



**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİK-YL-2012-003**

SAĞLIKLI SIĞIRLARIN NAZAL BOŞLUK BAKTERİYEL FLORASININ MOLEKÜLER İDENTİFİKASYONU

Zeynep ESKİN

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ**

AYDIN-2012

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİK-YL-2012-003**

**SAĞLIKLI SIĞIRLARIN NAZAL BOŞLUK BAKTERİYEL
FLORASININ MOLEKÜLER İDENTİFİKASYONU**

Zeynep ESKİN

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ**

AYDIN-2012

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Biyolog Zeynep ESKİN tarafından hazırlanan “SAĞLIKLI SIĞIRLARIN NAZAL BOŞLUK BAKTERİYEL FLORASININ MOLEKÜLER İDENTİFİKASYONU” başlıklı tez, 28/08/2012 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi :

1- Prof. Dr. Osman KAYA

ADÜ, Veteriner Fakültesi

2- Doç. Dr. Ergün Ö. GÖKSOY

ADÜ, Veteriner Fakültesi

3- Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ

ADÜ, Veteriner Fakültesi

İmzası:

.....
.....
.....

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun
..... Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Doç. Dr. Sacide KARAKAŞ
Enstitü Müdürü

Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü 09100- AYDIN
Santral : (256) 218 20 00 Direkt Telefon : 218 20 44 *Faks : (256) 218 20 44

ÖNSÖZ

İnsanlar yeterli ve dengeli beslenmek için hayvansal proteinlere gereksinim duymaktadır. Hayvansal proteinlerin karşılanmasında dünyada ve Türkiye’de sığır eti ve ürünleri ilk sırada yer almaktadır. Beslenmede önemli bir yeri olan kırmızı etin, en ekonomik elde edildiği hayvan ise besi danası olarak adlandırılan 6-24 aylık genç sığırlardır. Aydın ili Türkiye’de üretilen kırmızı etin %1,7’sini karşılamaktadır. Üretim çiftlik hayvanlarında tek başına yeterli bir ölçüt değildir. Türkiye’de hayvancılığa yapılan destekleme yalnız üretime değil, sağlıklı üretime de yönelik olmalıdır.

Solunum sistemi hastalıkları sığır üreticiliğinde kalite ve verimi etkileyen önemli etkenlerdir. Solunum sisteminin ilk basamağı olan nazal mukozada, bakterilerin türü ve yoğunluğu hayvanın solunum sistemi sağlığı açısından bilgi vermektedir. Üst solunum yolu bakteri florası kalıcı ve geçici mikrofloranın ikisini de içermektedir. Kalıcı mikroflora zarar gördüğünde ilk olarak sistem kendiliğinden yenilenir. Bununla birlikte, bazı fırsatçı patojenler normal savunmanın önüne geçtiği durumlarda hastalığa yol açabilirler. Sığırlar anatomik ve fizyolojik yapıları itibarıyla solunum sistemi hastalıklarına duyarlıdır. Nazal floranın tespiti ve karşılaştırılması, sığırlarda verim kaybını azaltmak, sağlıklı hayvan bakımı yapabilmek ve ekonomik kayıpların önlenmesi için önemli bir basamaktır. Dolayısıyla, verim kayıplarını azaltmak için bakteri izolasyonu, idenfikasyonu ve uygun antibiyotiklerin bulunması önemli araştırma alanlarından birini oluşturmaktadır.

Bu çalışmada, Aydın yöresindeki çiftliklerdeki klinik olarak 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. Bu araştırma, VTF 12026 numaralı proje olarak Adnan Menderes Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenerek gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY.....	i
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Genel Bilgiler.....	1
1.2. Genel Flora.....	2
1.2.1. Kalıcı Flora.....	3
1.2.2. Geçici Flora.....	4
1.3. Nazal Flora.....	5
1.4. Solunum Sistemi.....	8
1.5. Solunum Sistemi Hastalıkları.....	9
1.6. Moleküler İdentifikasyon.....	11
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
2.1. Gereç.....	13
2.1.1. İzolasyon Örnekleri.....	13
2.1.2. Kullanılan Besiyerleri ve Solüsyonlar.....	13
2.1.2.1. Besiyerleri.....	13
2.1.2.1.1. Blood Agar (Kanlı Agar).....	13
2.1.2.1.2. Mannitol Salt Phenol Red Agar (MSA).....	13
2.1.2.1.3. MacConkey Agar.....	14
2.1.2.2. Solüsyonlar.....	14
2.1.2.2.1. EDTA (0,5 M).....	14
2.1.2.2.2. TBE Buffer (pH:8.0).....	14
2.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	15
2.1.3.1. Kullanılan Cihazlar.....	15
2.1.3.2. Primerler.....	15

2.1.3.3. MgCl ₂ , Taq DNA Polymerase, 10X Taq Buffer, dNTP Set.....	15
2.1.4. Elektroforez.....	15
2.1.4.1. Etidyum Bromür.....	15
2.1.4.2. Marker.....	15
2.1.4.3. Elektroforez İçin Kullanılan Gereçler.....	16
2.1.4.4. Agarose Jel Hazırlanışı.....	16
2.1.4.5. Elektroforez Cihazı.....	16
2.1.5. Kullanılan Diğer Gereçler.....	16
2.2. Yöntem.....	17
2.2.1. Burun Sıvı Örneklerinin Alınması.....	17
2.2.2. İzolatların Hazırlanması.....	17
2.2.3. Moleküler İdentifikasyon.....	17
2.2.3.1. DNA Ekstraksiyonu.....	17
2.2.3.2. Master Mikslerin Hazırlanması.....	18
2.2.3.3. 16S rRNA Geninin PZR ile Çoğaltılması.....	18
2.2.3.4. Örneklerin Yüklenmesi.....	19
2.2.3.5. Yürütme.....	19
2.2.3.6. Görüntüleme.....	19
2.2.3.7. Sekans Analizi.....	19
3. BULGULAR.....	21
3.1. İzolasyon Bulguları.....	21
3.2. Mikrobiyal Bulgular.....	21
3.3. Moleküler Bulgular.....	22
4. TARTIŞMA.....	42
5. SONUÇ.....	49
ÖZET.....	51
SUMMARY.....	52
KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEÇMİŞ.....	60
TEŞEKKÜR.....	61

SİMGELER ve KISALTMALAR

DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
dH ₂ O	Distile su
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
KNS	Koagülaz Negatif Stafilokok
MgCl ₂	Magnezyum klorür
PZR (PCR)	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rRNA	Ribozomal RNA
TBE	Tris/Borate/EDTA

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Mastermiksın hazırlanma oranları.....	18
Çizelge 2.2. PZR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı.....	19
Çizelge 3.1. Olguların Gram boyamaya göre dağılımı.....	22
Çizelge 3.2. Olguların işletmelere göre dağılımı.....	22
Çizelge 3.3. Birinci işletmeden elde edilen izolatların özellikleri.....	23
Çizelge 3.4. Birinci işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları.....	23
Çizelge 3.5. İkinci işletmeden elde edilen izolatların özellikleri.....	24
Çizelge 3.6. İkinci işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları.....	24
Çizelge 3.7. Üçüncü işletmeden elde edilen izolatların özellikleri.....	25
Çizelge 3.8. Üçüncü işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları.....	25
Çizelge 3.9. Dördüncü işletmeden elde edilen izolatların özellikleri.....	26
Çizelge 3.10. Dördüncü işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları.....	26
Çizelge 3.11. Beşinci işletmeden elde edilen izolatların özellikleri.....	27
Çizelge 3.12. Beşinci işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları.....	27
Çizelge 3.13. Altıncı işletmeden elde edilen izolatların özellikleri.....	28
Çizelge 3.14. Altıncı işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları.....	28
Çizelge 3.15. Yedinci işletmeden elde edilen izolatların özellikleri.....	29
Çizelge 3.16. Yedinci işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları.....	29
Çizelge 3.17. Sekizinci işletmeden elde edilen izolatların özellikleri.....	30
Çizelge 3.18. Sekizinci işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları.....	30

Çizelge 3.19. Dokuzuncu işletmeden elde edilen izolatların özellikleri.....	31
Çizelge 3.20. Dokuzuncu işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları.....	31
Çizelge 3.21. Onuncu işletmeden elde edilen izolatların özellikleri.....	32
Çizelge 3.22. Onuncu işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları.....	32
Çizelge 3.23. On birinci işletmeden elde edilen izolatların özellikleri.....	33
Çizelge 3.24. On birinci işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları.....	33
Çizelge 3.25. On ikinci işletmeden elde edilen izolatların özellikleri.....	34
Çizelge 3.26. On ikinci işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları.....	34
Çizelge 3.27. On üçüncü işletmeden elde edilen izolatların özellikleri.....	35
Çizelge 3.28. On üçüncü işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları.....	35
Çizelge 3.29. On dördüncü işletmeden elde edilen izolatların özellikleri.....	36
Çizelge 3.30. On dördüncü işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları.....	36
Çizelge 3.31. On beşinci işletmeden elde edilen izolatların özellikleri.....	37
Çizelge 3.32. On beşinci işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları.....	37
Çizelge 3.33. Gram pozitif izolatların işletmelere göre dağılımı.....	38
Çizelge 3.34. Gram negatif izolatların işletmelere göre dağılımı.....	39
Çizelge 3.35. 15 işletmeden elde edilen izolatların gruplandırılmış veri analizi.....	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1. Vücutta savunma ve hastalık durumunda normal flora bakterileri ile patojen bakteriler arasındaki etkileşim.....	4
Şekil 2.1. Bakterilerin 16S rRNA sekansına dayalı moleküler identifikasyonu.....	20
Şekil 3.1. Örneklerin işletmelere göre dağılımı.....	21
Şekil 3.2. 16S primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR.....	23
Şekil 3.3. 15 işletmeden toplanan izolatların yüzde grafik dağılımı.....	41

1. GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

Günümüzde insanların beslenme düzeyi kalkınmanın ölçütlerinden biri olarak kabul edilmektedir. İnsanların dengeli beslenebilmesi, et üretiminin kalite ve kantite yönünden artırılmasına bağlıdır. Bu iyileştirilmede sığır besiciliğinin önemli bir yeri bulunmaktadır (Yıldırım 2008).

Dünyada ve Türkiye’de nüfus artışına ve artan refah seviyesine paralel olarak et tüketimi de artmaktadır. Bunda fast food sektörünün hızla yayılmasının da etkisi bulunmaktadır. Sanayileşmiş ülkelerde insanlar günlük ihtiyaçlarının %29’unu (856 kalori) hayvansal ürünlerden almakta ve hayvansal protein ihtiyacının karşılanmasında sığır eti ve ürünleri ilk sırayı almaktadır (Gardner ve ark 2004). İnsan beslenmesinde önemli bir yeri olan kırmızı etin en ekonomik olarak elde edildiği hayvan ise besi danası olarak adlandırılan 6-24 aylık genç sığırlardır (Türker 1993). Ayrıca 12 aydan büyük dişi ve erkek sığırlar da kasaplık sığır olarak isimlendirilmekte ve Türkiye’de değerlendirilmektedir (Akçapınar ve Özbeyaz 1999). Tüm dünyada ve Türkiye’de sığır besiciliği gerek kapalı gerekse açık ortamlarda yaygın olarak yapılmaktadır (Türker 1993).

Son yıllarda, kırmızı etin artan oranda talep edilmesi ve buna bağlı olarak değerlendirilmesi ile hayvancılığa sağlanan desteklerle Aydın ilinde de çeşitli yatırımlar dikkat çekmektedir. Aydın ilinde yapılan açık ya da kapalı sığır besiciliğinde önemli verim kayıplarına neden olan hastalık gruplarından biri de solunum sistemi hastalıklarıdır (Anonim-1). Nazal florayı oluşturan bakterilerin tür çeşitliliği ve yoğunluğu canlılığın solunum sistemi sağlığı hakkında bilgi vermektedir (Derosa ve ark 2000). Türkiye’de bulunan sığır varlığı dünyada önemli bir yere sahip olmasına karşın verimlilik bakımından aynı ifadeleri kullanmak pek mümkün değildir. Hayvansal üretimin artırılması için hayvanların genetik kapasitesinin iyileştirilmesinin yanında, yetiştirildikleri işletmelerdeki çevresel koşulların da optimum düzeye çıkarılması önemlidir (Anonim-1).

