

Mastitislerden izole edilen enterokokların moleküler tiplendirilmesi

Seyda CENGİZ, Oya TEKİN, Mehmet AKAN

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 06110, Ankara.

Özet: İnek mastitislerinde enterokok etkenlerinin varlığını belirlemek ve izole edilen suşları moleküler tekniklerle tiplendirmek amacıyla yapılan bu çalışmada, Ankara ve Balıkesir illerindeki süt işletmelerinden sağlanan sütlerden izole edilen 75 adet enterokok suşu incelendi. Moleküler tiplendirme Restriksiyon Enzimi Uzunluk Polimorfizmleri- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RFLP-PCR) ile yapıldı. Bu yöntemle 61 adet etken *Enterococcus faecium* ve 14 adet etken ise *Enterococcus avium* olarak tanımlandı. İzolatların genotiplendirilmesi amacıyla yapılan Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA- Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonuçlarına göre *Enterococcus faecium* suşlarında 10 adet, *Enterococcus avium* suşlarında ise 7 adet farklı profil görüldü. Bu bulgular enterokok etkenlerinin inek mastitislerindeki önemini ve rolünü göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Enterokok, mastitis, moleküler tiplendirme

Molecular typing of *Enterococcus* spp. isolated from cow mastitis

Summary: The objectives of this study were to determine the presence of *Enterococcus* spp. in cow mastitis and to characterize the isolated strains using molecular techniques. A total of 75 *Enterococcus* spp. isolated from dairy farms in Ankara and Balıkesir cities were examined. Sixty-one *Enterococcus faecium* and 14 *Enterococcus avium* strains were identified according to Restriction Fragment Length Polymorphism-Polymerase Chain Reaction results. Additionally different 10 and 7 Random Amplified Polymorphic DNA- Polymerase Chain Reaction profiles were detected in *E. faecium* and *E. avium* strains, respectively. These findings showed the importance and the role of *Enterococcus* spp. in cow mastitis.

Key words: *Enterococcus*, mastitis, molecular typing.

Giriş

Mastitis, pek çok nedene bağlı ortaya çıkan meme bezi enfeksiyonudur. Hastalığın etiolojisinde bakteriyel etkenler ilk sırayı oluşturur. Mastitise neden olan bakteriyel patojenler kaynağına göre çevresel ve bulaşıcı olarak iki grupta incelenir. Bulaşıcı patojenleri *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* ve *Streptococcus dysgalactiae*; çevresel etkenleri *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* ve enterokoklar oluşturur. Enterokoklar, *Streptococcocea* ailesi içerisinde yer alan Gram pozitif kok şeklinde görülen, katalaz negatif özellik gösteren, yüksek tuz ve pH düzeylerinde üreyebilen etkenlerdir (1, 7, 8). Enterokoklar geniş bir konakçı dağılımına sahiptirler. Hayvanların sindirim sisteminde yerleşik doğal flora bakterisi olan bu etkenler, özellikle sağım hijyenine dikkat edilmediği ve altlık temizliğinin düzenli yapılmadığı durumlarda memeleri kolaylıkla enfekte ederek mastitise neden olmaktadır. Meme başından giren enterokoklar meme kanalı boyunca yerleşip kolonize olurlar ve meme bezinde enfeksiyona ilişkin klinik bulgular meydana getirirler (13, 19).

Enterokok etkenleri tek başlarına mastitis oluşturabilmelerine rağmen mastitis olgularından genellikle streptokokal etkenlerle birlikte izole edilmektedirler. Bu

nedenle enterokok nedenli mastitisler sıklıkla streptokok mastitisleri ile karıştırılmaktadır (21). Enterokokların somatik hücre sayısı yüksek sütlerden ve kuru dönem periyodunda daha sık izole edildiği ortaya konmuştur (17). Yapılan çalışmalarda mastitislerden % 6-42 oranları arasında enterokok izolasyonunun gerçekleştirildiği bildirilmiştir (14, 19). Çevresel bir epidemiyolojiye sahip olan enterokoklar, insanlarda nozokomial enfeksiyonlarda önemli bir problem haline gelmelerine rağmen epidemiyolojileri konusunda bilgiler yetersizdir (19).

