

## Sağlıklı sığırların nazal boşluk flora bakterilerinin moleküler identifikasyonu\*

Zeynep ESKİN<sup>1</sup>, Süheyla TÜRKYILMAZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın

<sup>2</sup> Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji AD., Aydın

Geliş Tarihi / Received: 20.11.2014, Kabul Tarihi / Accepted: 11.12.2014

**Özet:** Bu çalışmada, klinik olarak sağlıklı sığırların nazal florasını oluşturan aerobik bakterilerin belirlenebilmesi için, alınan nazal sıvap örneklerinden izole edilen etkenlerin, 16S rRNA dizi analizi ile moleküler identifikasyonlarının yapılması amaçlandı. Çalışmada 15 çiftlikteki 56 sığırdan alınan nazal sıvap örnekleri kullanıldı. Nazal sıvaplardan konvansiyonel yöntemler kullanılarak bakteri izolasyonu gerçekleştirilip, etkenlerin makroskopik ve mikroskopik morfolojileri incelendikten sonra, identifikasyonları üniversal primerler kullanarak 16S rRNA geni polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı. İzolasyonları yapılan 192 mikroorganizmanın sekans analizi ile 143 (%74,5)'ünün Gram pozitif ve 49 (%25,5)'unun Gram negatif mikroorganizma olduğu tespit edildi. Koagülaz negatif stafilokoklar (%36,5), *Bacillus* sp. (%15,6), *S. aureus* (%11,0), *M. haemolytica* (%6,3), *Enterobacteriaceae* sp. (%6,8), *P. multocida* (%5,2), *M. luteus* (%4,2), *Streptococcus* sp. (%2,6), *Acinetobacter* sp. (%2,6), *Pseudomonas* sp. (%2,1) ve *Corynebacterium* sp. (%1,0) en çok tanımlanan türler olarak belirlendi. Bu çalışmada konvansiyonel mikrobiyolojik yöntemler ve moleküler identifikasyon yöntemlerinin büyük oranda birbirleri ile uyumlu oldukları görüldü. Bundan sonra yapılacak olan çalışmalarda, floradan izole edilen mikroorganizmaların virulens ve antibiyotik direnç genlerinin incelenmesi yapılabilir.

**Anahtar kelimeler:** Bakteri, Nazal flora, Moleküler İdentifikasyon, 16S rRNA

### Molecular identification of bacteria of flora nasal cavity of healthy calves

**Summary:** This study aimed to carry out the molecular identification of aerobic bacterial nasal flora of clinically healthy calves, collected by nasal swabs, by using 16S rRNA sequence analysis. Nasal swab samples from 56 calves on 15 farms were used in the study, isolation of bacteria was carried out by using conventional methods, after examining the macroscopic and microscopic morphology of the factors, their identifications were carried out by using universal primers duplicating polymerase chain reaction of 16S rRNA gene. With the sequence analysis of the isolated 192 micro-organisms, it was determined that 143 (74.5%) were Gram-positive and 49 (25.5%) were Gram-negative micro-organisms. Coagulase-negative staphylococci (36.5%), *Bacillus* sp. (15.6%), *S. aureus* (11.0%), *M. haemolytica* (6.3%), *Enterobacteriaceae* sp. (6.8%), *P. multocida* (5.2%), *M. luteus* (4.2%), *Streptococcus* sp. (2.6%), *Acinetobacter* sp. (2.6%), *Pseudomonas* sp. (2.1%) and *Corynebacterium* sp. (1.0%) were the most commonly identified species. In our study, results of conventional methods microbial and molecular identification techniques were found to be similar. It was suggested that virulence and antibiotic resistance genes of the most common agents isolated from flora should be determined at the future studies.

**Key words:** Bacteria, Nasal flora, Molecular Identification, 16S rRNA

### Giriş

Solunum sisteminin ilk basamağı olan nazal mukozada, bakterilerin türü ve yoğunluğu hayvanın solunum sistemi sağlığı açısından bilgi vermektedir. Normal bakteri florası infeksiyon etkenlerine karşı doğal bir direnç oluşturur. Solunum sisteminin kendine özgü bir florası vardır. Bu flora mikroorganizmaları üst solunum yollarında yaşar [2].