Her çeşit hayvan türü bakterilerle sürekli temas halindedir. Bakteriler büyümeleri ve çoğalmaları için uygun besin, nem ve sıcaklığın bulunduğu habitatlarda bol miktarda bulunmaktadır. Memeli vücutları mikroorganizmaların büyümesi için elverişli ortamlar sağlamaktadır (Sorum ve Sunde 2001).

Normal bakteri florası infeksiyon etkenlerine karşı doğal bir direnç oluşturur. Özellikle ürettikleri ürünler, besinler konusundaki yarışma ve reseptörleri kaplamaları ile infeksiyonlara direnç geliştirirler. Flora bakterileri immun sistemin uyarılmasına da neden olabilirler. K ve B vitamini gibi bazı yapıları üretirler. Deride en sık *Staphylococcus epidermidis* bulunur. Kateter, protez gibi yabancı cisim varlığında glikokaliks üretimi nedeniyle önemli bir patojen konumuna gelir. Özellikle kıvrım yerlerinde *Staphylococcus aureus* ve *Candida* spp. da bulunabilir. *Propionibacterium acnes* ise derinin en önemli anaerob bakterisidir. Akne, yabancı cisim varlığında sepsis etkeni olabilir. Bağırsaklarda en sık anaeroplarda bulunur ve anaeroplarda içinde en fazla bulunanı *Bacteroides fragilis*'dir. Barsak perforasyonu sonucu gelişen abselerden öncelikle sorumludur. Aeroplarda arasında en sık *Escherichia coli* bulunmaktadır. Ağız boşluğunda baskın olarak viridans grubu streptokoklar bulunur. Ağız içi girişimlerden sonra bakteriyemi ve subakut bakteriyel endokardit oluşturabilirler. Bu bakteriler (*Staphylococcus mutans*) özellikle diş yüzeyine yapışarak diş çürüklerine neden olabilirler (Anonim-2).

1.2. Genel Flora

Sağlıklı bireylerde bireye zarar vermeden yaşayan bakteri topluluklarına “normal mikrobiyal flora” adı verilir. Vücut florası doğal direnç mekanizmalarından birisidir ve doğumla birlikte oluşmaya başlar. Normal flora üyelerinin çoğunluğu bakteriler tarafından oluşturulur ve bu bakterilerin çoğu anaerobtur. Anaerob bakterilerin çoğu hayatta kalmak için ev sahibi canlıya oksijen yönünden bağımlı kommensal bir yaşam sürdürürler (Sorum ve Sunde 2001).

Hayvan vücudu tek tip mikrobiyal yaşam formu olarak düşünülemez. Her bölge o bölgede yoğun olan ve diğer mikroorganizmaları baskılayan bakterinin yaşam şekline göre ayrılmaktadır. Deri, ağız boşluğu, gastrointestinal alan, solunum yolu ve ürogenital alan mikroorganizmalar için uygun alanlardır. Memeli organ sistemlerinde en farklı ve kompleks bakteriyel flora; deri ve sindirim sistemidir (Sorum ve Sunde 2001).

Genelde, normal flora bakterileri; 1) Hem kendilerine hem de ev sahibine (konak) faydası olan simbiyozlar, 2) Konağa hiçbir faydası olmayan kommensaller 3) Konağa zarar verebilen ve belli şartlar altında hastalık üretebilen patojenler olarak 3 e ayrılabilirler. Oportunist patojenleri; infeksiyon belirtisi olmayan bir hayvanın normal florasının bir bölümünden izole edilebilir olarak tanımlanır (Sorum ve Sunde 2001).

Mikrobiyal flora yerleşim bölgeleri; deri ve dış çevreyle çeşitli bağlantılar ile ilişkili olan yüzey, boşluk ve organların mukoz membranlarıdır. Flora üyeleri vücudun çeşitli bölgelerinde,

- Yaş
- Cinsiyet
- Hormonal değişiklikler
- Beslenme özellikleri
- Çevresel faktörler (özellikle hijyen koşulları) ile farklılık göstermektedir.

Normal mikrobiyal flora; kalıcı ve geçici flora olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.

1.2.1. Kalıcı Flora

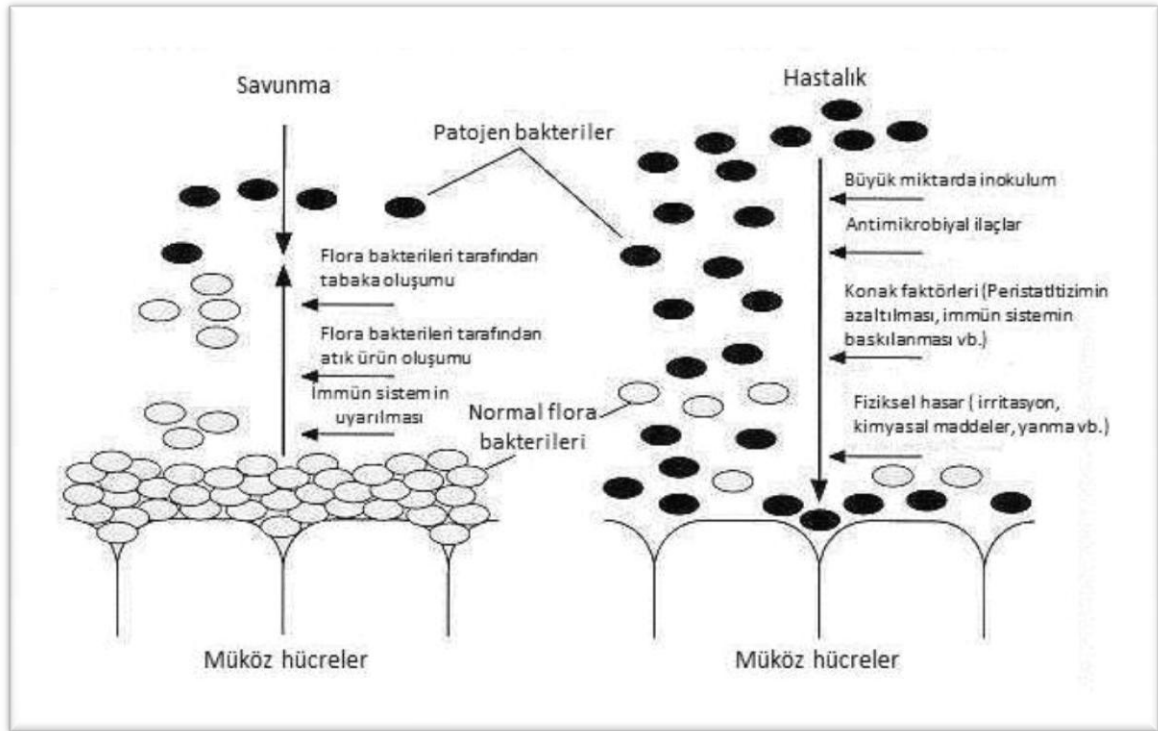
Belirli bölgelerde ve belirli yaşlarda, genellikle değişmeyen kısa süreli ortadan kaldırılsa bile yeniden oluşabilen, genellikle sabit kabul edilen, süreklilik gösteren mikroorganizma topluluğudur. Kalıcı floranın en önemli özelliklerinden biri de bozulan mikroflorayı yeniden oluşturma özelliğidir. Kalıcı floranın önemi kısaca şöyledir:

- i. K vitamini sentezini ve besinlerin absorpsiyonunu sağlar.
- ii. Normal flora bakterileri buldukları bölgede patojen bakterilerin kolonize olmasını önler (Bakteriyel interferans).
- iii. Patojen bakteriler ile besinler, yerleşim yeri, hücre yüzey reseptörleri ve diğer bağlanma yerleri için yarışır.
- iv. Bazı flora bakterileri bakteriosidin üreterek yabancı mikroorganizmaları ortamdan elimine eder (Quinn ve ark 2002).

1.2.2. Geçici Flora

Kalıcı floranın yanında çoğu hastalık oluşturmeyen, bazen patojen olabilen ve belirli vücut bölgelerinde birkaç saatten birkaç haftaya değişebilen sürelerde kalan mikroorganizma topluluğu “Geçici Flora” olarak adlandırılmaktadır.

Kalıcı flora ortadan kalktığında, geçici flora mikroorganizmaları kolonize olur, çoğalır ve hastalık yapıcı özellik kazanabilirler (Anonim-3).



Şekil 1. Vücutta savunma ve hastalık durumunda normal flora bakterileri ile patojen bakteriler arasındaki etkileşim (Sorum ve Sunde 2001).

Sağlıklı hayvanların normal flora bakterileri aslına bakılırsa insan vücudundaki floradan pek farklı değildir. Tamamıyla aynı değildir fakat birçok benzerlikleri vardır. Çiftlik hayvanları üzerinde yapılan birçok çalışmada genel flora daha çok immünoloji ve patoloji yönünden incelenmiştir (Sorum ve Sunde 2001).

Magwood ve ark (1969)'nın yapmış olduğu çalışmada sağlıklı ve pnömoniye yatkın buzağı sürülerinde nazal bakteriyel florayı incelemişler ve 12 sürüden topladıkları toplam 790 örnek üzerinde çalışmışlardır. Araştırmacılar buzağılarda nazal floranın esas (ana), tamamlayıcı ve geçici olmak üzere üç ögeye ayrılabilceğini belirtmişlerdir. Magwood ve

ark.'na göre nazal floranın ana elemanları Streptokoklar, saprofitik *Neisseria* türleri, Mikrokoklar ve potansiyel patojen olan *Pasteurella multocida* ve *Pasteurella haemolytica* türleri, tamamlayıcı flora elemanları; *Moraxella* türleri, *Diplococcus* ve *Corynebacterium* türleridir. Geçici mikroflora elemanları ise; Koliform grubu bakteriler (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus spp*) ve toprak bakterileri (*Flavobacterium*, *Chromobacterium*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* ve *Lactobacillus*) olarak belirtmiştir. Sığırlarda enzootik pnömoninin karakteristik nazal bakteriyel florayla ilişkisi olmadığını aksine genç sürülerde görülen bakteriyel pnömoni vakalarının nazal akıntıdan izole edilen *P. haemolytica* ile direk ilişkisi olduğunu belirtmişlerdir (Magwood ve ark 1969)

1.3. Nazal Flora

Solunum sisteminin kendine özgü bir florası vardır. Bu flora üst solunum yollarında yaşar (Guyton 1989). Solunum yolunun üst bölümü kalıcı ve geçici mikroorganizma florasının her ikisini içerir. Kalıcı mikroflora zarar gördüğünde ilk denge eğilimleri kendiliğinden yenilenir. Bununla birlikte, bazı fırsatçı (oportünist) patojenler eğer sahibindeki normal savunmanın önüne geçerlerse hastalığa yol açabilirler.

Sağlıklı hayvanlarda, nazofarinkste genellikle stafilokok, alfa hemolitik streptokok ve *Pasteurella* familyasından türler yerleşiktir (Sorum ve Sunde 2001).

Floranın ilk oluşum aşamasında baskın olan türler daha sonra dengelenerek asıl florayı meydana getirir. Baele ve ark (2001)'nin yapmış olduğu “Yavru domuzlarda süttten kesilmeden önce ve sonra Gram pozitif tonsiller ve nazal flora” adlı çalışmasında dört farklı çiftlikte, 20 iki haftalık ve 20 altı haftalık olmak üzere 40 yavru domuzdan örnek toplamışlardır. Sonuç olarak, nazal boşlukta süttten kesilme döneminden sonra *Lactobacillus* türlerinin düşük oranlarda görüldüğü, *Streptococcus suis* ve *Rothia nasimurium* türlerinin ise sıklıkla izole edildiği bildirilmiştir. Tonsillerde ise, *S.suis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *S. hyicus*, *S.aureus*, *Arcanobacterium pyogenes* ve *Actinomyces hyovaginalis* türlerinin süttten kesilmeden önce ve sonra yüksek oranda bulunmuştur.

Emikpe ve ark (2009) sağlıklı keçilerde nazal flora elemanlarını incelemişlerdir. Topladıkları 60 örnekten 328 bakteri izolatu elde etmişlerdir. Bu izolatlarda, en sık

Streptococcus türlerini (%15,2), ikinci sırada ise *E. coli* (%13,1) ve *S. aureus* (%11,9) türlerini elde etmişlerdir. *Mannheimia haemolytica* ve *P. multocida* türlerinin ise bulunma sıklığı sırasıyla %7,9 ve %5,5 olarak belirtmişlerdir.

