

SUBKLİNİK MASTİTİSLERİN TEŞHİSİNDE FARKLI ANALİZ METODLARININ KULLANIM OLANAKLARI

E. Fatih ÜNAL*

Yavuz NAK**

Deniz NAK**

Figen TAVUKÇUOĞLU***

ÖZET

Bu çalışmada, ineklerde subklinik mastitiserin teşhisinde direkt ve indirekt somatik hücre sayısı, mikrobiyolojik muayene ve süt serumu LDH değerlerinden faydalanılma olanakları araştırıldı. CMT ve mikrobiyolojik muayene sonuçları pozitif ve negatif çıkan süt örnekleri, Direkt Mikroskopik Somatik Hücre Sayımı (DMSHS) bulguları ve süt serumu LDH değerleri açısından karşılaştırıldı. Bu iki grup arasında istatistikî açıdan önemli farklılıklar belirlendi.

Yirmiiki süt örneğinde bakteri üremesi görüldü. 20 örnekte Staph. aureus, birer örnekte ise Coryn. pyogenes ve E. coli izole ve identifiye edildi.

SUMMARY

Using Possibilities of Different Analysis Methods in Diagnosis of Subclinical Mastitis

In this study, it was investigated the availability possibilities of direct and indirect somatic cell counts, microbiological analysis and milk serum LDH values for the diagnosis of subclinical mastitis cows. Direct Microscopic Somatic Cell Count (DMSCC) results and milk serum LDH values were compared in CMT and microbiological analysis results positive or negative milk samples, respectively. Statistically significant differences were found between two groups.

Microbic growth were seen in 22 milk samples. Staph. aureus, Coryn. pyogenes and E. coli were isolated and identified in 20, one, one samples, respectively.

Key words: Cows, Subclinical Mastitis, Diagnosis.

* Doç. Dr.; U.Ü. Vet. Fak. Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Bursa-Türkiye.

** Dr.; U.Ü. Vet. Fak. Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Bursa-Türkiye.

*** Dr.; İl Kontrol Laboratuvarı Müdürlüğü, Bursa-Türkiye.

GİRİŞ

Mastitis, sütçü işletmelerde önemli ekonomik kayıplara neden olan bir olgudur. Mastitisin klinik formu, meme bezi ve sütte belirgin bozukluklara neden olmaktadır. Subklinik mastitisler ise meme dokusunu, sütün bileşimini ve miktarını etkilemekle birlikte, şekillenen değişiklikler gözle ve klinik muayenelerle izlenememektedir. Subklinik mastitisler inekler arasında farkına varılmadan kolaylıkla yayılabilmektedir. Bu nedenle bir sürüde her klinik mastitis olgusuna karşılık, 40-50 subklinik mastitis görülmekte ve meme bölümlerinde % 3-26 oranında süt kaybına neden olmaktadır¹.

Subklinik mastitisler; sütte Somatik Hücre Sayısı (SHS)'nin artması, plazma proteinlerinin süte geçmesi, sütün iyon kompozisyonunun değişmesi, lokal hücrelerin yıkımı sonucu intrasellüler bileşiklerin süte geçmesi, meme bezi epitelinin sentez kapasitesinin azalması şeklindeki değişikliklere neden olmaktadır^{2,3}.

Somatik hücre sayısı, subklinik mastitisin tanısı ve yayılımının belirlenmesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır⁴. Somatik hücre sayısının indirekt olarak tayin edildiği Kalifornia Mastitis Test (CMT)'i, her türlü saha şartlarında kullanılabilir ve çok sayıda örneğe kolayca uygulanabilir gibi özelliklere sahiptir^{1,5}. Direkt hücre sayımında; hücrelerin, boyanmış süt preparatlarında mikroskop altında ya da counter counter, fossomatik gibi elektronik aletlerle sayılması şeklinde bir yol izlenmektedir^{1,4,5,6}. International Dairy Federation (IDF) 1 ml'sinde 500.000'den az hücre bulunan sütleri normal, bu sınırdan daha fazla hücre içerenleri ise mastitisi olarak kabul etmektedir⁴.