Şeker ve ark. klinik olarak sağlıklı Anadolu manda yavrularından nazal mukozanın bakteriyel mikroflorasını belirlemek amacıyla toplam 160 örnekten 165 bakteriyel izolat saptamışlardır. Konvansiyonel yöntemlerle, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Arcanobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Neisseria*, *Morexella*, *Pasteurella* ve *Mannheimia* cinslerini içeren 10 cins izole etmişlerdir. *Staphylococcus epidermi-*

**Yazışma adresi / Correspondence:** Süheyla Türkyılmaz, Adnan Menderes Üniv. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji AD., Aydın  
E-posta: sturkyilmaz@adu.edu.tr

\*Bu proje Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından (Proje No: VTF-12026) desteklenmiştir.

*dis* (%48,8), *S. aureus* (%33,8), *M. haemolytica* (%25,0) ve *P. multocida* (%17,5) en sık izole edilen türler olarak belirlemiştirler [14]. Magwood ve ark. ise nazal floranın ana etkenleri Streptokoklar, saprofitik *Neisseria* türleri, Mikrokoklar ve potansiyel patojen olan *Pasteurella multocida* ve *Pasteurella haemolytica* türleri, tamamlayıcı flora etkenleri; *Moraxella*, *Diplococcus* ve *Corynebacterium* türleri olduğunu bildirmiştir. Geçici mikroflora etkenlerinin ise; Koliform grubu bakteriler (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* spp. ve toprak bakterileri (*Flavobacterium*, *Chromobacterium*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* ve *Lactobacillus*) olarak belirtmişlerdir [8].

16S rRNA gen sekansı 1980'li yıllardan beri bakterilerin sınıflandırılmasında ve genotipik analizleri için önemli bir araç olarak kullanılmaktadır. rRNA mutasyonlardan en az etkilenen genetik materyeldir. 16S rRNA'nın birkaç bölgesi tüm bakterilerde çok iyi korunmuştur. Bu korunmuş bölgelerden seçilen primerler tüm bakterilerde 16S rRNA amplifikasyonunu sağlar ve bunlara üniversal primerler denir. Çoğaltılan bölgeler aynı zamanda tür identifikasyonunu sağlayan özgün değişken bölgeleri de içerir. Bundan dolayı 16S rRNA gen sekansına dayalı analiz yöntemleri insanlarda klinik tanı laboratuvarlarında bakteriyel izolatların identifikasyonunda kullanılan önemli bir yöntem haline almıştır [11, 13,15].

Bu çalışmada da, Aydın yöresindeki çiftliklerdeki sağlıklı sığırların nazal mikroflorasını oluşturan aerobik bakterilerin belirlenebilmesi için, alınan nazal sıvap örneklerinden izole edilen etkenlerin, 16S rRNA dizi analizi ile moleküler identifikasyonlarının yapılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metod

### Materyal

Bu çalışmada Aydın ilinde Kasım 2011-Kasım 2012 tarihleri arasında, 15 sığır işletmesinden (her sürüden 5-14 örnek), son üç ayda antibiyotik tedavisi almamış, 3-9 yaş arasındaki sığırlardan, klinik muayeneleri yapıldıktan sonra, klinik olarak sağlıklı olarak belirlenen 56 inekten alınan burun sıvap örnekleri kullanılmıştır.

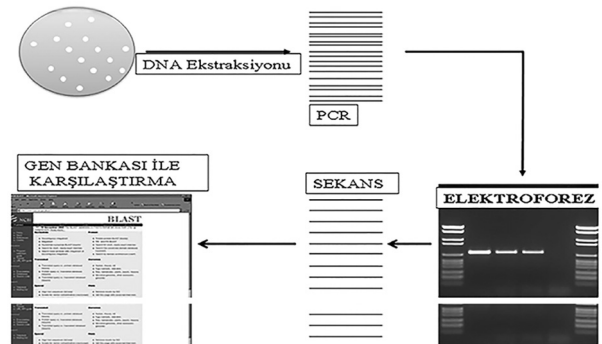
### Metot

Sürüntüler her iki taraf burun konkasının ön 1/3'lük kısmından serum fizyolojikle ıslatılmış steril pamuk eküvyonlarla sağa ve sola birkaç kez çevirmek suretiyle alınarak Stuart Transport Medium'a (Oxoid) konuldu. Alınan tüm örnekler soğuk zincir altında laboratuvara getirilip izolasyon çalışmalarına başlandı. Bunun için svaplar besi yerlerine (%7 koyun kanlı agar, mannitol salt agar ve MacConkey agara) ekilip 37°C'de 24-48 saat inkube edildi. Daha sonra üreyen mikroorganizmaların makroskopik olarak koloni morfolojileri, pigment ve hemoliz özellikleri; mikroskopik olarak Gram boyanma özellikleri incelendi [7].

### Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR):

İzole edilen suşların tür düzeyinde identifikasyonları sekans analizi ile gerçekleştirildi. Bunun için öncelikle izole edilen suşlardan kromozomal DNA ekstraksiyonu ticari bir kit ile (İnstagen) 16S rRNA geni üniversal primerler S16S20 (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') ve S16S1390 (5' GAC GGG CGG TGT GTA CAA) [11, 13] kullanılarak PZR ile çoğaltıldı ve ürünler %1'lik jelde görüntülendi. Tüm bakterilerden 16S rRNA fragmanı çoğaltmaya yarayan bu primerlerle, elde edilen amplikonlar tür tayininin yapılabilmesi için sekans analizine tabi tutuldu.

**Secans Analizi:** Elde edilen amplikonlar sekans analizleri için 96 kuyucuklu pleyt içerisinde MacroGen (MacroGen Inc., Korea) firmasına gönderildi. Elde edilen 16S rRNA sekansları tür tayininin yapılabilmesi için gen bankası ile karşılaştırıldı. Bu amaçla National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanıldı (Şekil 1.).



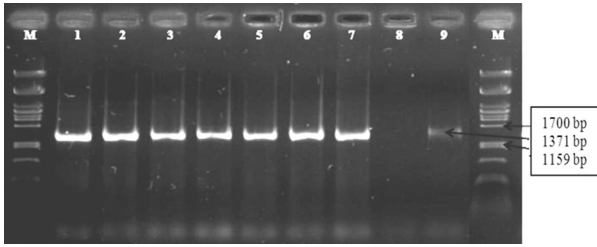
Şekil 1. Bakterilerin 16S rRNA sekansına dayalı moleküler identifikasyonu.

## Bulgular

**İzolasyon Bulguları:** Elli altı inekten alınan burun sıvı örneklerinin incelenmesi sonucunda 192 izolat elde edilmiştir.

**Mikrobiyolojik Bulgular:** 192 suşun makroskopik olarak koloni morfolojileri, pigment ve hemoliz özellikleri; mikroskopik olarak Gram boyanma özellikleri incelenmesi sonucunda 143 Gram pozitif (%74,5) 49 Gram negatif mikroorganizma (%25,5) olduğu belirlendi.

**Moleküler Bulgular:** 192 izolat için 16S üni-versal primerleri kullanılarak yapılan PZR'da 1371 bp uzunluğunda bantlar görülmüştür (Şekil 2).



**Şekil 2.** 16S universal primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR M: Marker (PstI enzimi ile kesilmiş lambda faj DNA'sı) 1-7: Saha izolatları, 8: Negatif Kontrol (DNA'sız master miks) 9: Pozitif Kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212).

İzolasyonları yapılan 192 mikroorganizmanın sekans analizi ile 143 (%74,5)'ünün Gram pozitif (*Aerococcus* sp., *Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp., *Brevibacillus* sp., *Brevibacterium* sp., *Corynebacterium* sp., *Enterococcus* sp., *Exiguobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Staphylococcus* sp.) ve 49 (%25,5)'unun Gram negatif (*Acinetobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Comamonas* sp., *Escherichia* sp., *Gamma* sp., *Klebsiella* sp., *Kluyvera* sp., *Mannheimia* sp., *Neisseria* sp., *Pantoea* sp., *Pasteurella* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *Raoultella* sp., *Salmonella* sp. ve *Serratia* sp.) olduğu tespit edilmiştir. Koagülaz negatif stafilokoklar (%36,5), *Bacillus* sp. (%15,6), *S. aureus* (%11,0), *M. haemolytica* (%6,3), *Enterobacteriaceae* sp. (%6,8), *P. multocida* (%5,2), *M. luteus* (%4,2), *Streptococcus* sp. (%2,6), *Acinetobacter* sp. (%2,6), *Pseudomonas* sp. (%2,1), *Corynebacterium* sp. (%1,0) en çok tanımlanmış türler olarak belirlenmiştir (Tablo 1, 2, 3).