M. haemolytica gibi bazı bakteriyel ajanlar sağlıklı sığırlarda nazofarinkste ve bademciklerde (Rowe ve ark 2001) bulunmasına rağmen onlar da solunum yolu enfeksiyonlarından sorumlu ana mikroorganizmalar gibi izole edilebilirler (Quinn ve ark 2002).

Hernandez-Castro ve ark (2004) Kaliforniya körfezindeki denizaslanı (*Zalophus californianus*) yavruları üzerinde yaptıkları çalışmada nazal boşluktaki aerobik bakteriyel florayı incelemişlerdir. Klinik olarak sağlıklı yavruardan alınan nazal sıvap örneklerini altı farklı körfez bölgesinden toplamışlardır. Toplam 114 örnekten elde edilen 100 bakteri izolatu mikrobiyolojik ve biyokimyasal standart testlerle identifiye edilmiştir. İzolatların %54'ü Gram pozitif olarak bulunurken %46'sı Gram negatif tespit edilmiştir. *Micrococcus* sp., *Arcanobacterium* sp., *Corynebacterium* sp., *Moraxella* sp., *Neisseria* sp., *Escherichia* sp., *Kurthia* sp., *Acinetobacter* sp., *Staphylococcus* sp., *Brevibacillus* sp., *Bacillus* sp., *Klebsiella* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Pseudomonas* sp. ve *Auromonas* sp. cinsleri izole edilirken en sık bulunan cinsler *Moraxella* sp. (%24), *Micrococcus* sp. (%18) ve *Corynebacterium* sp. (%15) olarak rapor edilmiştir. Ayrıca araştırmacı normal mikrofloranın bir bölümünün, çevresel değişikliklerde konağa karşı opportunist patojen olabilen bakterilere karşı potansiyel bir doğal koruyucu olduğunu belirtmektedir.

Ayrıca nazal ve tonsiller bakteriyel flora ile ilişkili çalışmalar sağlıklı görünen hayvanlar için rapor edilmiştir (Quinn ve ark 1994, Megra ve ark 2006). Fragkou ve ark (2007) yaptıkları çalışmada flora bakterilerinin bulunduğu bölgede hastalıklara karşı koruyucu olduğu gibi, hastalık da yapabildiği sonucuna varmışlardır. Araştırmacılar koyunlarda mastitin patogeneğinde meme kanalı bünyesindeki bakteriyel popülasyonların olası etkileri üzerine çalışmışlardır. Birçok araştırmacı genellikle evcil ve vahşi sağlıklı hayvanların pnömonik akciğerleri, burun akıntıları ve balgamları gibi klinik belirtileri üzerine çalışmışlardır (Marshall ve ark 1983, Queen ve ark 1994, Barbour ve ark 1997, Welsh ve ark 2004, Megra ve ark 2006, Katsuda ve ark 2008).

Barbour ve ark (1997) yaptığı çalışmada sağlıklı ve sağlıklı koyun (Najdi, Somali) ve sığırlarda (Holstein) solunum sistemini bakteriyel yönlerini karşılaştırmak amacıyla bakteriyel identifikasyon yapmışlardır. Üst solunum yollarında sağlıklı sığırlarda yüksek sıklıkta *P.haemolytica*, *Actinomyces* sp., ve *Pseudomonas aeruginosa* türleri, sağlıklı koyunlarda ise *Moraxella* sp., *Pseudomonas pseudomallei*, *Erysipelothrix* sp., *P.multocida* türleri izole edilmiştir. Akciğerlerden ise sağlıklı olan her iki hayvan türünde de *A. pyogenes*, *Erysipelothrix* sp., *P. haemolytica*, *Pasteurella ureae*, *S. aureus* ve *S. epidermidis* türlerinin incelenen hayvanlarda solunum sistemi hastalıklarına sebep olan riskli grup olarak belirtmişlerdir. Ayrıca sitolojik, biyokimyasal ve koloni morfolojisi açısından incelenen *P. multocida* ve *P. haemolytica* türlerinin sağlıklı hayvanlarda sağlıklı hayvanlara kıyasla daha farklı olduğu ($p < 0.05$) tespit edilmiştir. Sağlıklı hayvanlardan izole edilen *P. haemolytica* türlerinin hepsi biyotip-A bulunurken sağlıklı hayvanlardan izole edilen *P.haemolytica* türlerinin %88'i biyotip-A %12'si biyotip-T olarak bulunmuştur.

Solunum sisteminin ilk basamağı olan nazal mukozada, bakterilerin türü ve yoğunluğu hayvanın solunum sistemi sağlığı açısından bilgi vermektedir. Derosa ve ark (2000)'nin yaptıkları "Solunum hastalıkları klinik belirtileri olan sığırlardan aynı anda alınan nazal ve transtrakeal sıvap örnekleriyle *Pasteurella* türlerinin karşılaştırılması" adlı çalışmada her iki örnekte de benzer olan izolatların ribotiplendirme analizi ve antibiyotik duyarlılık testleri yapılmıştır. Her eşleştirme biyokimyasal ve serolojik olarak karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak 24 izolatta *P. haemolytica*, 3 izolatta da *P. multocida* eşleştirmesi bulunmuştur. Nazal sıvap izolatları genetik olarak %70 oranında transtrakeal izolatlarla benzerlik gösterdiği bildirilmiştir. Sonuç olarak buzağuların %70'inde akciğerlerde hastalık yapan patojenin nazal sıvap kültürlerinden elde edilen patojen bakterilerle genetik olarak aynı bakteri olduğu bildirilmiştir.

Solunum sistemi hastalıklarında birçok bakteriyel ajanın pek çok etkisinden dolayı primer etiyolojik ajanı saptamak kolay değildir. Bu hal genellikle solunum sisteminde multiple (çok yönlü) bakteriyel enfeksiyonlarla sonuçlanır (Quinn ve ark 2002).

Bailie ve ark (1978) hayvan ısırığı yaralarıyla ilişkili aerobik bakteri sıklığı prevalansını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada 50 adet köpekten nazal ve oral vücut sıvısı örnekleri toplamışlardır. En yüksek oranda izole ettikleri mikroorganizmalar IIj, EF-

4, *P. multocida*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, Grup-D Streptokokları, *Cornybacterium sp.*, Enterobakterler, *Neisseria sp.*, *Moraxella sp.* ve *Bacillus sp.* türlerini içermektedir. Seyrek olarak elde edilen diğer türlerin ise geçici flora bakterileri olabileceği düşünülmüştür. Yüksek oranda bulunan ve insanlarda patojen bakteriler olarak bilinen IIj, EF-4, *P. multocida* ve *S. aureus* türlerinin yaralarda kontamineden sorumlu olabileceğini belirtmişlerdir.

1.4. Solunum Sistemi

Kanın görevlerini tam olarak yapabilmesi, oksijenin atmosferden alınması ve metabolizma sonucu oluşan atık gazların çevreye verilmesi için çok hücreli canlılarda solunum sistemi gelişmiştir. Solunum olayında iki görev vardır: Dış çevre ile kan arasında gaz alışverişi dış solunum, kan ile dokular arasındaki gaz alışverişi ise dış solunum olarak isimlendirilir. Solunum tam olarak gerçekleştiğinde kan gazları bir taraftan diğer taraf aktarılır. Yaşamın devamı için bu olayların kesintiye uğramadan başarılması solunum sisteminin önemini göstermektedir (Yaman 1996).

Solunum organları, burun, burun boşluğu, yutak (farenks), gırtlak (larenks), nefes borusu (trachea), bronşlar, bronşoller ve alveollerden oluşmuştur. Üst solunum yolu havanın rahatça giriş-çıkışına elverişlidir. Solunum sisteminin alt bölümü ise kan aracılığı ile gaz alışverişi yapılan yerdir. Üst solunum yolu ile üst sindirim yolu arasında sıkı bir ilişki vardır. Her iki sistem de farenksi ortak yol olarak kullanır. Üst solunum yolları ağız, burun, burun boşluğu, farenks ve larenksle ile başlar. Larenks üst solunum sistemini alt solunum sisteminden ayıran bir kapak görevi yapar. Alt solunum yolu trachea (nefes borusu), bronş, bronşiol ve alveollerden oluşan akciğer sistemini kapsar. Akciğerler göğüs boşluğunu dolduran, göğüs kafesi içinde yer alan, çift olan organlardır. Çevreden havayı getirip, kanın akışına ters olarak hareket ettirip gaz alışverişini sağlarlar (Yaman 1996). Solunum sistemi temelde vücudun oksijen gereksinimini sağlar. Oksijenin vücut dokularında kullanımını takiben oluşan karbondioksit de yine solunum sistemi tarafından vücut dışına çıkarılır. Bu işlemler sırasında solunum sistemi vücut ısısını da düzenler, asit baz dengesini sağlar, kan basıncını dengeler. Bronş, bronşiol ve akciğerler normal koşullarda sterildir (Guyton 1989).

Solunum sırasında solunum yollarına giren toz, virüs, bakteri gibi yabancı maddeler üst solunum yollarındaki mukus tarafından tutularak, bunların akciğerlere inmesi önlenir. Yine üst solunum yollarındaki tüycüklü (mukosilier) yapı sayesinde bu yabancı maddeler ağız boşluğuna itilir ve öksürük ya da yutma yoluyla etkisiz hale getirilirler. Akciğerlerdeki alveollere kadar inebilen küçük yabancı cisimler de, buradaki makrofajlar tarafından imha edilir. (Guyton 1989).

Sığırlarda akciğerler vücut ağırlığına göre oldukça küçük olduğundan, solunum sistemindeki çeşitli bozukluklar, yukarıdaki işlevlerin aksamasına neden olmaktadır. Akciğerlerin ödem ya da enfeksiyon gibi nedenlerle yeterince çalışmaması, hava giriş ve çıkışının solunum yolu tümörleri, bronşit gibi nedenlerle güçleşmesi gibi nedenler solunum sisteminin yeterince çalışmasını engellediğinden, bu özellikle besi sığırlarında besi performansını önemli ölçüde etkilemektedir. Sığırlarda solunum yolu enfeksiyonlarına yol açan mikroorganizmalar, genelde üst solunum yollarında yaşayıp, stres koşullarında alt solunum yollarına inen mikroorganizmalardır. Sağlıklı hayvanlarda alt solunum yollarında mikroorganizmalar solunum sisteminin savunma mekanizmasıyla yok edilirler. Bu olayda solunum sisteminin mukosilier yapısı, alveoler makrofajlar ve öksürük, aksırık gibi mekanik işlemler rol oynar (Anonim-4).

1.5. Solunum Sistemi Hastalıkları

Solunum sistemi hastalıkları ruminantların en önemli sağlık problemlerinden birisidir ve sığır endüstrisinde büyük bir ekonomik etkisi vardır (Arcangioli ve ark 2008). Nedeni çok faktörlüdür ve hastalık enfeksiyonlu mikroorganizma etkileşimleri ve çevre, stres gibi faktörlerden ortaya çıkar (Hartel 2004). Viral patojenler genellikle bu olayda rol oynar ve buzağılarda birincil solunum hastalığına ve hafif solunum zorluğuna sebep olabilir (Baule 2001, Callan ve Garry 2002). *M. haemolytica*, *P. multocida*, *Histophilus somni*, *Arcanobacterium pyogenes* ya da *Mollicutes* cinsinden *Mycoplasma dispar* ve *Mycoplasma bovis* genellikle eşzamanlı virüs enfeksiyonuyla ilişkilendirilir (Arcangioli ve ark 2008). Birçok çalışma büyükbaş hayvan solunum yolu hastalığında hem viral hem bakteriyel enfeksiyonların artışında virüslerin sinerjik bir rol oynadığını göstermiştir (Farshid 2002).

M. bovis sağlıklı sığırların üst ve alt solunum yolunun ortak bir elemanıdır. Bu *Mycoplasma* türleri buzağılardaki solunum hastalığının şiddetini artırır ve hatta birincil patojen olarak rol oynayabilir (Gagea 2006). Avrupa'da *M. bovis* buzağı zatüresinin salgınlarının %25 ile %33 oranında sorumlusu olduğu düşünülmektedir (Nicholas ve ark 2002).

Enfekte olmuş sığırlarda *Mycoplasma* sp. solunum yolu vasıtasıyla yıllarca enfeksiyonun rezervuarları olarak kalabilmektedir. Hayvanlar solunum yolu, meme kanalı ya da genital yolla enfekte olurlar, enfeksiyonlu spermle suni tohumlama da enfeksiyonun yayılmasına sebep olan başka bir yöntemdir (Nicholas ve Ayling 2003).