Gerek direkt ve gerekse de indirekt yöntemlerle somatik hücre sayısının belirlenmesi sırasında; laktasyonun başında ve sonunda bulunan hayvanlarda, genel sistemik enfeksiyonlarda, başarılı bir meme sağıtımının üzerinden 5 hafta geçmemiş olgularda, aşırı sıcak, soğuk, yaşlılık, beslenme ve bakım bozuklukları gibi nedenlere bağlı olarak somatik hücre sayısının yükselebileceği gözönünde bulundurulmalıdır^{1,7,8,9}.

Subklinik mastitislerin etiolojisinin belirlenmesi, sütteki hastalık etkenlerinin mikrobiyolojik yöntemlerle izolasyon ve identifikasyonu ile mümkün olmaktadır¹⁰.

Son yıllarda subklinik mastitislerin teşhisinde, sütün enzim aktivitelerinde meydana gelen değişikliklerin belirlenme ilkesine dayanan metodlardan yaygın bir şekilde yararlanılmaktadır^{11,12}. Tanı amacına yönelik olarak Laktat dehidrojenaz (LDH) enzimindeki değişimlerden başarılı bir şekilde faydalanılmaktadır¹¹⁻¹⁹.

Bu çalışmada, sütte ve memede gözle görülebilir hiçbir bulgu belirlenemeyen ineklerden alınan, buna karşılık bir kısmında CMT pozitif ve bir kısmında ise negatif çıkan süt örneklerini DMSHS ile mikrobiyolojik muayene bulguları ve süt serumu LDH değerleri açısından karşılaştırmayı ve subklinik mastitislerin teşhisinde bu metodların öneminin ortaya konulması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOD

Çalışma materyalini, U.Ü. Veteriner Fakültesi Uygulama ve Araştırma Çiftliği ile Bursa yöresindeki 5 ticari sütçü işletmede bulunan inekler teşkil etti. Tüm ineklere

CMT uygulandı. Testin değerlendirilmesi sırasında, indirekt hücre sayımında yanlışya neden olabilecek durumlar^{1.7.8.9} elemine edildi. Klinik muayeneler sonucu, sütte ve memede hiçbir bulgu belirlenemeyen ve CMT uygulaması negatif çıkan 20 inek ve yine hiçbir klinik bulgu göstermeyen fakat CMT; ?, +1, +2, +3 sonuçlarını veren 25 inek çalışmaya alındı. İnekler, Holstein ve İsviçre Esmeri ırklarına ait ve yaşları 3-5 arasında değişmekteydi.

Sütteki somatik hücre sayısının tespiti, Aydın'ın belirttiği şekilde²⁰, nötral red ile boyama yapılarak belirlendi. Aseptik şartlarda toplanan süt örneklerinde rutin mikrobiyolojik muayeneler uygulanarak, aerobik, aneorobik, mikroaerofilik mikroorganizmalar mantar ve mayalar yönünden izolasyon ve identifikasyon işlemleri yapıldı^{10.20}.

Süt serumunda LDH enziminin belirlenmesi, Andersson¹⁴ ile Hambitzer ve Sommer¹⁷'in belirttiği metoda göre ayrılan süt serumunda, Biotrol LDH S.F.B.C.T. 03007 F 9986 enzim kiti kullanılarak, Technicon RA-1000TM Autoanalyzer cihazıyla gerçekleştirildi.

Sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde Kan²¹'in belirttiği şekilde, student-t testi kullanıldı.

BULGULAR

Hiçbir bulgu göstermeyen fakat CMT (-) ve CMT ?, +1, +2, +3 çıkan meme bölümlerinden alınan süt örneklerindeki somatik hücre sayımı sonuçları Tablo I'de gösterilmiştir.

Tablo: I

CMT (-) ve CMT (?, pozitif) Çıkan Süt Örneklerinde Somatik Hücre Sayıları

Testin Adı	Hayvan sayısı	CMT (-) x ± SH	Hayvan sayısı	CMT (?, pozitif) x ± SH
SHS (Hüc/ml süt)	20	144.000 ± 20.291	25	1.184.000 ± 83.336

SH: Standart Hata

Tablo I'de görüldüğü gibi CMT (-) veya CMT (?, +1, +2, +3) çıkan iki grup arasında, somatik hücre sayım değerleri yönünden yapılan karşılaştırmada, istatistiki açıdan önemli fark (P < 0.01) belirlenmiştir.

