifite	%100	%100	%98
	PD(pozitif sonuç)	%100	%100	%89
	PD(negatif sonuç)	%82	%89	%100
Subklinik Mastitis	sensitivite	%85	%93	%100
	spesifite	%100	%100	%93
	PD(pozitif sonuç)	%100	%100	%50
	PD(negatif sonuç)	%78	%50	%100

### Tartışma ve Sonuç

Sığır mastitisi, ekonomik açıdan en önemli hayvan hastalıklarının başında gelmektedir. Tüm dünyada mastitislere ileri gelen ekonomik kaybın yıllık 35 milyar dolara ulaştığı hesaplanmıştır (24). Bu hesaplamanın temel olan bilgilere göre, dünyanın çeşitli bölgelerinde mastitisin sığır başına yıllık maliyeti 59 euro ile 200 dolar arasında değişmektedir (11,18). Sığır mastitisine neden olan etiyolojik ajan spektrumu çok geniştir. *S.aureus*, *S.agalactiae*, *S.dysgalactiae* gibi primer patojenler yanında, *C.bovis*, *A.pyogenes*, *E.coli*, *Enterococcus* spp., koagülaz negatif stafilkokoklar ve enterobakteriler özel koşullarda veya özel tipte mastitislere neden olmaktadır (1,4,7). Ayrıca, hayvanlarda komensal veya çevresel olarak bulunan mikroorganizmaların hemen tümü mastitis vakalarından izole edilmiştir (2,14,19,22). Tüm koruma önlemlerine rağmen ortaya çıkan mastitis vakalarında başvurulan başlıca seçenek antimikrobiyal sağaltımdır. Ancak, çok çeşitli ve farklı bakterilerin neden olabileceği mastitislerin sağaltımı için ortak bir antimikrobiyal uygulama söz konusu olamamaktadır (5). Bu nedenle, mastitise neden olan etiyolojik ajanların saha koşullarında çabuk teşhisi önem kazanmaktadır. Sütteki bakterilerin hızlı tanısı amacıyla çeşitli teknikler geliştirilmiş olmasına karşın, özel cihazlara gereksinim duyulması, maliyetinin yüksek olması, tek bir bakteri grubunu saptayabilmesi veya majör grupları ayıramaması, mastitisli sütlerde ve saha koşullarında uygulanamaması gibi dezavantajları taşımaktadırlar (3,8,9,13,15,17,20). Bu çalışmada, saha koşullarında çok kısa sürede uygulanabilen ve antimikrobiyal sağaltıma temel oluşturabilecek bilgileri sağlayan filtrasyon-boyama tekniğinin (25), laboratuvar ve saha koşullarındaki performansı incelenmiştir.

Bu çalışmada kullanılan filtrasyon yönteminin mekanizması bakterilerin özel filtrelerde tutulması, Gram pozitif ve negatif bakterilerin filtre üzerinde boyanması esasına dayanmaktadır (25). A ayırıcındaki Triton X-100, EDTA, NaCl, bazik pH ve ısıtma işlemi sütün eriyebilirliğini arttırmakta ve sıvı faz ile bakterilerin filtreden geçişini kolaylaştırmaktadır. Çünkü mastitisli süt çok sayıda hücre, fibrin kitleleri ve filtreden geçişte sorun yaratan bir çok madde içermektedir. Ön filtrasyon işleminde kullanılan hidrofobik özellikteki polipropilen filtre, hücre gibi katı faz maddelerini tutarken bakterilerin geçişini sağlamaktadır. Küçük por çaplı ikinci filtrasyon ile polisulfon filtre üzerinde tutulan bakterilerin boyanmasında kullanılan toludin mavisi, asidik ortamda negatif yüzey yüküne sahip olan Gram pozitif ve negatif bakterileri boyayabilmektedir (12). Ayrıca, toludin mavisi ile polisulfon filtrenin uyumu, dekoloryasyon iş-

leminden sonra reaksiyonun kolayca ayırt edilmesini sağlamaktadır. Süt örneklerinde filtrasyon ile bakteri saptanmasına yönelik diğer teknikler de geliştirilmesine karşın, bunlarda akridin boyası ve epiflorasan mikroskop kullanılması uygulanabilirliğini güçleştirmektedir (6,15).

Çalışmada deneysel olarak inokule edilen normal süt örneklerinde, filtrasyon yöntemi ile Gram pozitif bakterilerin  $8.96 \times 10^5$ - $3.80 \times 10^6$ /ml, Gram negatif bakterilerin  $6.56 \times 10^5$ - $8.40 \times 10^5$ /ml miktarları saptanabildi. Klinik mastitisli sütlerde, genellikle  $10^5$ - $10^6$  bakteri/ml bulunduğu göz önüne alınırsa, yöntemin bu sütlerin çoğunda sonuç vereceğini söylemek mümkündür (10). Bu örneklerle uygulanan filtrasyon işlemi sonunda, bakterilerin tümü türe spesifik Gram reaksiyonu verdi; bu da işlemin boyanma ile ilgili kısmında bir sorun olmadığını gösterdi. Bu çalışmada filtrasyon yönteminin minimal tanı limiti *S.aureus* ve *E.coli* için sırasıyla  $8.96 \times 10^5$  ve  $7.16 \times 10^5$  olarak bulunurken, Yazdankhah ve ark.(25)  $5 \times 10^6$  ve  $1 \times 10^6$  olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada sütte daha az sayıdaki bakterinin saptanabilmesi, ikinci filtrasyon aşamasında daha küçük porlu filtre kullanılmasına ve dolayısıyla filtrede daha çok bakteri tutulmasına bağlanabilir. Filtrasyon işleminde kullanılan A ayırıcı bakterileri öldürdüğü için, boyama öncesi aşamada bakteri sayısının tesbiti ve orijinal inokulum ile karşılaştırılması mümkün olmadı.