Enterokok suşlarının sahip oldukları virulens faktörleri, antibiyotik dirençliliği ve genetik heterojenitesi üzerine yapılan çalışmalarda, suşlar arasında konakçı orijinine göre farklılıkların olduğu, virulens özellikleri ve direnç mekanizması yönünden pek çok farklı mekanizma kazandıkları belirlenmiştir (4, 8, 17). Enterokokların moleküler metotlarla genotiplendirilmesi de yapılmış ancak heterojenitenin fazla olmasından dolayı dominant bir klon ortaya çıkarılamamıştır. Ayrıca heterojenitesi fazla olan bu etkenlerin meme bezine olan etkileri bakımından da suşlar arasında farklılıklar gösterdikleri belirlenmiştir (18, 19).

Bu çalışmada mastitis kökenli enterokokların moleküler tekniklerle tiplendirilmesi amaçlandı.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada Ankara ve Balıkesir illerinde, orta büyüklükte olan işletmelerdeki mastitis şüpheli ineklerden izole edilen 75 adet *Enterococcus* spp. incelendi. İncelenen 75 izolatın 37 (%9,1)'si Ankara ilinden, 38 (%6,2)'i Balıkesir ilinden gelen sütlerden sağlandı

Çalışmada kullanılan suşların identifikasyonlarının cins düzeyinde doğrulanması amacıyla, bakterilere Gram boyama ve katalaz testleri yapıldı. Gram pozitif kok şeklinde ve katalaz testi negatif olan etkenlere hippurat hidrolizasyon testi, %6,5'lik NaCl'li agarda üreme ve 45 °C'de üreme testleri yapıldı (9, 20). Testler sonucunda *Enterococcus* spp. olduğu doğrulanan suşlar moleküler analizler gerçekleştirilinceye kadar -20°C'de gliserinli buyyon içerisinde saklandı.

DNA ekstraksiyonu: DNA ekstraksiyonunda MO BIO Ultraclean microbial DNA izolasyon kiti (MO BIO-Carsbad, CA) kullanıldı ve işlem üretici firmanın protokolüne göre gerçekleştirildi.

Restriksiyon Enzimi Uzunluk Polimorfizmleri-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RFLP-PCR): RFLP-PCR, Jayarao ve ark. (11) tarafından bildirilen prosedüre göre gerçekleştirildi. Toplam 100 µl'lik hacim için her bir primerden (Forward primer 5'-CCAAGCTTGCTCAGG ACGAACGCT-3', Reverse primer 5'-CGGGATCCCGC CCGGGAACGTATTCAC-3') 0,5 µM, 2,5 U Taq DNA polimeraz, 100 µM dNTP miks, 1XPCR Buffer, 2mM MgCl₂ ve 5µl DNA kullanıldı. PCR işlemi 93 °C'de 90 saniye, 56 °C'de 90 saniye ve 75 °C'de 90 saniye olmak üzere toplam 35 siklus olarak gerçekleştirildi. Üretici firma protokolüne uygun şekilde hazırlanan ampliconlara *HhaI* ve *MspI* enzimleri ile 2 saat 37 °C'de kesim işlemi uygulandı (11). Bant profilleri 1xTBE ile hazırlanan %1,5'luk jelde elektroforez yapılarak görüntüledi. *HhaI* enzim kesimi sonrasında, enterokok etkenlerine spesifik 220, 280, 380 ve 550 bp büyüklüğündeki bantların görülmesi ile streptokok etkenlerinden ayrımı sağlanırken; *MspI* enzim kesimi sonrasında, *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarında sırasıyla 590 ve 330 bp'lik bantların oluşması ile tür düzeyinde identifikasyon yapıldı. Bu bantların *E. avium* suşlarında bulunmaması ile suşların ayrımı gerçekleştirildi.

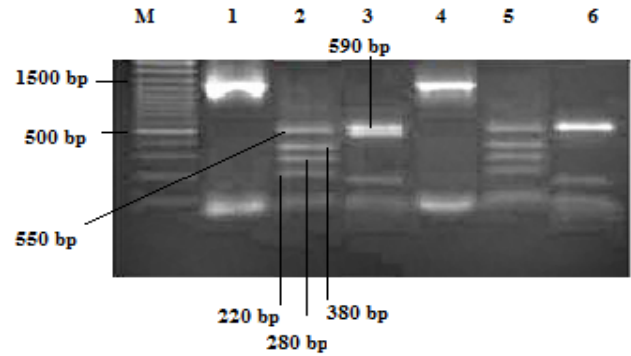
Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RAPD-PCR): RAPD-PCR yöntemi Gillespie ve ark. (10) tarafından bildirilen metoda göre gerçekleştirildi. PCR karışımı, 1XPCR buffer, 2 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTP, 10 pmol primer, 5 µl DNA içerecek şekilde 25 µl olarak hazırlandı. PCR siklusları 94,5 °C'de 120 saniye ön ısıtmayı takiben 35 siklus olacak şekilde 94,5 °C'de 70 saniye, 33 °C'de 60 saniye ve 72 °C'de 130 saniye olacak şekilde programlandı. Ampliconlara % 1,5'luk oranda, 1xTBE ile hazırlanan jelde elektroforez yapıldı. Tür düzeyinde identifiye edilmiş olan enterokok etkenleri, agaroz jel elektroforezde