**Tablo 1.** Gram pozitif izolatların işletmelere göre dağılımı

Bakteri Türleri	İşletme Numaraları															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
<b>Gram-pozitif</b>																
<i>Aerococcus viridans</i>	-	-	-	1	-	-	-	1	2	-	-	-	-	1	-	5
<i>Arthrobacter arilaitensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
<i>Bacillus altitudinis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	2
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	-	1	-	1	2	-	2	-	3	-	1	-	1	-	-	11
<i>Bacillus megaterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
<i>Bacillus pumilus</i>	-	-	1	2	-	-	2	-	-	4	1	3	-	-	-	13
<i>Bacillus stratosphericus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>Bacillus thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
<i>Brevibacterium ravenstergense</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>Corynebacterium flavescens</i>	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Exiguobacterium indicum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	3
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	1	2	1	2	-	-	-	-	-	-	-	2	-	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	-	2	-	2	2	3	3	1	1	2	-	-	1	1	21
<i>Staphylococcus capitis</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2	-	3
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Staphylococcus croceolyticus</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5	2	3	4	4	3	3	2	3	-	2	-	-	3	4	38
<i>Staphylococcus equorum</i>	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	1	-	-	-	3
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-	2	-	-	-	-	-	1	-	2	-	2	-	1	-	8
<i>Staphylococcus hominis</i>	1	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	2	7
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	-	-	3	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	6
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2

**Tablo 2.** Gram negatif izolatların işletmelere göre dağılımı

Bakteri	İşletme Numaraları															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
<b>Gram-negatif</b>																
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	2
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	3
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
<i>Comamonas kerstersii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>Gamma proteobacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	1	-	3
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Kluyvera intermedia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
<i>Mannheimia haemolytica</i>	1	1	1	-	1	1	1	1	-	1	2	1	-	-	1	12
<i>Neisseria dentiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
<i>Pantoea agglomerans</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pasteurella multocida</i>	2	-	-	-	-	3	1	1	1	-	2	-	-	-	-	10
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	2
<i>Pseudomonas geniculata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
<i>Pseudomonas thermotolerans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
<i>Raoultella planticola</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Salmonella bongori</i>	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Serratia rubidaea</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2

**Tablo 3.** İzolatların gruplandırılmış veri analizi

Bakteriler	İzolat Sayısı (n)	İzolat Oranı (%)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	38	19,8
<i>Staphylococcus aureus</i>	21	11
Diğer KNS <sup>a</sup>	32	16,7
<i>Bacillus</i> sp. <sup>b</sup>	30	15,6
<i>Micrococcus luteus</i>	8	4,2
<i>Streptococcus</i> sp. <sup>c</sup>	5	2,6
<i>Corynebacterium</i> sp.	2	1
<b>Yaygın Patojenler</b>		
<i>Mannheimia haemolytica</i>	12	6,3
<i>Pasteurella multocida</i>	10	5,2
<i>Pseudomonas</i> sp. <sup>d</sup>	4	2
<i>Acinetobacter</i> sp. <sup>e</sup>	5	2,6
<b>Diğer Bakteriler</b>		
<i>Enterobacteriaceae</i> sp. <sup>f</sup>	13	6,8
Diğer bakteriler <sup>g</sup>	12	6,3

<sup>a</sup> Nazal boşlukta bulunan *Staphylococcus capitis*, *S. chromogenes*, *S. croceolyticus*, *S. equorum*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. pasteurii*, *S. saprophyticus*, *S. vitulinus*.