M. bovis kaynaklı büyükbaş hayvan solunum hastalığı, dünya genelinde sığırların en önemli sağlık problemlerindedir. Bu hastalık sığır sürüleri üzerinde önemli mali kayıplara sebep olur ve sığır ölümlerinin en yaygın nedenidir.

Sığırlarda görülen solunum sistemi hastalıkları, Veteriner Hekimlikte bilinen karmaşık patogeneze sahip hastalıkların başında yer almakta ve sığır yetiştiriciliğinde önemli kayıplara neden olmaktadır. Besi sığırlarındaki ekonomik kayıpların başlıca sebebi *Pasteurella* pnömonisidir (Batmaz 2006). Örneğin, Kolorado'da yapılan bir çalışmada besi sığırlarında yıllık olarak görülen hastalıkların %48'ini *Pasteurella* pnömonisinin oluşturduğu belirlenmiş, hastalıklardan kaynaklanan ekonomik kaybın %46'sını besi sığırlarında alt solunum yolu hastalıklarının oluşturduğu bulunmuştur (Rodostits ve ark 1994).

Memelilerde solunum sistemi hastalıklarına yol açan bakterilere bakıldığında, hastalık etmeni olan bakteri cinsi veya türü farklılık gösterebilmektedir. Madec ve arkadaşlarının domuzların solunum sistemindeki bakteriyel florayı incelemek amacıyla yaptığı bir çalışmada *Streptococcus suis* kaynaklı septisemiye uğramış 20 kısırlaştırılmış domuz sürüsünden farklı şekillerde örnekler toplanmıştır (nazal sıvı örnekleri, akciğer ve tonsiller otopsi örnekleri). Domuzların solunum organlarından toplanan bu numunelerden *P. multocida*, *H. pleuropneumoniae*, *S. suis* ve *Mycoplasma hyopneumonia* bakterileri izole edilmiştir. Fakat bu bakterilerin bulunma sıklığına bakılarak sürünün sağlık durumuna ilişkin kesin bir sonuca varılamamıştır. Ayrıca *Bordetella bronchiseptica* ve

özellikle *Haemophilus paraisus* türlerinin de sık izole edildiğini belirtmişlerdir (Madec ve ark 1986).

Sığır pnömonilerinin yayılışı genel olarak ülkeler ve bölgeler arasında farklılık göstermektedir. Bu farklılıklar coğrafi koşullar, iklim şartları, sığırların yaşı, cinsiyeti, ırkı, direnci, beslenme özelliği ve ortam şartlarının hijyen açısından durumu ile ilişkilidir. Ekonomik kayıpların hesaplanmasında yalnız ölümler değil, hastalık sırasında kullanılan sağıltım giderleri, kilo kaybı, aşılama, koruyucu antibiyotik kullanımı, çiftlik yönetimi, bakım değişikliği maliyetleri göz önünde bulundurulması gereken kriterlerdir (Rodostits ve ark 1994, Ames ve ark 2002).

1.6. Moleküler İdentifikasyon

Moleküler tanısal yöntemler, geleneksel yöntemler kullanarak identifikasyon yapılması zor veya imkânsız olan infeksiyöz etkenlerin tanımlanmasında en değerli yöntemler olarak kabul edilmektedirler. İnfeksiyöz hastalıkların moleküler tanısı çoğunlukla nükleik asit odaklıdır (Mehndiratta ve ark 2009).

Bakteri ribozomlarının 30S ve 50S alt birimlerinden elde edilen 5S ve 16S rRNA'ların baz dizileri çalışmalarda çok yaygın olarak kullanılmaktadır. rRNA'lar bütün mikroorganizmalarda bulunurlar ve mikroorganizma evrimi ile ilişkilerini araştırmada idealdirler. Bütün ribozomlardaki işlevleri aynıdır; sabit ve kritik rolleri nedeni ile de yapıları zaman boyunca çok az değişir. Ana filogenetik grupların çoğunda 16S rRNA bir veya daha çok karakteristik nükleotid dizilerine sahiptir; bunlara “oligonükleotid imzaları” denir (Anonim-5).

16S rRNA gen sekansı 1980'li yıllardan beri bakterilerin sınıflandırılmasında ve genotipik analizleri için önemli bir araç olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin kullanılmasıyla pek çok yeni cins ve tür ayrılmıştır. rRNA mutasyonlardan en az etkilenen genetik materyaldir. Bu amaçla araştırılan 16S rRNA, rRNA 30S alt ünitesinde yer alan bir dizidir. Özellikle kültürde üretilmemiş veya klasik yöntemlerle zor identifiye edilebilen bakterilerin identifikasyonu için 16S rRNA hedef dizidir. 16S rRNA'nın birkaç bölgesi tüm bakterilerde çok iyi korunmuştur. Bu korunmuş bölgelerden seçilen primerler tüm bakterilerde 16S rRNA amplifikasyonunu sağlar ve bunlara universal 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 (Rantakokko-Jalava ve ark 2000, Woo ve ark 2001, Küçüker ve ark 2002).

Bakterilerin 16S rRNA sekansına dayalı moleküler identifikasyonu veteriner klinik sahada karşılaşılan bakterilerin tanımlanmasında da kullanılmaya başlanmıştır (Chai ve ark 2003). Veteriner rutin teşhis laboratuvarlarında tür düzeyinde identifikasyonları zor ve zaman alıcı olan etkenlerin belirlenmesinde özellikle bu yöntem tercih edilmektedir

Şu anki bilgilerimize göre yöremizde sağlıklı sığırların nazal boşluk bakteriyel florasının belirlendiği bir çalışma bulunmamaktadır. 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.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. İzolasyon Örnekleri

Bu çalışmada Aydın ilinde, 2011/Kasım – 2012/Ocak tarihleri arasında 15 sığır işletmesinden (her sürüden 5-14 örnek), son üç ayda antibiyotik tedavisi almamış, 3-9 yaş arasındaki sığırlardan, klinik muayeneleri Uzm. Vet. Hekim Seyhan Kaynarca tarafından yapıldıktan sonra, klinik olarak sağlıklı olarak belirlenen 56 inek alınan burun sıvı örnekleri kullanılmıştır.

2.1.2. Kullanılan Besiyerleri ve Solüsyonlar

2.1.2.1. Besiyerleri

2.1.2.1.1. Blood Agar (Kanlı Agar)

Blood agar base (Merck 1.10886)..... 40 g
Distile su..... 1000 ml

Kanlı agar (jeloz); genel kullanım besiyeri olarak kullanılan besleyici bir besiyeridir. 40 gram toz agar dH₂O içerisinde 5-10 dakika çalkalanarak eritilmiş, pH'ı 7,3'e sabitlenmiş ve tamamen çözülme sağlanıncaya kadar kaynatılıp, otoklav ile 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Daha sonra, hazırlanılan erimiş besiyeri 42°C'ye soğutulmuş ve üzerine 50 mL defibrine koyun kanı eklenip karıştırılarak homojenizasyon sağlandıktan sonra, 12 cm çapındaki petri kutularına 15 ml dökülüp, kullanılıncaya kadar buzdolabında +4°C'de saklanmıştır. Besiyerleri, kullanılmadan önce üreme kontrolleri yapılmıştır (Mutter ve ark 1989).

2.1.2.1.2. Mannitol Salt Phenol Red Agar (MSA)

Mannitol salt agar (Merck 1,05404)..... 108 g
Distile su..... 1000 ml

Besiyerinin pH'sı 7,2-7,4'e ayarlanarak otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra 50 °C'ye kadar soğutulup petrilere dökülmüştür. Petriler kullanılıncaya kadar buzdolabında +4°C'de saklanmıştır.

2.1.2.1.3. MacConkey Agar

Mac Conkey agar (Oxoid CM 115).....50 g
Distile su..... 1000 ml

Karışımın pH'ı 7,2'ye ayarlanıp, 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildikten sonra, 50°C'ye soğutulmuş ve 12 cm çapındaki petrilere dökülmüştür. Petriler kullanılıncaya kadar buzdolabında +4°C'de saklanmıştır.

2.1.2.2. Solüsyonlar

2.1.2.2.1. EDTA (0,5 M)

Disodium EDTA-2H₂O..... 186,1 g

EDTA 800 ml distile suda manyetik karıştırıcıda çalkalanarak eritilip, NaOH ile pH 8,0'e ayarlandıktan sonra 1000 ml'ye tamamlanıp 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

2.1.2.2.2. TBE Buffer (pH:8.0)

10X TBE Stok Solusyonu

Tris Base..... 121,1 g
Borik Asit..... 61,83 g
EDTA.....5,84 g

Distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 15 dk otoklavda steril edilip, pH 8,0'e ayarlanarak buzdolabında saklanmıştır.

0,5X TBE Kullanma Solüsyonu

10X TBE.....50 ml
Distile su..... 950 ml

Karıştırılarak solüsyon hazırlanmıştır.

2.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PZR)

2.1.3.1. Kullanılan Cihazlar

PZR için Eppendorf MasterCycler gradient, 96 örnek kapasiteli termal döngüleme cihazı kullanılmıştır.

2.1.3.2. Primerler

16S rRNA genini çoğaltmak için universal primerler olan S16S20 (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') ve 16S1390 (5' GAC GGG CGG TGT GTA CAA 3') kullanılmıştır (Sghir ve ark 1998, Suau ve ark 1999).

2.1.3.3. MgCl₂, Taq DNA Polymerase, 10X Taq Buffer, dNTP Set

Sigma marka 25 mM MgCl₂, Taq DNA polimeraz (5U), 10X Taq Buffer (100 mM (Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl), fermentas marka 100mM dNTP set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) kullanılmıştır.

2.1.4. Elektroforez

2.1.4.1. Etidyum Bromür

Elektroforez işleminden sonra jelin boyanması amacıyla % 1' lik etidyum bromür (Sigma)500 ml 0,5X TBE içerisine 100 µl miktarında eklenerek kullanılmıştır.

2.1.4.2. Marker

Marker olarak *PstI* enzimi ile kesilmiş lambda faj DNA'sı (Fermentas) kullanılmıştır.

PstI Enzimi ile Kesilmiş Lambda Faj DNA'sının Hazırlanışı:

30 µl λ DNA (Fermentas)

30 µl 10X Buffer

4 µl *PstI* enzimi (Fermentas)

236 µl enjeksiyonluk distile su

Bir saat 37 °C'de bekledikten sonra 30 µl loading dye eklendi. Her elektroforez reaksiyonu için 7 µl kullanılmıştır (Anderesson 2009).

2.1.4.3. Elektroforez İçin Kullanılan Gereçler

6X Loading Dye solusyonu,

PZR ürünü (DNA),

3 µl DNA ladder,

1 gr agaroz,

Agaroz jel ve elektroforez tankında yürütme yapmak için; 100 ml TBE ve 500 ml (Tris-Borik Asit-EDTA) buffer kullanılmıştır.

2.1.4.4. Agarose Jel Hazırlanışı (%1'lik)

Agaroz Jel:

Agarose (Sigma)..... 1 g

TBE (0,5x)..... 100 ml

Buffer, şişe içerisindeki agarozun üzerine ilave edilerek, karıştırılmış ve sonra mikrodalga fırında yaklaşık 3–5 dk. kaynatılan karışım, 40–50°C'ye kadar soğutulmuştur. Halen sıvı halde olan karışım, jel kalıbının içerisine yavaşça, kabarcık bırakmayacak şekilde dökülmüş ve içerisine yükleme kuyucuklarını oluşturacak olan taraklar yerleştirilerek, 15–20 dakika oda ısısında soğumaya bırakılmıştır. Soğutulan jel, kalıptan çıkarılarak, elektroforez tankına dikkatlice yerleştirilmiştir.

2.1.4.5. Elektroforez Cihazı

Elektroforez işlemi Thermo marka, 80 kuyucuk kapasiteli elektroforez tankında, görüntüleme işlemi Vilber Lourmat marka görüntüleme cihazında gerçekleştirilmiştir

2.1.5. Kullanılan Diğer Gereçler

Steril eküvyon, bek alevi, iğne öze, tek kullanımlık plastik steril öze, Gram boyama seti (kristal viyole, lügol, denatüre alkol, sulandırılmış fuksin), hassas terazi, etüv, mikroskop, 2 ve 0,2 ml.'lik steril tek kullanımlık kapaklı ependorf tüpleri, pipet ve pipet uçları, soğutucu, dondurucu, steril pudrasız tek kullanımlık eldiven.