görüntülenen bant sayısı ve büyüklükleri yönünden ayrı ayrı değerlendirildi.

Bulgular

İncelenen izolatların tümünün *Enterococcus* spp. olduğu doğrulandı ve tüm suşlar moleküler testlerde kullanılmak üzere çalışma kapsamına alındı.

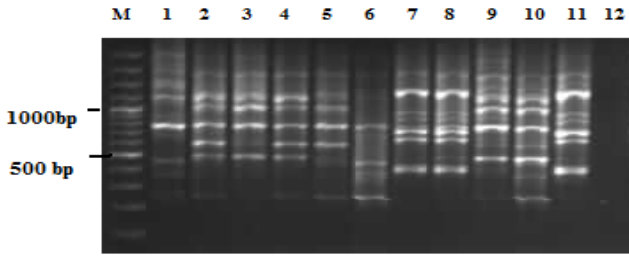
RFLP-PCR bulguları: PCR işlemi sonunda tüm *Enterococcus* spp. suşlarında *Streptococceae* ailesine spesifik 1400-1500 bp arasındaki 16S rDNA bölgesi görüntüledi (Şekil 1). Bu görüntü, PCR sonucunda tüm izolatların DNA amplifikasyonlarının gerçekleştiğini gösterdi. Çoğaltılan DNA'ların *HhaI* enzimi ile kesimi sonrasında 75 adet enterokok suşunun tamamında 220, 280, 380 ve 550 bp büyüklüğe sahip bantlar görülmesi ile biyokimyasal yöntemlerle cins düzeyinde identifiye edilen enterokok suşları moleküler yöntemle de cins düzeyinde doğrulandı (Şekil 1). *MspI* kesimi sonrasında suşlar Jayarao ve ark. (19)'nın bildirdiği şekilde tiplendirildi. Buna göre 590 bp büyüklüğündeki bant gösteren suşlar *E. faecium*, 330 bp'lik bant gösterenler ise *E. faecalis* olarak identifiye edildi. *E. avium* suşları da bu bantların bulunmaması ile identifiye edildi. İncelenen 75 adet enterokok izolatının 61 (%81)'i *E. faecium* ve 14 (%18)'ü *E. avium* olarak identifiye edildi. İzolatlar içinde *E. faecalis* tespit edilmedi (Şekil 1). Enterokok etkenlerinin illere göre dağılımında, Balıkesir ilinde 32 (% 84) adet *E. faecium* suşu identifiye edilirken, 6 (%15) adet *E. avium* suşu identifiye edildi. Ankara ilinde ise 29 (%78) adet *E. faecium* suşu, 8 (%21) adet *E. avium* suşu tiplendirildi.



Şekil 1. RFLP bant paternleri. M: Marker (100 bp DNA Ladder Plus) 1: *E. faecium* 16S rDNA 2: *E. faecium*-*HhaI* kesimi 3: *E. faecium*-*MspI* kesimi 4: *E. avium* 16S rDNA 5: *E. avium*-*HhaI* kesimi 6: *E. avium*-*MspI* kesimi

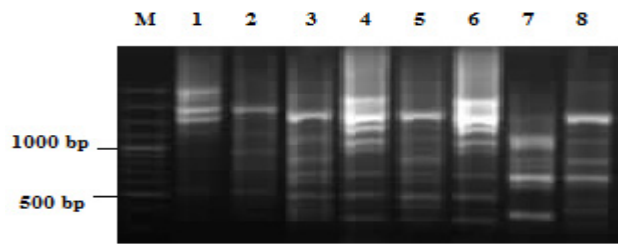
Figure 1. RFLP band patterns. M: Marker (100 bp DNA Ladder Plus) 1: *E. faecium* 16S rDNA 2: *E. faecium*-*HhaI* digested 3: *E. faecium*-*MspI* digested 4: *E. avium* 16S rDNA 5: *E. avium*-*HhaI* digested 6: *E. avium*-*MspI* digested

RAPD-PCR: RAPD-PCR analizi sonrasında *E. faecium* suşlarında 10 farklı bant profili saptanırken, *E. avium* suşlarında ise 7 farklı bant profili belirlendi (Şekil 2 ve 3).