<sup>b</sup> *Bacillus altitudinis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. stratosphericus*, *B. thuringiensis*

<sup>c</sup> *Aerococcus viridans*

<sup>d</sup> *Pseudomonas geniculata*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. thermotolerans*

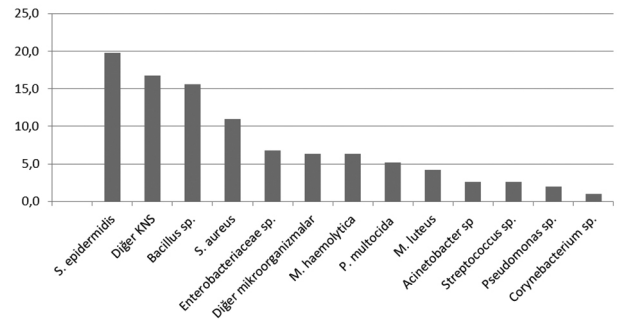
<sup>e</sup> *Acinetobacter calcoaceticus*, *A. lwoffii* türleri

<sup>f</sup> Enterobacteriaceae familyasına ait *Citrobacter amalonaticus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Kluyvera*

*intermedia*, *Pantoea agglomerans*, *Proteus mirabilis*, *Raoultella planticola*, *Salmonella bongori*, *Serratia rubidaea*

<sup>g</sup> *Arthrobacter arilaitensis*, *Brevibacillus laterosporus*, *Brevibacterium ravenburgense*, *Enterococcus casseliflavus*, *Exiguobacterium indicum*, *Comamonas kerstersii*, *Gamma proteobacterium*, *Neisseria dentiae*

İdentifiye edilen bakterilerin tür ve oranları Şekil 3'de gösterilmiştir.

**Şekil 3.** İdentifiye edilen bakterilerin tür ve oranları

## Tartışma

Bu çalışmada, Aydın ilinde bulunan 15 işletmedeki klinik olarak sağlıklı 56 sığırların, nazal mukozanın bakteriyel mikroflorasını belirlemek amacıyla nazal sıvı örnekleri toplanmıştır. Toplam 56 sıvı örneğinden izole edilen 192 (%74,5 Gram pozitif, %25,5 Gram negatif) bakteri 16S rRNA dizi analizi kullanılarak, ilgili gen bölgesinin amplifikasyonu sonra-

sında yapılan sekans analizi ile tanımlanmıştır. Genellikle sistemik infeksiyonlardan Gram negatif bakteriler sorumludur [10]. Çalışmada Gram pozitif bakteri izolatlarının Gram negatif izolatlarla oranla baskın olması, çalışmada materyal alınan işletmelerde bulunan sığırların büyük oranda sağlıklı olduğunu düşündürmektedir. Ancak 13 nolu işletmedeki Gram negatif bakterilerin oranı normal florada bulunması gerekenden yüksektir. Normal nazal flora üyeleri herhangi bir sebeple (ortam sıcaklığı, stres, patojen varlığı vs.) baskılandığında florada yer alan bu bakteriler daha sonrasında kalıcı florayı baskılayarak patojen etki göstermekte ve solunum yolu hastalıklarına sebep olabilmektedir. Ayrıca bu bulgular daha önce evcil ve vahşi hayvanlar üzerinde yapılan diğer çalışmalarla da uyusmaktadır [3, 9].

Şeker ve ark. [14], klinik olarak sağlıklı Anadolu manda yavrularında nazal mukozanın bakteriyel mikroflorasını belirlemek amacıyla toplam 160 örnekten 165 bakteriyel izolat elde etmişlerdir. Biyokimyasal yöntemler kullanılarak yapılan identifikasyona göre, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Arcanobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Pasteurella* ve *Mannheimia* cinslerini içeren 10 cins izole etmişlerdir. *S. epidermidis* (%48,8), *S. aureus* (%33,8), *M. haemolytica* (%25,0) ve *P. multocida* (%17,5) örneklenen hayvanlardan en sık izole edilen türler olarak belirlemişlerdir. Bu çalışma ile karşılaştırıldığında, yaptığımız çalışma sonuçlarında en sık izole edilen türler bakımından paralellik gösterirken yukarıda bildirilen çalışmalarla paralellik gösterirken, farklı olarak *Arcanobacterium* ve *Moraxella* cinslerine ait bakteri türleri de sıklıkla izole edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada izole edilen bakteri cinslerinin haricinde çalışmamızda 17 farklı cins izole edilmiştir. Bu durumun çalışmamızda kullandığımız moleküler tanı yönteminin ayırt ediciliğinin diğer yöntemlere oranla çok daha yüksek olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir.