2.2. Yöntem

2.2.1. Burun Sıvap Örneklerinin Alınması

Sürüntüler her iki taraf burun konkasının ön 1/3'lük kısmından serum fizyolojikle ıslatılmış steril pamuk eküvyonlarla sağa ve sola birkaç kez çevirmek suretiyle uzman Vet. Hek. Seyhan Kaynarca tarafından alınarak Stuart Transport Medium'a konulmuştur. Alınan tüm örnekler soğuk zincir altında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına aynı gün getirilip izolasyon çalışmalarına başlanılmıştır. İncelemesi yapılan tüm materyallerinin izni alınarak temini sağlanmıştır.

2.2.2. İzolatların Hazırlanması

Usulüne uygun olarak alınan burun sıvap örneklerinin, ekimleri ve identifikasyonları, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır. Sözü edilen örnekler laboratuvara getirildikten sonra besi yerlerine (%7 koyun kanlı agar, mannitol salt agar ve MacConkey agar) ekilip 37°C'de 24-48 saat inkube edilmiştir. Daha sonra üreyen mikroorganizmaların makroskopik olarak koloni morfolojileri, pigment ve hemoliz özellikleri; mikroskopik olarak Gram boyanma özellikleri incelenmiş ve kaydedilmiştir. İzolatlar moleküler çalışmalar için -20°C'de saklanmıştır.

2.2.3. Moleküler İdentifikasyon

Sekans analizine gönderilecek olan suşların 16S rRNA genleri universal primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılmış; PZR için öncelikle izole edilen suşlardan kromozomal DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir.

2.2.3.1.DNA Ekstarksiyonu

İzolatların total DNA ekstraksiyonu ticari genomik DNA ekstraksiyon kiti (InstaGene Matrix, Katalog No: 732-6030, BIO-RAD, München, Germany) kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir.

Bir öze dolusu bakteri kültürü 1 ml steril bir ependorf tüp içerisinde steril distile su ile süspanse edildi. Müteakiben 12.000 rpm.de 1 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant atıldı. Pelet üzerine matrix (InstaGene)'den 200 µl ilave edilerek 56°C'de yarım saat inkübe edildi. Yüksek hızda 10 sn vortekslendi. Tüpler benmaride 100°C'de 8 dk inkübe edildi. Yüksek hızda 10 sn vortekslendikten sonra 12.000 rpm.de 3 dk santrifüj yapıldı. Testte 30 µl'lik bir PCR reaksiyonu için 2 µl süpernatant kullanıldı.

2.2.3.2. Master Mikslerin Hazırlanması

Herbir PZR amplifikasyonu 30 µl toplam hacimde, 2 µl hedef DNA, 0,2 mM deoksinükleotid trifosfat (dNTP), 2 mM magnesium klorür (MgCl₂) , 0,4 pmol primer (her biri için), ve 3 µl 10X Taq enzimi tampon çözeltisi, 1,5 U Taq DNA polymerase kullanılmıştır. Kullanılan malzemeler ve volümler aşağıdaki Çizelge 2.1.'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.1. Mastermiksin hazırlanma oranları

Malzeme (Ticari)	İstenen Volüm	Kullanılacak Son Volüm
Buffer (10X)	1 X	300 µl
MgCl ₂ (25mM)	2 mM	240 µl
dNTP (10mM)	0,2 mM	60 µl
Primer - F (100 pMol)	0,4 pMol	12 µl
Primer - R (100 pMol)	0,4 pMol	12 µl
Taq Polimeraz	0,3 µl / 50 µl	18 µl
dH ₂ O	Son Volüme Tamamlanır	2358 µl
TOPLAM	-	3000 µl

*Tüpteki son volüm 30µl olması gerektiğinden ve 100 örnek hazırlamak için: 30 X 100 = 3000 µl olmalıdır. Ancak bir ependorf tüpü, en fazla 1500 µl alabildiği için; volümler 1500'er µl olarak, 2 defa hazırlanmıştır.

2.2.3.3 16S rRNA Geninin PZR ile Çoğaltılması

Mastermiks hazırlandıktan sonra ardından 0,2 mL'lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine 28'er µl hazırlanan mastermiksten ilave edilmiştir. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA'dan 2'şer µl alınıp, ilgili tüplerin içerisine eklenmiş ve ağızları sıkıca kapatılmıştır. Hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme cihazlarına yüklenip, programlanmıştır. Program 94°C'da 10 dakikalık denatürasyonu takiben 35 siklus 94°C 1 dakika, 50°C 1 dakika ve 72°C 1 dakikada tamamlandıktan sonra, 72°C'de 5 dakika ile sona erdirilmiştir (Çizelge 2. 2.).

Çizelge 2.2. PZR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	94°C	10 dk.
Denatürasyon	35	94°C	1 dk.
Bağlanma	35	50°C	1 dk.
Uzama	35	72°C	1 dk.
Son Uzama	1	72°C	5 dk.

2.2.3.4. Örneklerin Yüklenmesi

Elektroforez boyasından pipetin ucuna 2 µl kadar alınıp, daha sonra elde edilen PZR ürünleriyle karıştırılmıştır. Oluşturulan karışımdan 8 µl alınarak, jeldeki uygun pozisyondaki kuyucuğa yüklenmiştir.

2.2.3.5. Yürütme

Hazırlanmış olan jele, istenilen örnekler ve markerların yüklemesi yapıldıktan sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonlara bağlanarak, 100 voltluk akımda 30 dakika yürütülmüştür.

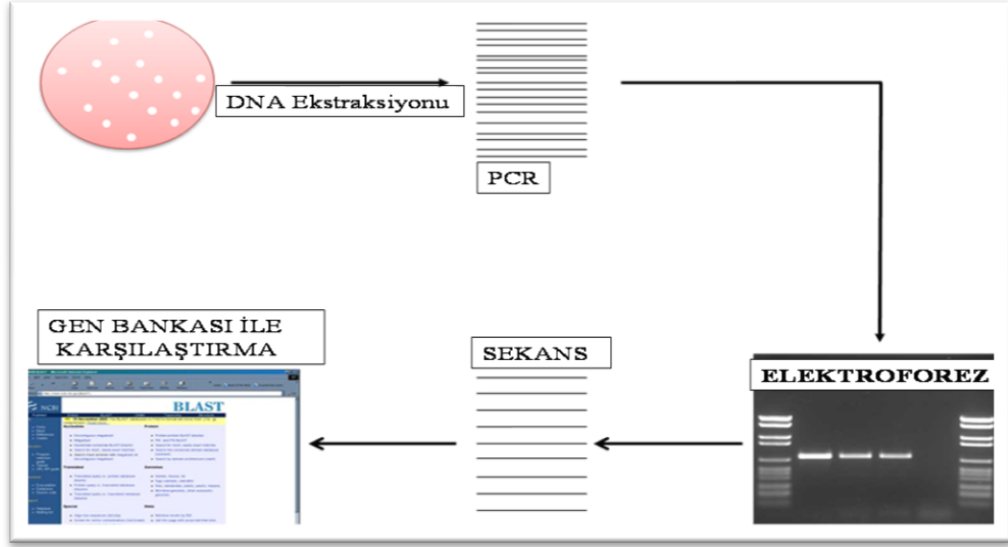
2.2.3.6. Görüntüleme

Otuz dakikalık elektroforez zamanının ardından elde edilen jel, dikkatli bir şekilde etidyum bromürde 15 dakika boyanmaya yatırılmıştır. Süre sonunda boyanan jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki odacığa yerleştirilerek, UV ışığı altında fotoğraflanıp, değerlendirilmiş ve 16S üniversal primerleri kullanılarak yapılan PZR'da 1371 bp uzunluğunda bant görülmüştür.

2.2.3.7. Sekansın Analizi

Elde edilen ampikonlar sekans analizleri için 96 kuyucuklu pleyt içerisinde MacroGen (MacroGen Inc.,1001 World Meridian Venture Center, #60-24, Gasan-dong, Geumchun-gu, Seoul, 153-781, Korea) firmasına gönderilmiştir. Firma saflaştırmayı takiben ABI Primse cihazı ile sekans analizini gerçekleştirmiştir. Elde edilen sekanslar gen bankası ile karşılaştırılmıştır. Bu amaçla National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanılmıştır. Bakterilerin 16S rRNS sekansına dayalı moleküler identifikasyonunda yapılan tüm işlemler aşağıda şematize edilmiştir. Sekans analizi sonucunda izole edilen

suşların tür düzeyinde identifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Bakterilerin 16S rRNA sekansına dayalı moleküler identifikasyonunun yapılışı Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.

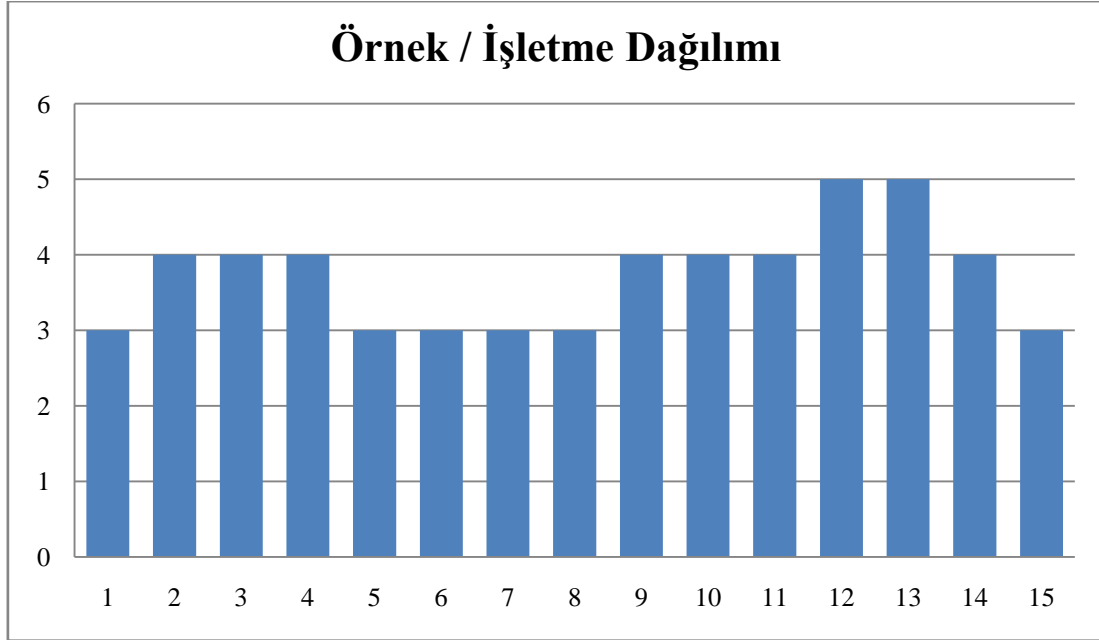


Şekil 2.1. Bakterilerin 16S rRNA sekansına dayalı moleküler identifikasyonu.

3. BULGULAR

3.1. İzolasyon Bulguları

Çalışmada Aydın ilinde, 2011/Kasım - 2012/Ocak tarihleri arasında 15 sığır işletmesinden (her sürüden 5-14 örnek), son üç ayda antibiyotik tedavisi almamış, 3-9 yaş arasındaki, sağlıklı 56 inekten alınan burun sıvı örneklerinin incelenmesi sonucunda 192 izolat elde edilmiştir. Örneklerin işletmelere göre dağılımı aşağıdaki grafikte gösterilmektedir.



Şekil 3.1: Örneklerin işletmelere göre dağılımı.