Şekil 2. *E. faecium* suşlarının RAPD-PCR bant paternleri. M: marker (100 bp DNA ladder plus, Fermentas) 1-11. hatlar *E. faecium* suşları, 12.hat, negatif kontrol.

Figure 2. RAPD-PCR band patterns of *E. faecium* strains. M: marker (100 bp DNA ladder plus; Fermentas) Lanes 1-11, *E. faecium* strains, Lane 12, negative control



Şekil 3. *E. avium* suşlarının RAPD-PCR bant paternleri. M: marker (100 bp DNA ladder plus, Fermentas) 1-8. hatlar *E. avium* suşları

Figure 3. RAPD-PCR band patterns of *E. avium* strains. M: marker (100 bp DNA ladder plus; Fermentas) Lanes 1-8, *E. avium* strains

Tartışma ve Sonuç

Mastitis patojenlerinin doğru şekilde identifikasyonu, klinik ve subklinik olgularda enfeksiyonun teşhisi ve kontrolü için oldukça önemlidir. Laboratuvarlarda mastitise neden olan bakteriyel etkenlerin identifikasyonu için genellikle fenotipik özelliklerden yararlanılarak biyokimyasal testlerle sonuca gidilmektedir. Ancak bu fenotipik identifikasyonun mastitise neden olan enterokoklar gibi bazı bakterilerin identifikasyonu için çok güvenilir olmadığı ve moleküler doğrulama gerektirdiği bildirilmektedir (3, 6). Bu nedenle de yapılan pek çok çalışmada mastitis kökenli enterokok izolatları sadece izolasyon aşamasında kalmış, izolatların identifikasyonuna gidilmemiştir (14, 16). Bu çalışmada da izolatlar fenotipik olarak tür düzeyinde identifiye edilmiş ve sonrasında cins düzeyinde doğrulama amacıyla PCR yapılmıştır. PCR ile *Enterococcus* spp. olduğu doğrulanan izolatların tür düzeyinde identifikasyonu için de RFLP-PCR yapılmış ve böylece tüm izolatlar identifiye edilebilmiştir.

Mastitis izolatı olan enterokokların identifikasyonları ile ilgili yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar farklılık göstermektedir. Petersson-Wolfe ve ark. (18) izole edilen enterokokların %71'ini *E. faecium* ve %3'ünü *E. faecalis* olduğunu; Devriese ve ark. (6) da, *E. faecalis* oranını %20, *E. faecium*'u ise %6 olarak

bulmuşlardır. Tenhagen (22) ise 42 enterokok izolatının 23'ünü *E. faecalis*, 19'unu ise *E. faecium* olarak tiplendirmiştir. Wolfgang ve ark.(24) çalıştıkları 37 farklı süt işletmesinden 18 adet enterokok izolatı elde etmiş bu izolatların 5 tanesini *E. avium*, 8 tanesini *E. faecalis* ve 4 tanesini ise *E. faecium*, bir tanesini de *E. equinus* olarak tiplendirmiştir. Devriese ve ark. (6) ise 243 adet gram pozitif, katalaz negatif suş içerisinde 61 adet *E. faecalis*, 3 adet *E. faecium* izolatı elde etmişlerdir. Nam ve ark. (15) ise 105 mastitis kökenli enterokok izolatı içerisinde 47 adet *E. faecalis*, 39 adet *E. faecium* ve 6 adet *E. avium* identifikasyonu yapmışlardır. Jayarao ve ark. (12) ise 144 adet gram pozitif katalaz negatif suş içerisinde 10 adet *E. faecium* tiplendirirken, 12 adet *E. faecalis* suşu tiplendirmiş ancak *E. avium* identifikasyonu yapamamışlardır. Watts (23) ise 30 enterokok izolatı içinde 14 adet suşu *E. faecium*, 11 tanesini ise *E. faecalis* olarak identifiye etmiştir. Aeastrup ve ark. (2) mastitis izolatı olan enterokoklarda *E. faecium* ve *E. faecalis* yanında *E. avium*'u da identifiye ederek, bu etkenlerinde mastitislerden izole edilebileceğini belirlemişlerdir. Bu çalışmada ise incelenen 75 adet enterokok suşu içerisinde %81,3 *E. faecium*, %18,6 *E. avium* identifiye edilirken *E. faecalis* bulunamadı. Tiplendirilen enterokok suşları arasında dominant türün *E. faecium* olduğu belirlendi. Elde edilen bulgular, Petersson-Wolfe ve ark. (18) tarafından elde edilen *E. faecium* izolasyon oranına benzer, ancak *E. faecalis* izolasyonunun yapılamaması nedeniyle farklılık göstermektedir. Ayrıca bu çalışmada enterokok izolatları arasında *E. avium* bulunması Wolfgang ve ark. (24) ile Nam ve ark. (15) tarafından yapılan bildirimini desteklemektedir.