Bir non-patojenik organizma olan ve çalışmada yüksek sıklıkta izole edilen *Bacillus* türleri ise çevre florasının yaygın üyelerindedir. Bu bakteriler çiftlik ortamlarında sığırlar tarafından aspire edilmesine rağmen nazal mukozada kolonize olamamaktadır [5]. Bunun yanı sıra Holth ve ark. [6] *Aeromonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Brevibacillus* sp., *Kurthia* sp., *Stenotrophomonas*

sp., ve *Pseudomonas* sp., gibi toprak ve su bakterilerinin florada geçici olduğunu ve bu bakterilerin sığırların florasına yaşanılabileceğinden ve besi ortamından taşındığını belirtilmişlerdir. Bu sebeple çalışmamızdaki *Bacillus* türlerinin sıklığı anlamlıdır.

Memeli deri florasında yer alan ve non-patojenik bu bakteri türü aynı zamanda ağız, mukoza, orofarinks ve üst solunum yollarında kolonize olabilmektedir. Daha önce develerde [12], tavşanlarda [1] ve keçilerde [4] yapılan nazal flora çalışmalarında da *M. luteus* yüksek oranlarda rapor edilmiştir. Çalışmamızın veri sonuçları daha önce yapılan bu çalışmalarla da örtüşmektedir. Çalışmamızda *M. luteus* %4,2 oranında izole edilmiştir. Bu diğer bakteri türlerine oranla yüksek bir orandır.

Quinn ve ark [10] *M. haemolytica* bakterisinin solunum sistemi hastalıklarından sorumlu ana mikroorganizma olarak izole edilebileceği bildirilmiştir. *P. multocida* ve *M. haemolytica* ruminantlarda, hemorajik septisemi ve ağır pnömoniye sebep olmakla birlikte sekonder enfeksiyonlara da sebep olmaktadır. Bu bakteriler çoğunlukla ağır solunum sistemi hastalıklarından izole edilen patojenik bakteriyel ajanlardır. Çalışmamızda %6,3 oranına sahip olan *M. haemolytica* ve %5,2 sıklık oranında bulunan *P. multocida* türleri solunum sisteminde en çok bilinen fırsatçı patojenlerdir. Bu konuda yapılan tüm araştırmalar, bu çalışmadakine benzer şekilde *M. haemolytica* ve *P. multocida* gibi nazal florada yer alan fırsatçı patojenlerin sağlıklı hayvanlarda da yüksek oranlarda bulunabildiğini göstermektedir.

Nazal kaviteden izole edilen bu bakteriler sosyal davranışlar ve hayvanların büyüdüğü çevre kaynaklı nazal flora geçici olarak yerleştiği düşünülmektedir. Çalışmamızda düşük oranlarda *E. coli* ve *Klebsiella* türleri bulunmuştur. Benzer şekildeki bulgular Şeker ve ark. [14]'nin yapmış olduğu çalışmada da rapor edilmiştir.

Özellikle KNS' ların nazal boşlukta iyi kolonize olan ana flora elemanları olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda; örnek alınan sığırlarda sekans analizi sonucunda en çok tanımlanan iki mikroorganizma *S. epidermidis* (%19,8) ve *S. aureus* (%11) olarak belirlenmiştir.

Sığırlarda solunum yolu hastalıkları ve nazal flora ile ilgili yapılan çalışmalar göz önüne alındığında; araştırmamızda örnek topladığımız 15 sığırlar

işletmesindeki sığırların sağlıklı olduğu, ancak bazı işletmelerde risk faktörlerinin diğerlerine göre daha yüksek olduğu söylenilebilir. 13 nolu işletmedeki Gram negatif bakterilerin oranı normal florada bulunması gerekenden yüksektir. Normal nazal flora üyeleri herhangi bir sebeple (ortam sıcaklığı, stres, patojen varlığı vs.) baskılandığında florada yer alan bu bakteriler daha sonrasında kalıcı florayı baskılayarak patojen etki göstermekte ve solunum yolu hastalıklarına sebep olabilmektedir.

Yapılan çalışma ve incelenen diğer çalışmalar sonucunda özellikle sığırlarda solunum yolu enfeksiyonlarına sebep olan ve işletmelerde büyük ekonomik kayıplara neden olan *M. haemolytica* ve *P. multocida* gibi fırsatçı patojenlerin bazı işletmelerde yüksek oranda bulunmakla birlikte ana flora elemanlarının bulunma sıklığını geçmediği görülmektedir. Bu bakterilerin üst solunum yolu mukozasında çok rahat kolonize olabildiği ve ancak stres gibi faktörlerle akciğerleri infekte ettikleri yapılan diğer çalışmalarda bildirilmiştir.