Deneysel koşullarda normal sütteki tanı limiti belirlenen filtrasyon yöntemi ile klinik ve subklinik mastitisli süt örnekleri incelendi. Filtrasyon yönteminin değerlendirilmesinde, bakteri kültürü referans veri olarak kabul edildi. Filtrasyon yöntemi, klinik mastitisli 66 süt örneğinin 63'ünde (%95.5) bakteri varlığını ve Gram tiplerini doğru olarak ayırdı. Yazdankhah ve ark (25), aynı yöntemle bu oranı %95 olarak belirlemişlerdir. Jonsson ve ark. (9) ise Limulus test ile mastitisli sütlerdeki Gram negatiflerin %100 doğrulukla saptanabildiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada, *Streptococcus* ve *C.bovis* izole edilen birer örnekte filtrasyon yöntemi ile bakteri varlığının saptanamaması, sütteki bakteri sayısının tanı limitlerinin altında olmasına bağlandı. Yazdankhah ve ark (25), benzer durumun çok yoğun hücre ve debris içeren sütlerde gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, kültür negatif süt örneğinde, kanlı içerikten dolayı hatalı pozitiflik belirlerken, bu çalışmada hatalı pozitiflik saptanmadı.

Filtrasyon yöntemi, subklinik mastitisli 52 süt örneğinin 45'inde (%86.5) bakteri varlığını ve Gram tiplerini doğru olarak ayırdı. Beş süt örneğinde bakteri izolasyonu yapılırken, filtrasyon yöntemi ile hatalı negatiflik bulundu. Subklinik mastitislerde klinik mastitislere göre

daha yüksek hatalı negatiflik oranının bulunması, bu iki hastalık formuna neden olabilen bakteri sayılarının farklılığından kaynaklanmış olabilir (10). Subklinik mastitilerin aynı yöntemle incelendiği başka bir çalışma olmadı için, bulguları karşılaştırmak mümkün olmadı.

Klinik ve subklinik mastitisli sütlere uygulanan filtrasyon yönteminde, Gram pozitif bakterilerin negatif boyanmasından kaynaklanan 3 hatalı sonuç bulundu. Bu bakterilerin besiyerinde üretildikten sonra Gram yöntemi ile boyanmaları sonucunda, normale göre daha çok de-kolorize oldukları gözlemlendi. Kültür boyamada da değişken Gram reaksiyonun saptanması, hatanın yöntemden değil bu bakterilerin özelliğinden kaynaklandığını gösterdi. Yazdankhah ve ark (25), filtrasyon yönteminde *Streptococcus* spp. ile ilgili hatalı boyanmanın gözlemlenebileceğini bildirmişler ve inceledikleri streptokok kültürlerinin %15'inde değişken Gram reaksiyonu saptamışlardır. Filtrasyon yöntemi ile, Gram negatif bakteri izole edilen sütlerin ve normal kontrol sütlerinin hiçbirinde hatalı boyanma belirlenmedi, bu da testin yüksek spesifiteli bulunmasını sağladı.

Sonuç olarak, bu çalışmada kullanılan filtrasyon yönteminin, özellikle klinik mastitisli sütlerdeki bakteri varlığını (%96 sensitivite, %100 spesifite) ve Gram tipini (%98-100 spesifite ve sensitivite) yüksek doğruluk oranı ile gösterebildiği belirlendi. Gram pozitif ve negatif infeksiyonlarda uygulanan antimikrobiyal rejim farklı olduğundan, filtrasyon yöntemi ile bu ayrımın kısa sürede yapılabilmesi önem taşımaktadır. Çeşitli araştırmalarda klinik mastitis vakalarının %20-35'inde bakteriyel etiolojiye rastlanmadığı göz önüne alındığında (1,23), Gram tipini ayırması yanında bakteri varlığını göstermesi, yöntemin önemli bir avantajı olarak kabul edildi. Böylece, filtrasyon yöntemi ile antimikrobiyal kullanma gereksinimi olup olmadığını kısa sürede anlamak, antibiyotik seçiminde önemli hata yapmamak ve gereksiz antibiyotik kullanımını önlemek mümkün olacaktır. Filtrasyon yönteminin en önemli ve diğer yöntemlerde bulunmayan avantajı, önceden hazırlanmış ayraçlar kullanılarak saha koşullarında uygulanabilmesi ve 7 dakika gibi çok kısa sürede sonuç vermesidir. Ayrıca, yöntemin subklinik mastitisli sütlere de uygulanabileceği, ancak hatalı sonuç oranının göz önünde bulundurulması gerektiği kanısına varıldı.