Mastitislerden izole edilen enterokokları moleküler olarak karakterize etmek için birçok araştırmacı tarafından RAPD-PCR yöntemi kullanılmıştır (5, 10, 20). Petersson ve ark. (19), enterokoklar için yapılan bir RAPD-PCR analizinde, izolatlar arasında genetik heterojenite olduğunu belirtmişlerdir. Benzer bulgular Franzetti ve ark. (7) ve Gillespie ve ark. (10) tarafından da ortaya konulmuştur. Ancak Conconcelli ve ark. (5) DNA ekstraksiyon metodları, PCR koşulları gibi değişkenlerin RAPD-PCR analiz sonuçlarını değiştirebileceğini buna bağlı olarak da sonuçların etkilenebileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada izole edilen suşların tür düzeyinde yapılan RAPD-PCR analizinde; *E. faecium* suşlarında 10 farklı ve *E. avium* suşlarında ise 7 farklı bant profili belirlenmiştir. Bu bulgu, suşlar arasında RAPD-PCR bant profillerinin heterojen olduğunu göstermektedir ve daha önce bildirilen bulgulara benzerlik göstermektedir.

Sonuç olarak enterokokların mastitislerin etiolojisinde önemli rol oynadığı, bu etkenlerin tiplendirilmesinde RFLP-PCR yönteminin yararlı olduğu görülmüştür. Ayrıca farklı işletmelerden ya da bölgelerden izole edilen suşların karakterizasyonu ve genetik yakınlığının belirlenebilmesi için RAPD-PCR yönteminin kullanımı

nın uygun olabileceği görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda, daha fazla izolatin, farklı tiplendirme metodları ile tiplendirilmesiyle enterokokların epidemiyolojisi hakkında daha geniş veriler elde edilmesine yol açacağı ve mastitis etiyojisinde önem kazanan enterokokların daha ileri tekniklerle araştırılmasının da süt sığırcılığı ve ekonomisine katkı sağlayacağı belirlenmiştir.