3.2. Mikrobiyal Bulgular

Nazal mukozanın bakteriyel mikroflorası incelenerek, Aydın yöresindeki sığırlarda nazal florayı oluşturan bakterilerin belirlenmesi amacıyla 15 sığır işletmesinden alınan örneklerden izole edilen toplam 192 suş makroskopik olarak koloni morfolojileri, pigment ve hemoliz özellikleri; mikroskopik olarak Gram boyanma özellikleri incelenmiştir. Buna göre elde edilen veriler şunlardır;

Çizelge 3.1: Olguların Gram boyamaya göre dağılımı

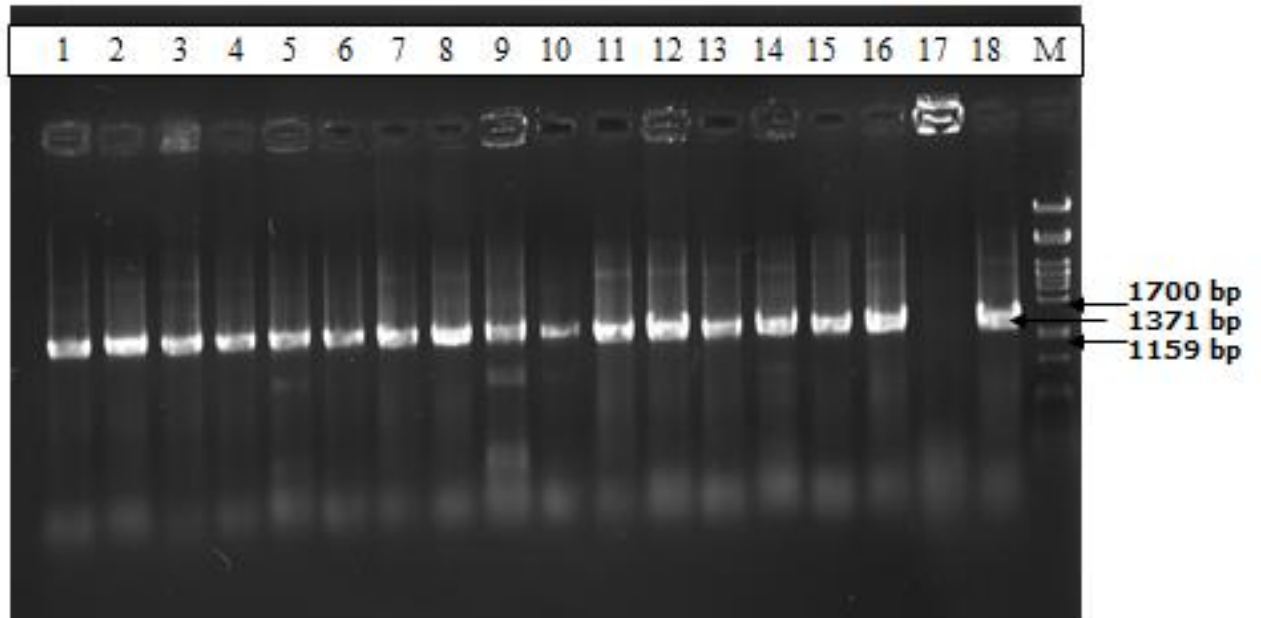
Bakteriler	N (izolat sayısı)	Oran (%)
Gram pozitif	143	74,5
Gram negatif	49	25,5
TOPLAM	192	100

Çizelge3.2: Olguların işletmelere göre dağılımı

Bakteriler	İşletme No														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Gram pozitif	9	12	10	13	9	9	11	10	10	9	7	12	4	10	8
Gram negatif	4	1	4	-	3	4	3	3	2	3	5	2	9	2	4
TOPLAM	13	13	14	13	12	13	14	13	12	12	12	14	13	12	12

3.3. Moleküler Bulgular

Aydın ve çevresindeki işletmelerden toplanan nazal sıvı örneklerinden izole edilen 192 izolatın her biri için DNA ekstraksiyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Elektroforez işlemleri yapıp, görüntülenmiştir. 16S üniversal primerleri kullanılarak yapılan PZR'da 1371 bp uzunluğunda bant görülmüştür (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: 16S primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR.

1-16: İzolatlar **17:** Negatif Kontrol, **18:** Pozitif Kontrol, **M:** PstI enzimi ile kesilmiş lambda faj DNA'sı

Çizelge 3.3: Birinci işletmeden elde edilen izolatların özellikleri

İzolat No	1.Nolu İşletme			
	Koloni morfolojisi	Pigmentasyon	Hemoliz	Gram Boyanma
NF1	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF2	Orta büyüklükte, düzgün	Gri	(+)	(-)
NF3	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF4	Orta büyüklükte, mukoit, kokulu	Beyaz	(-)	(-)
NF5	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF6	Orta büyüklükte, parlak	Kırmızı	(+)	(-)
NF7	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF8	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF9	Küçük, düzgün, yuvarlak	Beyaz	(+)	(+)
NF10	Orta büyüklükte, parlak, yuvarlak	Beyaz	(+)	(+)
NF11	Orta büyüklükte, parlak, yuvarlak	Beyaz	(+)	(+)
NF12	Orta büyüklükte, mukoit, kokulu	Beyaz	(-)	(-)
NF13	Orta büyüklükte, parlak, yuvarlak	Beyaz	(+)	(+)

NF: Nazal flora

Çizelge 3.4: Birinci işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları

Bakteri Türü	1.Nolu İşletme		
	İzolat Sayısı (n)	İzolat Oranı (%)	İzolat No
Gram-pozitif	9	69,2	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5	38,5	NF1-NF3-NF5-NF7-NF8
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	23	NF10-NF11-NF13
<i>Staphylococcus hominis</i>	1	7,7	NF9
Gram-negatif	4	30,8	
<i>Pasteurella multocida</i>	2	15,4	NF4-NF12
<i>Mannheimia haemolytica</i>	1	7,7	NF2
<i>Serratia rubidaea</i>	1	7,7	NF6

Çizelge 3.5: İkinci işletmeden elde edilen izolatların özellikleri

İzolat No	2.Nolu İşletme			
	Koloni morfolojisi	Pigmentasyon	Hemoliz	Gram Boyanma
NF14	Küçük, düzgün, yuvarlak	Beyaz	(+)	(+)
NF15	Küçük, yuvarlak	Beyaz	(-)	(+)
NF16	Orta büyüklükte, düzgün	Gri	(+)	(-)
NF17	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF18	Opak, bombeli, yuvarlak	Sarı	(-)	(+)
NF19	Opak, bombeli, yuvarlak	Sarı	(-)	(+)
NF20	Düzgün, yuvarlak, orta büyüklükte	Beyaz	(+)	(+)
NF21	Düzgün, yuvarlak, orta büyüklükte	Beyaz	(+)	(+)
NF22	Küçük, yuvarlak, kuru	Şeffaf	(+)	(+)
NF23	Düzgün, yuvarlak, orta büyüklükte	Beyaz	(+)	(+)
NF24	Küçük, yuvarlak	Beyaz	(-)	(+)
NF25	Düzgün, yuvarlak, orta büyüklükte	Beyaz	(+)	(+)
NF26	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)

Çizelge 3.6: İkinci işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları

Bakteri Türü	2.Nolu İşletme		İzolat No
	İzolat Sayısı (n)	İzolat Oranı (%)	
Gram-pozitif	12	92,3	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	15,4	NF17-NF26
<i>Staphylococcus hominis</i>	1	7,7	NF14
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	2	15,4	NF18-NF19
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	1	7,7	NF21
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	7,7	NF22
<i>Corynebacterium flavescens</i>	2	15,4	NF15-NF24
<i>Staphylococcus croceolyticus</i>	1	7,7	NF25
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2	15,4	NF20-NF23
Gram-negatif	1	7,7	
<i>Mannheimia haemolytica</i>	1	7,7	NF16

Çizelge 3.7: Üçüncü işletmeden elde edilen izolatların özellikleri

3.Nolu İşletme				
İzolat No	Koloni morfolojisi	Pigmentasyon	Hemoliz	Gram Boyanma
NF27	Küçük, düzgün, yuvarlak	Beyaz	(+)	(+)
NF28	Küçük, düzgün, yuvarlak	Beyaz	(+)	(+)
NF29	Küçük, yuvarlak, dalgalı	Şeffaf	(+)	(+)
NF30	Küçük, yuvarlak	Sarı	(-)	(-)
NF31	Küçük, düzgün, yuvarlak	Beyaz	(+)	(+)
NF32	Yuvarlak, parlak, dışbükey	Sarı	(-)	(+)
NF33	Orta büyüklükte	Şeffaf-Gri	(-)	(-)
NF34	Orta büyüklükte	Şeffaf-Gri	(-)	(-)
NF35	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF36	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF37	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF38	Orta büyüklükte, düzgün	Gri	(+)	(-)
NF39	Orta büyüklükte, parlak, yuvarlak	Beyaz	(+)	(+)
NF40	Orta büyüklükte, parlak, yuvarlak	Beyaz	(+)	(+)

Çizelge 3.8: Üçüncü işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları

3.Nolu İşletme			
Bakteri Türü	İzolat Sayısı (n)	İzolat Oranı (%)	İzolat No
Gram-pozitif	10	71,4	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	21,4	NF35-NF36-NF37
<i>Staphylococcus hominis</i>	2	14,3	NF28-NF31
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	14,3	NF39-NF40
<i>Bacillus pumilus</i>	1	7,1	NF29
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1	7,1	NF27
<i>Micrococcus luteus</i>	1	7,1	NF32
Gram-negatif	4	28,6	
<i>Salmonella bongori</i>	2	14,3	NF33-NF34
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	7,1	NF30
<i>Mannheimia haemolytica</i>	1	7,1	NF38

Çizelge 3.9: Dördüncü işletmeden elde edilen izolatların özellikleri

4.Nolu İşletme				
İzolat No	Koloni morfolojisi	Pigmentasyon	Hemoliz	Gram Boyanma
NF41	Küçük, yuvarlak	Beyaz	(-)	(+)
NF42	Küçük, yuvarlak	Beyaz	(-)	(+)
NF43	Küçük, yuvarlak	Beyaz	(-)	(+)
NF44	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF45	Küçük, yuvarlak, kuru	Şeffaf	(+)	(+)
NF46	Yuvarlak, parlak, dışbükey	Sarı	(-)	(+)
NF47	Küçük, yuvarlak, dalgalı	Şeffaf	(+)	(+)
NF48	Küçük, yarı-saydam, düz	Gri	(+)	(+)
NF49	Yuvarlak, parlak, dışbükey	Sarı	(-)	(+)
NF50	Küçük, yuvarlak, dalgalı	Şeffaf	(+)	(+)
NF51	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF52	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF53	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)

Çizelge 3.10: Dördüncü işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları

Bakteri Türü	4.Nolu İşletme		İzolat No
	İzolat Sayısı (n)	İzolat Oranı (%)	
Gram-pozitif	13	100	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4	23,1	NF44-NF51-NF52-NF53
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3	23,1	NF41-NF42-NF43
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	7,7	NF45
<i>Micrococcus luteus</i>	2	15,4	NF46-NF49
<i>Bacillus pumilus</i>	2	15,4	NF47-NF50
<i>Aerococcus viridans</i>	1	7,7	NF48
Gram-negatif	0	0	

Çizelge 3.11: Beşinci işletmeden elde edilen izolatların özellikleri

5.Nolu İşletme				
İzolat No	Koloni morfolojisi	Pigmentasyon	Hemoliz	Gram Boyanma
NF54	Küçük, yuvarlak, kuru	Şeffaf	(+)	(+)
NF55	Yuvarlak, parlak, dışbükey	Sarı	(-)	(+)
NF56	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF57	Orta büyüklükte, mat	Gri	(-)	(-)
NF58	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF59	Küçük, yuvarlak, kuru	Şeffaf	(+)	(+)
NF60	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF61	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF62	Orta büyüklükte, belirgin	Gri	(-)	(-)
NF63	Orta büyüklükte, parlak, yuvarlak	Beyaz	(+)	(+)
NF64	Orta büyüklükte, parlak, yuvarlak	Beyaz	(+)	(+)
NF65	Orta büyüklükte, düzgün	Gri	(+)	(-)

Çizelge 3.12: Beşinci işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları

Bakteri Türü	5.Nolu İşletme		İzolat No
	İzolat Sayısı (n)	İzolat Oranı (%)	
Gram-pozitif	9	75	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4	33,3	NF56-NF58-NF60-NF61
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	16,7	NF63-NF64
<i>Bacillus licheniformis</i>	2	16,7	NF54-NF59
<i>Micrococcus luteus</i>	1	8,3	NF55
Gram-negatif	3	25	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	8,3	NF57
<i>Pseudomonas putida</i>	1	8,3	NF62
<i>Mannheimia haemolytica</i>	1	8,3	NF65

Çizelge 3.13: Altıncı işletmeden elde edilen izolatların özellikleri

6.Nolu İşletme				
İzolat No	Koloni morfolojisi	Pigmentasyon	Hemoliz	Gram Boyanma
NF66	Yuvarlak, parlak, dışbükey	Sarı	(-)	(+)
NF67	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF68	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF69	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF70	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF71	Orta büyüklükte, mukoit, kokulu	Beyaz	(-)	(-)
NF72	Küçük, yuvarlak	Beyaz	(-)	(+)
NF73	Yuvarlak, parlak, dışbükey	Sarı	(-)	(+)
NF74	Orta büyüklükte, parlak, yuvarlak	Beyaz	(+)	(+)
NF75	Orta büyüklükte, parlak, yuvarlak	Beyaz	(+)	(+)
NF76	Orta büyüklükte, düzgün	Gri	(+)	(-)
NF77	Orta büyüklükte, mukoit, kokulu	Beyaz	(-)	(-)
NF78	Orta büyüklükte, mukoit, kokulu	Beyaz	(-)	(-)

Çizelge 3.14: Altıncı işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları.