### Kaynaklar

1. Barkema HW, Schukken YH, Lam TJGM, Beiboer ML, Wilmink H, Benedictus G, Brand A (1998): *Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell count*. J Dairy Sci, **81**, 411-419.
2. Benites NR, Guerra JL, Melville PA, Costa EO (2002): *Aetiology and histopathology of bovine mastitis of spontaneous occurrence*. J Vet Med B, **49**, 366-370.
3. Biggadike HJ, Ohnstad I, Laven RA, Hillerton JE (2002): *Evaluation of measurements of the conductivity of quarter milk samples for the early diagnosis of mastitis*. Vet Rec, **25**, 655-658.
4. Brand A (1998): *Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell count*. J Dairy Sci, **81**, 411-419.
5. Erskine RJ, Walker RD, Bolin CA, Bartlett PC, White DG (2002): *Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period*. J Dairy Sci, **85**, 1111-1118.
6. Fernandez-Astorga A, Hijarrubia MJ, Lazaro B, Barcina I (1996): *Effect of the pre-treatments for milk samples filtration on direct viable cell counts*. J Appl Bacteriol, **80**: 511-516.
7. Fox LK, Gay JM (1993): *Contagious mastitis*. Vet Clin North Am Food Anim Pract, **9**, 475-487.
8. Gunasekera TS, Attfield PV, Veal DA (2000): *A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk*. Appl Environ Microbiol, **66**, 1228-1232.
9. Jonsson P, Bjorklund L, Olofson AS, Eriksson O (1985): *Limulus test-a rapid and simple method for the detection of endotoxins produced by gram-negative bacteria in mastitis milk*. Nord Vet Med, **37**, 298-305.
10. Katholm J, Andersen PH (1992) *Acute coliforms mastitis in dairy cows: endotoxin and biochemical changes in plasma and colony-forming units in milk*. Vet Rec, **131**, 513-514.
11. Miller GY, Bartlett PC, Lance SE, Anderson J, Heider LE (1993): *Costs of clinical mastitis and mastitis prevention in dairy herds*. JAVMA, **202**, 1230-1236.
12. Noda Y, Toei K (1992): *A new bacterial staining method involving Gram stain with theoretical consideration of the staining mechanism*. Microbios, **70**, 49-55.
13. Noordhuizen JP, Stassen EN, Klerx I (1993): *Pilot study of the Deosan-RMTK (rapid mastitis test kit), a diagnostic test for the detection of cows with high cell count*. Tijdschr Diergeneesk, **118**, 329-331.
14. Oliver SP (1998): *Frequency of isolation of environmental mastitis causing pathogens and incidence of new intramammary infection during the nonlactating period*. Am J Vet Res, **49**, 1789-1793.
15. Pettipher G, Mansell R, McKinnon CH, Cousins CM (1980): *Rapid membrane filtration-epifluorescent microscopy technique for direct enumeration of bacteria in raw milk*. Appl Environ Microbiol, **39**, 423-429.
16. Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR (1994): *Clinical Veterinary Microbiology*. Mosby Int, Edinburgh.
17. Riffon R, Sayasith K, Khalil H, Dubreuil P, Drolet M, Lagace J (2001): *Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR*. J Clin Microbiol, **39**, 2584-2589.
18. Schakenraad AHW, Dijkhuizen AA (1990): *Economic losses due to bovine mastitis in Dutch dairy herds*. Neth J Agri Sci, **38**, 89-92.

19. **Smith KL, Hogan JS** (1993): *Environmental mastitis*. Vet Clin North Am Food Anim Pract, **9**, 489-498.
20. **Smith GW, Constable PD, Morin DE** (2001): *Ability of hematologic and serum biochemical variables to differentiate gram-negative and gram-positive mastitis in dairy cows*. J Vet Intern Med, **15**, 394-400.
21. **Thrusfield M** (1995): *Veterinary Epidemiology*, 2nd ed. Blackwell Science Ltd, Oxford.
22. **Watts JL** (1988): *Etiological agents of bovine mastitis*. Vet Microbiol, **16**, 41-66.
23. **Wellenberg GJ, van der Poel WHM, Van Oirschot JT** (2002): *Viral infections and bovine mastitis: a review*. Vet Microbiol, **88**, 27-45.
24. **Wells SJ, Ott SL, Hillberg-Seitzinger A** (1998): *Key health issues for dairy cattle—new and old*. J Dairy Sci, **81**, 3029-3035.
25. **Yazdankhah SP, Sorum H, Larsen HJ, Gogstad G** (2001): *Rapid method for detection of gram-positive and -negative bacteria in milk from cows with moderate or severe clinical mastitis*. J Clin Microbiol, **39**, 3228-3233.

Geliş tarihi: 21.01.2003 / Kabul tarihi: 24.02.2003

**Yazışma adresi:**

Dr.Serap Savaşan

Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, AYDIN

e posta: ssavasan@adu.edu.tr