İzolatların tür düzeyinde doğru bir şekilde identifikasyonlarının yapılmasında sekans analizinin kullanılmasının pratik ve güvenilir olduğu görülmüştür. Yörede solunum sistemi problemi bulunan sığırların da nazal boşluk flora bakterilerinin moleküler identifikasyonlarının yapılması, sağlıklı ve sağlıklı florada bulunan mikroorganizmaların karşılaştırılması, her iki florada da en sık izole edilen etkenlerin virulens ve antibiyotik direnç genlerinin karşılaştırılarak incelenmesinin yöredeki solunum sistemi hastalıklarının daha da ciddi bir probleme sebep olmadan önlenmesine katkıda bulunacağı görüşünü düşündürmektedir.

## Kaynaklar

1. Ajuwape TP, Aregbesola EA, *The bacterial flora of the upper respiratory tracts of normal rabbits*. Israel Vet Med Assoc. 2000, 57: 1-5.
2. Arcangioli MA, Duet A, Meyer G, Dernburg A, Bezille P, Poumarat F, Le Grand D, (2008) *The role of Mycoplasma bovis in bovine respiratory disease outbreaks in veal calf feedlots*. Vet J. 177, 89- 93.
3. Barbour EK, Nabbut NH, Hamadeh SK, Al-Nakhli, (1997) *Bacterial identity and characteristics in healthy and unhealthy respiratory tracts of sheep and calves*. Vet Res Commun, 21, 421- 430.
4. Carter GR, (1984) *Isolation and identification of bacteria from clinical specimens*. In: Charles C. Thomas (Eds), *Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology*. USA. 4th p. 19- 30.
5. Collier JR, Rossow CF, (1964) *Microflora of apparently healthy and pneumonia prone herds*. J Vet Res. 25, 101-103.
6. Holth JB, Krieg NR, Sneath HAP, Stanley JT, Williams T, (2000) *Bergey's manual of determinative bacteriology USA: Lippincott*. Williams and Wilkins, Philadelphia PA, USA.
7. Koneman E W, Allen S D, Janda W M, Schreckenberger P C, Winn W C, (1997) *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. pp: 539-76. *The Gram-positive cocci: Part-1: Staphylococci and related organisms*. Lippincott, New York, USA.
8. Magwood SE, Barnum DA, Thomson RG, (1969) *Nasal bacterial flora of calves in healthy and pneumonia-prone herds*. Canadian J Comp Med. 33, 237- 243.
9. Megra T, Sisay T, Assaged B, (2006) *The aerobic bacterial flora of the respiratory passageways of healthy goats in Dire Dawa Abattoir, Eastern Ethiopia*. Rev Méd Vét. 157: 84-87.
10. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC, (2002) *Veterinary Microbiology and Microbial Disease. 1st Edn*. Blackwell Publishing Professional, Iowa, pp:461-464. ISBN: 0-632-05525-1.
11. Sghir A, Antonopoulos D, Mackie RI, (1998) *Design and evaluation of a Lactobacillus group-specific ribosomal RNA-targeted hybridization probe and its application to the study of intestinal microecology in pigs*. Syst Appl Microbiol. 21, 291-296.
12. Shemsedin M, (2002) *Bacterial species isolated from respiratory tract of camels slaughtered at Dire Dawa abattoir*. Eastern Ethiopia. Debre Zeit, 1-25.
13. Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon J J, Gibson G, Collins MD, Dore J, (1999) *Direct rDNA Community Analysis Reveals a Myriad of Novel Bacterial Lineages within the Human Gut*. Appl Environ Microbiol 65, 4799-4807.
14. Şeker E, Kuyucuoğlu Y, Konak S, (2009) *Bacterial examinations in the nasal cavity of apparently healthy and unhealthy Holstein cattle*. J Anim Vet Adv. 8 , 2355- 2359.
15. Woo PC, Leung AS, Leung KW, Yuen KY, (2001) *Identification of slide coagulase positive, tube coagulase negative Staphylococcus aureus by 16S ribosomal RNA gene sequencing*. Mol Pathol. 54, 244-7.