6.Nolu İşletme			
Bakteri Türü	İzolat Sayısı (n)	İzolat Oranı (%)	İzolat No
Gram-pozitif	9	69,2	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	23,1	NF68-NF69-NF70
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	15,4	NF74-NF75
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	7,7	NF72
<i>Micrococcus luteus</i>	2	15,4	NF66-NF73
<i>Staphylococcus capitis</i>	1	7,7	NF67
Gram-negatif	4	30,8	
<i>Pasteurella multocida</i>	3	23,1	NF71-NF77-NF78
<i>Mannheimia haemolytica</i>	1	7,7	NF76

Çizelge 3.15: Yedinci işletmeden elde edilen izolatların özellikleri

7.Nolu İşletme				
İzolat No	Koloni morfolojisi	Pigmentasyon	Hemoliz	Gram Boyanma
NF79	Küçük, yuvarlak, kuru	Şeffaf	(+)	(+)
NF80	Küçük, yuvarlak, kuru	Şeffaf	(+)	(+)
NF81	Orta büyüklükte, mat	Gri	(-)	(-)
NF82	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF83	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF84	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF85	Küçük, yuvarlak, dalgalı	Şeffaf	(+)	(+)
NF86	Küçük, yuvarlak, dalgalı	Şeffaf	(+)	(+)
NF87	Küçük, yuvarlak	Beyaz	(-)	(+)
NF88	Orta büyüklükte, parlak, yuvarlak	Beyaz	(+)	(+)
NF89	Orta büyüklükte, parlak, yuvarlak	Beyaz	(+)	(+)
NF90	Orta büyüklükte, parlak, yuvarlak	Beyaz	(+)	(+)
NF91	Orta büyüklükte, düzgün	Gri	(+)	(-)
NF92	Orta büyüklükte, mukoit, kokulu	Beyaz	(-)	(-)

Çizelge 3.16: Yedinci işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları

7.Nolu İşletme			
Bakteri Türü	İzolat Sayısı (n)	İzolat Oranı (%)	İzolat No
Gram-pozitif	11	78,7	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	21,4	NF82-NF83-NF84
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	7,1	NF87
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	21,4	NF88-NF89-NF90
<i>Bacillus licheniformis</i>	2	14,3	NF79-NF80
<i>Bacillus pumilus</i>	2	14,3	NF85-NF86
Gram-negatif	3	21,3	
<i>Raoultella planticola</i>	1	7,1	NF81
<i>Mannheimia haemolytica</i>	1	7,1	NF91
<i>Pasteurella multocida</i>	1	7,1	NF92

Çizelge 3.17: Sekizinci işletmeden elde edilen izolatların özellikleri

8.Nolu İşletme				
İzolat No	Koloni morfolojisi	Pigmentasyon	Hemoliz	Gram Boyanma
NF93	Küçük, yuvarlak	Beyaz	(-)	(-)
NF94	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF95	Düzgün, yuvarlak, orta büyüklükte	Beyaz	(+)	(+)
NF96	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(+)	(+)
NF97	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(+)	(+)
NF98	Küçük, yuvarlak	Beyaz	(-)	(+)
NF99	Küçük, yarı-saydam, düz	Gri	(+)	(+)
NF100	Orta büyüklükte, düzgün	Gri	(+)	(-)
NF101	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF102	Orta büyüklükte, parlak, yuvarlak	Beyaz	(+)	(+)
NF103	Orta büyüklükte, parlak, yuvarlak	Beyaz	(+)	(+)
NF104	Orta büyüklükte, parlak, yuvarlak	Beyaz	(+)	(+)
NF105	Orta büyüklükte, mukoit, kokulu	Beyaz	(-)	(-)

Çizelge 3.18: Sekizinci işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları

8.Nolu İşletme			
Bakteri Türü	İzolat Sayısı (n)	İzolat Oranı (%)	İzolat No
Gram-pozitif	10	76,9	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	15,4	NF94-NF101
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	23,1	NF102-NF103-NF104
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	7,7	NF98
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	7,7	NF95
<i>Staphylococcus equorum</i>	2	15,4	NF96-NF97
<i>Aerococcus viridans</i>	1	7,7	NF99
Gram-negatif	3	23,1	
<i>Mannheimia haemolytica</i>	1	7,7	NF100
<i>Gamma proteobacterium</i>	1	7,7	NF93
<i>Pasteurella multocida</i>	1	7,7	NF105

Çizelge 3.19: Dokuzuncu işletmeden elde edilen izolatların özellikleri

9.Nolu İşletme				
İzolat No	Koloni morfolojisi	Pigmentasyon	Hemoliz	Gram Boyanma
NF106	Küçük, yarı-saydam, düz	Gri	(+)	(+)
NF107	Küçük, yarı-saydam, düz	Gri	(+)	(+)
NF108	Küçük, yuvarlak, kuru	Şeffaf	(+)	(+)
NF109	Küçük, yuvarlak, kuru	Şeffaf	(+)	(+)
NF110	Orta büyüklükte, belirgin	Gri	(-)	(-)
NF111	Küçük, yuvarlak, kuru	Şeffaf	(+)	(+)
NF112	Küçük, yuvarlak, kuru	Şeffaf	(+)	(+)
NF113	Orta büyüklükte, parlak, yuvarlak	Beyaz	(+)	(+)
NF114	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF115	Orta büyüklükte, mukoit, kokulu	Beyaz	(-)	(-)
NF116	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF117	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)

Çizelge 3.20: Dokuzuncu işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları

Bakteri Türü	9.Nolu İşletme		İzolat No
	İzolat Sayısı (n)	İzolat Oranı (%)	
Gram-pozitif	10	83,4	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	25	NF114-NF116-NF117
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	8,3	NF113
<i>Bacillus licheniformis</i>	3	25	NF108-NF109-NF111
<i>Bacillus stratosphericus</i>	1	8,3	NF112
<i>Aerococcus viridans</i>	2	16,7	NF106-NF107
Gram-negatif	2	16,6	
<i>Pseudomonas geniculata</i>	1	8,3	NF110
<i>Pasteurella multocida</i>	1	8,3	NF115

Çizelge 3.21: Onuncu işletmeden elde edilen izolatların özellikleri

10.Nolu İşletme				
İzolat No	Koloni morfolojisi	Pigmentasyon	Hemoliz	Gram Boyanma
NF118	Küçük, yuvarlak, dalgalı	Şeffaf	(+)	(+)
NF119	Küçük, yuvarlak, kuru	Şeffaf	(+)	(+)
NF120	Küçük, yuvarlak, dalgalı	Şeffaf	(+)	(+)
NF121	Düzgün, yuvarlak, orta büyüklükte	Beyaz	(+)	(+)
NF122	Düzgün, yuvarlak, orta büyüklükte	Beyaz	(+)	(+)
NF123	Orta büyüklükte, düzgün	Gri	(+)	(-)
NF124	Küçük, yuvarlak	Beyaz	(+)	(-)
NF125	Küçük, yuvarlak, kuru	Şeffaf	(+)	(+)
NF126	Küçük, yuvarlak, dalgalı	Şeffaf	(+)	(+)
NF127	Küçük, yuvarlak, dalgalı	Şeffaf	(+)	(+)
NF128	Küçük, yuvarlak	Beyaz	(-)	(-)
NF129	Orta büyüklükte, parlak, yuvarlak	Beyaz	(+)	(+)

Çizelge 3.22: Onuncu işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları

10.Nolu İşletme			
Bakteri Türü	İzolat Sayısı (n)	İzolat Oranı (%)	İzolat No
Gram-pozitif	9	75	
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2	16,6	NF121-NF122
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	8,3	NF129
<i>Bacillus altitudinis</i>	2	16,6	NF119-NF125
<i>Bacillus pumilus</i>	4	33,3	NF118-NF120-NF126-NF127
Gram-negatif	3	25	
<i>Mannheimia haemolytica</i>	1	8,3	NF123
<i>Neisseria dentiae</i>	1	8,3	NF124
<i>Gamma proteobacterium</i>	1	8,3	NF128

Çizelge 3.23: On birinci işletmeden elde edilen izolatların özellikleri

11.Nolu İşletme				
İzolat No	Koloni morfolojisi	Pigmentasyon	Hemoliz	Gram Boyanma
NF130	Düzdün, yuvarlak, orta büyüklükte	Beyaz	(+)	(+)
NF131	Orta büyüklükte, mukoit, kokulu	Beyaz	(-)	(-)
NF132	Küçük, yuvarlak, dalgalı	Şeffaf	(+)	(+)
NF133	Orta büyüklükte, düzdün	Beyaz	(-)	(-)
NF134	Düzdün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF135	Küçük, yuvarlak, kuru	Şeffaf	(+)	(+)
NF136	Düzdün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF137	Orta büyüklükte, düzdün	Gri	(+)	(-)
NF138	Orta büyüklükte, parlak, yuvarlak	Beyaz	(+)	(+)
NF139	Orta büyüklükte, parlak, yuvarlak	Beyaz	(+)	(+)
NF140	Orta büyüklükte, düzdün	Gri	(+)	(-)
NF141	Orta büyüklükte, mukoit, kokulu	Beyaz	(-)	(-)

Çizelge 3.24: On birinci işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları

11.Nolu İşletme			
Bakteri Türü	İzolat Sayısı (n)	İzolat Oranı (%)	İzolat No
Gram-pozitif	7	58,3	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	16,6	NF134-NF136
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	16,6	NF138-NF139
<i>Bacillus pumilus</i>	1	8,3	NF132
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	8,3	NF135
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	1	8,3	NF130
Gram-negatif	5	41,7	
<i>Pasteurella multocida</i>	2	16,6	NF131-NF141
<i>Mannheimia haemolytica</i>	2	16,6	NF137-NF140
<i>Kluyvera intermedia</i>	1	8,3	NF133

Çizelge 3.25: On ikinci işletmeden elde edilen izolatların özellikleri

12.Nolu İşletme				
İzolat No	Koloni morfolojisi	Pigmentasyon	Hemoliz	Gram Boyanma
NF142	Orta büyüklükte, belirgin	Gri	(-)	(-)
NF143	Küçük, yuvarlak, dalgalı	Şeffaf	(+)	(+)
NF144	Orta büyüklükte, belirgin	Şeffaf	(+)	(+)
NF145	Orta büyüklükte, düzgün	Şeffaf	(+)	(+)
NF146	Düzgün, yuvarlak, orta büyüklükte	Beyaz	(+)	(+)
NF147	Orta büyüklükte, konveks	Beyaz-Şeffaf	(-)	(+)
NF148	Küçük, yuvarlak, dalgalı	Şeffaf	(+)	(+)
NF149	Büyük, kenarları dalgalı	Şeffaf	(+)	(+)
NF150	Küçük, yuvarlak, dalgalı	Şeffaf	(+)	(+)
NF151	Orta büyüklükte, düzgün	Şeffaf	(+)	(+)
NF152	Orta büyüklükte, düzgün	Gri	(+)	(-)
NF153	Düzgün, yuvarlak, orta büyüklükte	Beyaz	(+)	(+)
NF154	Orta büyüklükte, düzgün	Şeffaf	(+)	(+)
NF155	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(+)	(+)

Çizelge 3.26: On ikinci işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları

12.Nolu İşletme			
Bakteri Türü	İzolat Sayısı (n)	İzolat Oranı (%)	İzolat No
Gram-pozitif	12	85,7	
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2	14,3	NF146-NF153
<i>Bacillus pumilus</i>	3	21,4	NF143-NF148-NF150
<i>Bacillus cereus</i>	1	7,1	NF149
<i>Staphylococcus equorum</i>	1	7,1	NF155
<i>Bacillus megaterium</i>	1	7,1	NF147
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	1	7,1	NF144
<i>Exiguobacterium indicum</i>	3	21,4	NF145-NF151-NF154
Gram-negatif	2	14,3	
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	12,5	NF142
<i>Mannheimia haemolytica</i>	1	12,5	NF152