Tablo II'de CMT ve SHS değerlerine göre normal ve subklinik mastitisli kabul edilen süt örneklerinden izole ve identifiye edilen mikroorganizmalar gösterilmiştir.

Tablo: II

**Normal ve Subklinik Mastitisli Süt Örneklerinden Elde Edilen
Mikroorganizmalar**

Mikroorganizma Türü	Normal SHS < 500.000 hüc/ml	Subklinik mastitisli SHS > 500.000 hüc/ml
Staph. aureus	1	20
Coryn. pyogenes	0	1
E. coli	0	1
Maya	0	1
Üreme görülmeyen	19	2

Tablo III'de normal ve subklinik mastitisli süt örneklerinden elde edilen süt serumlarında, süt serumu LDH değerleri verilmiştir.

Tablo: III

**Normal ve Subklinik Mastitisli Sütlerden Elde Edilen Süt Serumlarında
LDH Değerleri**

Enzim	Hayvan sayısı	Normal	Hayvan sayısı	CMT (? , pozitif) x ± SH
LDH (U/L)	20	43.4 ± 11.064	25	461.16 ± 108.756

Normal ve subklinik mastitisli sütlerdeki LDH değerleri arasında, istatistiki açıdan önemli fark belirlenmiştir (Tablo III).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Kalifornia Mastitis Test sonuçları negatif çıkan meme bölümlerinden alınan süt örneklerinde, direkt mikroskopik somatik hücre sayımı sonucu, ortalama SHS değeri 144.000 ± 20.291 hüc/ml süt olarak belirlenmiştir. Bu değer IDF tarafından mastitisin teşhisinde sınır kabul edilen 500.000 hüc/ml sınır değerinden düşüktür. CMT sonuçları; ?, +1, +2, +3 olarak belirlenen meme bölümlerinden alınan süt örneklerinde ise ortalama SHS değeri, 1.184.000 ± 83.336 hüc/ml olarak bulunmuştur. Bu değer IDF'nin belirttiği sınır değerinin oldukça üstündedir. CMT sonuçları negatif veya şüpheli ve CMT sonuçları pozitif çıkan süt örnekleri SHS değerleri açısından karşılaştırıldığında, istatistiki açıdan önemli farklılık (P < 0.01) gözlemlenmiştir. Elde edilen bu sonuçların, yapılmış olan araştırmaların^{1,7,22} sonuçları ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Somatik hücre sayısı sonuçları ile CMT sonuçlarının da uyum içinde olduğu ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada görüldüğü gibi subklinik mastitis tablosu oluşmadan bazı fizyolojik ve patolojik durumlarda^{1,7,28}, CMT'nin pozitif çıkabileceği gözönünde bulundurulduğunda ve bu olgular elemine edildiğinde,

literatürlerle de uyumlu olarak²²⁻²⁴ CMT'nin pratik ve oldukça güvenilir olduğu gözlenmiştir.

CMT sonucu pozitif ve SHS değeri yüksek çıkan 25 süt örneğinde yapılan mikrobiyolojik muayeneler sonucu, 23 örnekte üreme olduğu belirlenmiştir. Üreme olan 23 örneğin; 20 tanesinde Staph. aureus, geriye kalan 3 örnekte ise sırayla; Coryn. pyogenes, E. coli ve maya izole edilmiştir. Mastitisli sütlerden yapılan izolasyon ve identifikasyonlar sonucu, mastitise yol açan etkenlerin büyük bir çoğunluğunu staphylococların oluşturduğu bildirilmekte^{1.9.22.25.26.27} ve bu bulguların çalışmamızda elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu görülmektedir. CMT sonucu pozitif olan ve SHS değeri sınır değerden yüksek çıkan 2 süt örneğinde yapılan izolasyon ve identifikasyon çalışmaları sonucu üreme gözlenmemiştir. Kılıçoğlu⁸, mastitis patojenlerine karşı sütteki sayısı artan lökositlerin fagositik ve bakteriosidal etkileriyle bakteriyel üremeyi durdurabildiklerini ve sütte çok sayıda lökosit belirlenmesine rağmen rutin bakteriyolojik ve kimyasal testlerin sonuçlarının normal çıkabildiğini belirtmektedir. Çalışmamızda CMT sonucu pozitif ve SHS değeri yüksek çıkan iki örnekte üreme oluşmaması yukarıda sözü edilen lökositlerle ilgili mekanizmadan kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir. CMT sonucu negatif ve SHS değeri sınır değerinin altında çıkan 20 örneğin 19 tanesinde yapılan mikrobiyolojik muayeneler sonucu üreme gözlenmemiş, 1 örnekte ise Staph. aureus ürediği tespit edilmiştir. Staphylococ'ların doğada çok yaygın olarak buldukları, insan ve hayvanların deri müköz membranlarının doğal florasını oluşturdukları bildirilmektedir²⁸. CMT ve SHS değeri negatif çıkan bir örnekte üreme görülmesi yukarıda belirtilen sebepten kaynaklanmış olabilir.