Kaynaklar

1. **Akan M** (2006): *Enterococcus infeksiyonları*. 27-29. In: N Aydın, J Paracıkoğlu (Ed) , Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). İlke Emek Yayınları, Ankara.
2. **Aestrup F, Butaye P, Witte W** (2002): *Nonhuman reservoirs of Enterococci*. 55-100. In: Gilmore MS (Ed) The Enterococci (Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance) ASM Press, USA
3. **Bensalah F, Flores MJ, Mouats A** (2006): *A rapid PCR based method to distinguish between Enterococcus species by using degenerate and species-specific Sod A gene primers*. Afr. J. Biotechnol. **5**, 607-702
4. **Charles MAPF, Albrecht BMS, Nuham KY, Marc V, Jean S, Wilhelm HH** (2001): *Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among Enterococci isolated from food*. Appl. Environ. Microbiol. **67**,4385-4389
5. **Cocconcelli PS, Porro D, Galandini S, Senini L** (1995): *Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and Enterococci* Lett. App. Microbiol. **21**, 376-379
6. **Devriese LA, Hommez J, Laevens H, Pot B, Vandamme P, Haesebrouck F** (1999): *Identification of aesculin-hydrolyzing Streptococci, Lactococci, Aerococci and Enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows*. Vet. Microbiol. **70**, 87-94
7. **Franzetti L, Pompei M, Scarpellini M, Galli A** (2004): *Phenotypic and genotypic characterization of Enterococcus spp. of different origins*. Current Microbiol. **49**, 255-260
8. **Hardie JM, Whitley RA** (1997): *Classification and overview of the genera Streptococcus and Enterococcus*. J. Appl. Microbiol. Symp. Supp. **83**, 1-11
9. **Garrity GM** (2001): *Bergey's manual of systematic bacteriology* Vol: 5 Springer-Verlag, New York. <http://cme.msu.edu/Bergeys/>
10. **Gillespie BE, Jayarao BM, Oliver SP** (1997): *Identification of Streptococcus species by randomly amplified polymorphic deoxyribonucleic acid fingerprinting*. J. Dairy Sci. **80**, 471-476
11. **Jayarao BM, Dore JJE, Oliver SP** (1992): *Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA Streptococcus and Enterococcus species of bovine origin*. J. Clin. Microbiol. **30**, 2235- 2240
12. **Jayarao BM, Oliver SP, Matthews KR, King SH**. (1991) *Comparative evaluation of Vitek gram-positive identification system and API Rapid Strep system for identification of Streptococcus species of bovine origin*. Vet Microbiol **26**, 301-308
13. **Mannu L, Paba A, Daga E, Comunian R, Zanetti S, Dupre I, Sechi LA** (2003): *Comparison of incidence of virulence determinants and antibiotics resistance between Enterococcus faecium strains of dairy, animal and clinical origin*. Int. J. Food. Microbiol. **88**, 291-304
14. **McDonald TJ, McDonald JS** (1976): *Streptococci isolated from bovine intramammary infections*. Am. J. Vet. Res. **37**, 377-81
15. **Nam HM, Lim SK, Moon JS, Kang HM, Kim JM, Jang KC, Kang MI, Joo YS, Jung SC** (2009) *Antimicrobial resistance of Enterococci isolated from mastitic bovine milk samples in Korea*. Zoonoses Public Health. [Published online: Dec 23,2009,10.00 pm] DOI: 10.1111/J.1863-2378.2009.01307x
16. **Park YK, Koo HC, Kim SH, Hwang SY, Jung WK, Kim JM, Shin S, Kim RT, Park YH** (2007): *The analysis of milk components and pathogenic bacteria isolated from bovine raw milk in Korea*. J. Dairy Sci. **90**, 5405-5414
17. **Petersson-Wolfe CS, Wolf SL, Hogan JS** (2007): *In vitro growth of Enterococci of bovine origin in bovine mammary secretions from various stages of lactation*. J. Dairy Sci. **90**, 4246-4231
18. **Petersson-Wolfe CS, Adams S, Wolf SL, Hogan JS** (2007): *Genomic typing of Enterococci isolated from bovine mammary glands and environmental sources*. J. Dairy Sci. **91**,615-619
19. **Petersson-Wolfe, CS** (2006): *A study of the occurrence, phenotypic and genotypic diversity and both in vitro and in vivo growth response of Enterococcus spp. isolated from bovine origin*. Ohio State University,USA.
20. **Riboldi GP, Mattos EP, Frazzon APG, Azevedo PA, Frazzon J** (2008): *Phenotypic and genotypic heterogeneity of Enterococcus species isolated from food in Southern Brazil*. J. Basic Microbiol. **48**, 31-37
21. **Smith KL, Hogan JS** (2003): *Environmental mastitis caused by species of Streptococcus and Enterococcus: Risk Factors and Control*. Ohio Agricultural Research and Development Center The Ohio State University Wooster, OH USA http://cals.arizona.edu/extension/dairy/conference/proceedings/environmental_mastitis.pdf accessed 08.09.2009
22. **Tenhagen BA, Köster G, Wallmann J, Heuwieser W** (2006): *Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany*. J. Dairy Sci. **89**,2542-2551
23. **Watts JL** (1988): *Characterization and identification of Streptococci isolated from bovine mammary glands*. J. Dairy.Sci. **71**,1616-1624
24. **Wolfgang DR, Jayarao BM, Pillai SR, Sawant AA, Burns CM, Hutchinson LJ** *Farm management practices that influence the number and type of Streptococci and Streptococci-like organisms in dairy herds*. The Pennsylvania State University. University Park, PA, USA <http://vbs.psu.edu/ext/focus-areas/mastitis/bulk-tank-milk/Resources/Farm%20Management%20Practices.pdf> accessed 08.09.09

Geliş tarihi: 07.10.2009 / Kabul tarihi: 02.06.2010

Yazışma adresi:

Araş.Gör. Seyda Cengiz
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
06110 Dışkapı, Ankara
e-mail:seliberia@hotmail.com