Son yıllarda mastitisin teşhisinde LDH enzim aktivitesinden geniş ölçüde faydalanılmaktadır^{12.13.14.15.16.17.18.19.29}. Yapılan çalışmalarda^{13.14.17}, mikrobiyolojik analizler sonucu sağlıklı ve mastitisli olarak ayrılan sütlerin süt serumlarındaki LDH enzim değerleri araştırılmış ve sağlıklı sütlerle karşılaştırıldığında, mastitisli sütlerde LDH değerlerinin önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. Begin ve arkadaşları¹⁸, deneysel olarak mastitis oluşturmuşlar ve mastitisli sütlerdeki LDH düzeylerinin, sağlıklı sütlere göre 18 kat daha fazla olduğunu saptamışlardır. Sunulan bu çalışmada, CMT, DMSHS ve mikrobiyolojik muayene sonuçlarına göre sağlıklı ve subklinik mastitisli olarak ayrılan sütlerden elde edilen süt serumu LDH değerleri karşılaştırıldığında, iki grup arasında istatistiki açıdan önemli farklılık belirlenmiştir (P < 0.01).

Sonuç olarak, subklinik mastitisin teşhisinde, direkt ve indirekt somatik hücre sayımı ve mikrobiyolojik muayenenin yanısıra süt serumu LDH değerlerinden de faydalanılabileceği belirlenmiştir. Alaçam²²'inde belirttiği gibi, sunulan bu çalışmada mikrobiyolojik muayenenin tanının yanında, tedaviyi yönlendirebilecek sonuçlar verebildiği gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. ALAÇAM, E.: Meme Hastalıkları, alınmıştır, "Sığır Hastalıkları", 459-482, Teknografik Matbaası, İstanbul (1989).
2. SANDHOLM, M., MATTILA, T.: Biochemical aspects of bovine mastitis, Isr. J. Vet. Med., 42(4), 405-415 (1986).

3. MATTILA, T.: Diagnostic problems in bovine mastitis. Thesis, Helsinki (1985).
4. International Dairy Federation, Somatic cells in milk, Their significance and recommended methods for counting. Document No. 114, Belgium (1979).
5. SCHALM, O.W., CARROL, E.J., JAIN, N.C.O.: Bovine Mastitis. Lea Febiger, Philadelphia, USA (1971).
6. UYSAL, Y.: Sütte Somatik Hücre Sayımı, Önemi ve Değerlendirilmesi, Pendik Mikrobiyoloji Enstitüsü Dergisi, 17, 40-46 (1985).
7. BROLUND, L.: Cell Counts in Bovine Milk, Acta Veterinaria Scandinavica, Supplementum 80, 1-123 (1985).
8. KILIÇOĞLU, Ç.: Mastitiste klinik tanı, I. Mastitis Semineri, 69-75, Ankara (1984).
9. KILIÇOĞLU, Ç., ALAÇAM, E.: Veteriner Doğum Bilgisi ve Üreme Organlarının Hastalıkları, 295-355, Basımevi, Ankara (1985).
10. AYDIN, N., AKAY, Ö.: Mastitisin Mikrobiyolojik Tanı Yöntemleri, I. Mastitis Semineri, 76-84, Ankara (1984).
11. SHAHANI, K.M., HARPER, W.J., JENSEN, R.G., PARRY, J.R.R.M., ZITTLE, C.A.: Enzymes in Bovine Milk: A Review, J. Dairy Sci., 56(5), 531-543 (1972).
12. KITCHEN, B.J.: Review of the progress of Dairy Science: Bovine Mastitis: Milk compositional changes and related diagnostic tests. J. Dairy Res., 48, 167-188 (1981).
13. SOMMER, H., HAMBITZER, R., AYDIN, I.: LDH-Activity and correlation to pathogenic and non-pathogenic microorganisms in dairy milk. Israel J. Vet. Med., 42(4), 373-375 (1986).
14. ANDERSSON, R.: Die diagnose der bovinen subklinischen mastitis mittels laktatdehydrogenase-aktivitat und leitfahigkeit, Thesis, Bonn (1991).
15. KATO, K., MORI, K., KATOH, N.: Contribution of leucocytes to the origin of lactate dehydrogenase isozymes in milk of bovine mastitis. Jpn. J. Vet. Sci., 51(3), 530-539 (1989).
16. KATO, K., MORI, K., KATOH, N.: Different protein patterns in normal and mastitic milks as revealed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Jpn. J. Vet. Sci., 51(6), 1275-1278 (1989).
17. HAMBITZER, R., SOMMER, H.: Determination of lactate dehydrogenase in bovine milk. J. Vet. Med. A, 34, 721-727 (1987).
18. BOGIN, E., ZIV, G.: Enzymes and minerals in normal and mastitic milk, Cornell Vet., 63, 666-676 (1973).
19. MERT, N., TAYYAR, M., OĞAN, M., MÜFTÜOĞLU, A., YAVUZ, M.: Süt ineklerinde sublinik mastitisin sütte meydana getirdiği biyokimyasal değişimler üzerine araştırmalar. U.Ü. Vet. Fak. Der., 11(2), 13-18 (1992).
20. AYDIN, N.: T.C. Tarım Orman ve Köyleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Mastitis Projesi, Ankara (1989).
21. KAN, İ.: Biyoistatistik, 120-131, U.Ü. Basımevi, Bursa (1991).

22. ALAÇAM, E., NİZAMLIOĞLU, M., ERGANİŞ, O.: İneklerde subklinik mastitislerin tanısı amacıyla süt ve kanda PGF 2 alfa ile bazı mikrobiyolojik, hücresel ve biyokimyasal değerlerin araştırılması. *Doğa Tu Vet. ve Hay. D.*, 12(1), 11-18 (1988).
23. PATGIRI, G.P., HANDIQUE, S.C., SAIKAI, G.K., ROYCHOUDHURY, R.K.: Comparative efficacy of some indirect tests for the diagnosis of subclinical mastitis in cows. *Vet. Bulle.*, 58(9), 5235 (1988).
24. PAL, B., VERMA, B.B., PRASAD, R.S.: A note on diagnosis of subclinical bovine mastitis and invitro drug sensitivity test of bacterial isolates. *Indian Vet. J.*, 66, 785-787 (1989).
25. ALAÇAM, E., TEKELİ, T., ERGANİŞ, O., İZGİ, A.N.: İnek ve mandalarda subklinik mastitislerin tanısı, etkenlerin izolasyonu ve bunlara karşı etkili antibiyotiklerin belirlenmesi. *S.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 5(1), 91-101 (1989).
26. GONZALEZ, R.N., JASPER, D.E., FARVER, T.B., BUSHNELL, R.B., FRANTI, C.E.: Prevalance of udder infections and mastitis in 50 California dairy herds, *JAVMA*, 193(3), 323-328 (1988).
27. AHMAD, R., JAVAID, S., LATEEF, M.: Studies on prevalance, aetiology and subclinical mastitis in dairy animals. *Pakistan Vet. J.*, 11(3), 138-140 (1991).
28. AKAY, O., AYDIN, N.: Stafilokokal mastitisler, I. Mastitis Semineri, 136-146, Ankara (1984).
29. ERGUN, H., MERT, N.: Sütte mastitis nedeniyle meydana gelen biyokimyasal değişimler. I. Mastitis Semineri, 49-61, Ankara (1984).