Çizelge 3.27: On üçüncü işletmeden elde edilen izolatların özellikleri

13.Nolu İşletme				
İzolat No	Koloni morfolojisi	Pigmentasyon	Hemoliz	Gram Boyanma
NF156	Orta büyüklükte, düzgün	Beyaz	(-)	(-)
NF157	Şekilsiz, bulut kümeleri	Şeffaf	(+)	(-)
NF158	Şekilsiz, bulut kümeleri	Şeffaf	(+)	(-)
NF159	Orta büyüklükte, parlak	Kırmızı	(+)	(-)
NF160	Büyük, kenarları dalgalı	Şeffaf	(+)	(+)
NF161	Orta büyüklükte, mat	Gri	(-)	(-)
NF162	Küçük, yuvarlak, kuru	Şeffaf	(+)	(+)
NF163	Orta büyüklükte, düzgün	Gri	(+)	(-)
NF164	Küçük, düzgün, yuvarlak	Beyaz	(+)	(+)
NF165	Orta büyüklükte, belirgin	Gri	(+)	(-)
NF166	Orta büyüklükte, mat	Gri	(+)	(-)
NF167	Orta büyüklükte, mat	Gri	(+)	(-)
NF168	Küçük, yuvarlak	Gri	(+)	(+)

Çizelge 3.28: On üçüncü işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları

13.Nolu İşletme			
Bakteri Türü	İzolat Sayısı (n)	İzolat Oranı (%)	İzolat No
Gram-pozitif	4	30,8	
<i>Staphylococcus hominis</i>	1	7,7	NF164
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	7,7	NF162
<i>Bacillus thuringiensis</i>	1	7,7	NF160
<i>Arthrobacter arilaitensis</i>	1	7,7	NF168
Gram-negatif	9	69,2	
<i>Pseudomonas thermotolerans</i>	1	7,7	NF165
<i>Comamonas kerstersii</i>	1	7,7	NF156
<i>Proteus mirabilis</i>	2	15,4	NF157-NF158
<i>Serratia rubidaea</i>	1	7,7	NF159
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	7,7	NF161
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1	7,7	NF163
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	2	15,4	NF166-NF167

Çizelge 3.29: On dördüncü işletmeden elde edilen izolatların özellikleri

14.Nolu İşletme				
İzolat No	Koloni morfolojisi	Pigmentasyon	Hemoliz	Gram Boyanma
NF169	Küçük, yuvarlak	Beyaz	(-)	(-)
NF170	Düzgün, yuvarlak, orta büyüklükte	Beyaz	(+)	(+)
NF171	Küçük, yarı-saydam, düz	Gri	(+)	(+)
NF172	Yuvarlak, parlak, dışbükey	Sarı	(-)	(+)
NF173	Yuvarlak, parlak, dışbükey	Sarı	(-)	(+)
NF174	Orta büyüklükte, mat	Gri	(-)	(-)
NF175	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF176	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF177	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF178	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF179	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF180	Orta büyüklükte, parlak, yuvarlak	Beyaz	(+)	(+)

Çizelge 3.30: On dördüncü işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları

Bakteri Türü	14.Nolu İşletme		İzolat No
	İzolat Sayısı (n)	İzolat Oranı (%)	
Gram-pozitif	10	83,4	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	16,6	NF177-NF178-NF179
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	8,3	NF180
<i>Aerococcus viridans</i>	1	8,3	NF171
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	8,3	NF170
<i>Staphylococcus capitis</i>	2	16,6	NF175-NF176
<i>Micrococcus luteus</i>	2	16,6	NF172-NF173
Gram-negatif	2	16,6	
<i>Gamma proteobacterium</i>	1	8,3	NF169
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1	8,3	NF174

Çizelge 3.31: On beşinci işletmeden elde edilen izolatların özellikleri

15.Nolu İşletme				
İzolat No	Koloni morfolojisi	Pigmentasyon	Hemoliz	Gram Boyanma
NF181	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF182	Küçük, düzgün, yuvarlak	Beyaz	(+)	(+)
NF183	Küçük, düzgün, yuvarlak	Beyaz	(+)	(+)
NF184	Orta büyüklükte, mat	Gri	(-)	(-)
NF185	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF186	Orta büyüklükte, kokulu	Gri	(+)	(-)
NF187	Küçük, yuvarlak, yarı saydam	Beyaz	(-)	(+)
NF188	Orta büyüklükte, mat	Gri	(-)	(-)
NF189	Orta büyüklükte, düzgün	Gri	(+)	(-)
NF190	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)
NF191	Orta büyüklükte, parlak, yuvarlak	Beyaz	(+)	(+)
NF192	Düzgün, yuvarlak, bombeli, parlak	Beyaz	(-)	(+)

Çizelge 3.32: On beşinci işletmeden elde edilen izolatların sekans sonuçları

Bakteri Türü	15.Nolu İşletme		İzolat No
	İzolat Sayısı (n)	İzolat Oranı (%)	
Gram-pozitif	8	66,7	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4	33,3	NF181-NF185-NF190- NF192
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	8,3	NF191
<i>Brevibacterium ravenstergense</i>	1	8,3	NF187
<i>Staphylococcus hominis</i>	2	16,7	NF182-NF183
Gram-negatif	4	33,3	
<i>Mannheimia haemolytica</i>	1	8,3	NF189
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2	16,7	NF184-NF188
<i>Escherichia coli</i>	1	8,3	NF186

Çizelge 3.33: 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	
Gram-pozitif																
<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 ravensturnense</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

Çizelge 3.34: Gram negatif izolatların işletmelere göre dağılımı.

Bakteri	İşletme Numaraları															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Gram-negatif																
<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

Çizelge 3.35: 15 işletmeden elde edilen izolatların gruplandırılmış veri analizi

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

^a Nazal boşlukta bulunan *Staphylococcus capitis*, *S. chromogenes*, *S. croceolyticus*, *S. equorum*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. pasteurii*, *S. saprophyticus*, *S. vitulinus* bakterileri.

^b *Bacillus altitudinis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. stratosphericus*, *B. thuringiensis*

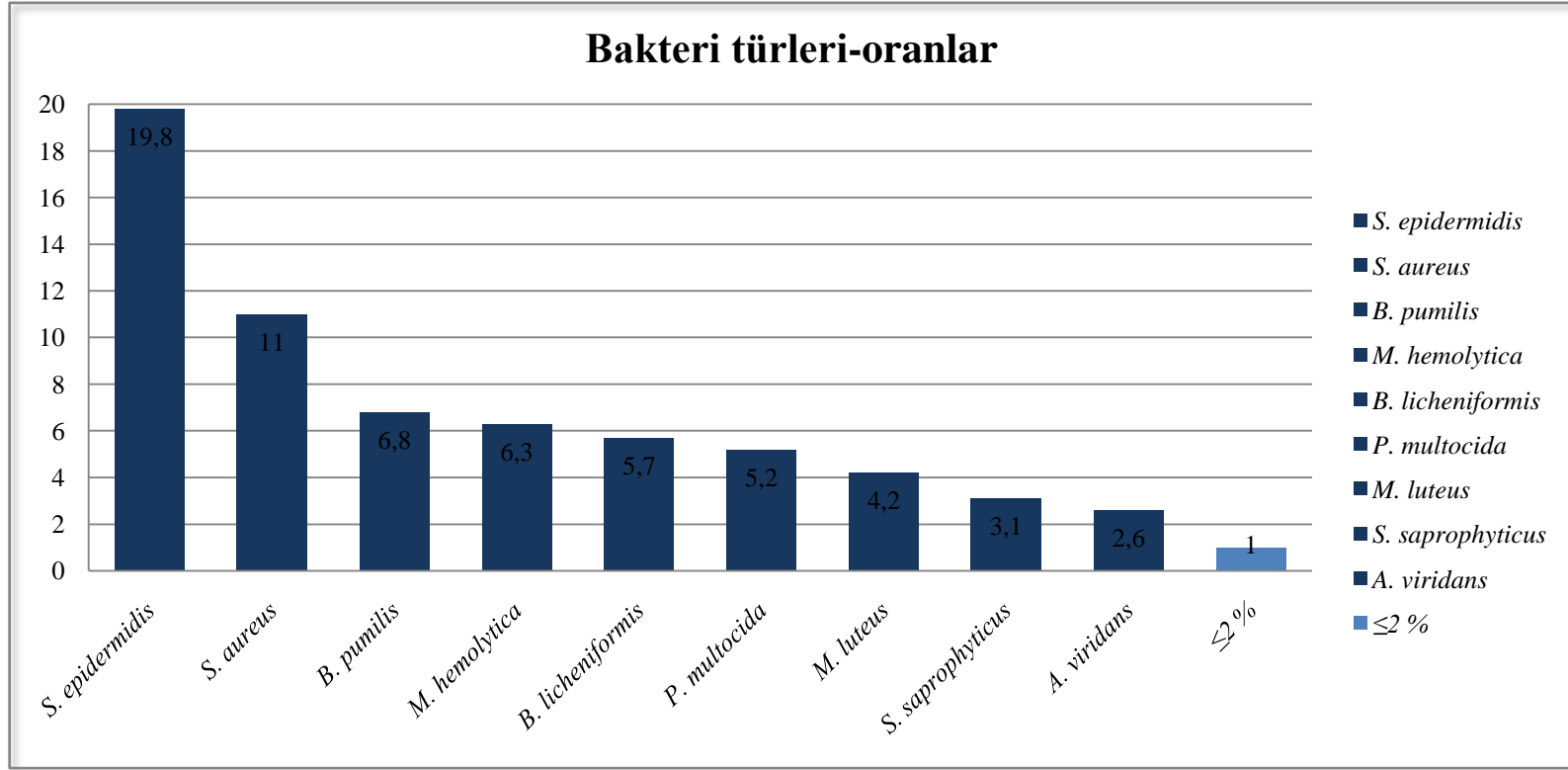
^c *Aerococcus viridans*

^d *Pseudomonas geniculata*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. thermotolerans* türleri

^e *Acetobacter calcoaceticus*, *A. lwoffii* türleri

^f Enterobacteriaceae familyasına ait *Citrobacter amalonaticus*, *E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Kluyvera intermedia*, *Pantoea agglomerans*, *Proteus mirabilis*, *Raoultella planticola*, *Salmonella bongori*, *Serratia rubidaea* türleri.

^g *Arthrobacter arilaitensis*, *Brevibacillus laterosporus*, *Brevibacterium ravensturnense*, *Enterococcus casseliflavus*, *Exiguobacterium indicum*, *Comamonas kerstersii*, *Gamma proteobacterium*, *Neisseria dentiae*



Şekil 3.3: 15 işletmeden toplanan izolatların yüzde grafik dağılımı.

4. TARTIŞMA

Solunum yolunun üst bölümü kalıcı ve geçici mikroorganizma florasının her ikisini içerir. Kalıcı mikroflora zarar gördüğünde ilk denge eğilimleri kendiliğinden yenilenir. Bununla birlikte, bazı fırsatçı (oportünist) patojenler konakta normal savunmanın önüne geçerse hastalığa yol açabilirler. Mikrofloranın bileşimi konağın türü ve içinde bulunduğu çevreden etkilenmektedir (Quinn ve ark 2002).

Sığırlarda solunum yolu enfeksiyonlarına yol açan mikroorganizmalar, genelde üst solunum yollarında yaşayıp, stres koşullarında alt solunum yollarına inen mikroorganizmalardır. Sağlıklı hayvanlarda alt solunum yollarında mikroorganizmalar solunum sisteminin savunma mekanizmasıyla yok edilirler (Sorum ve Sunde 2001).

Birçok araştırmacı genellikle evcil ve vahşi sağlıklı hayvanların pnömonik akciğerleri, burun akıntıları ve balgamları gibi klinik belirtileri üzerine çalışmışlardır (Welsh ve ark 2004, Katsuda ve ark 2008). Ayrıca nazal ve tonsiller bakteriyel floraya ilişkin çalışmalar sağlıklı görünen hayvanlar için rapor edilmiştir (Queen ve ark 1994, Megra ve ark 2006). Bununla birlikte sağlıklı ve sağlıklı hayvanlarda üst solunum yolu sistemi bakteriyel florası inceleme çalışmaları sınırlıdır (Barbour ve ark 1997, Jaramillo ve ark 2007). De Rosa ve ark (2000) izolatların akut hastalıklı hayvandan alındığı durumlarda nazal sıvı kültürlerinin akciğerlerdeki bakteriyel patojenlerin tanılanmasında ve antibiyotik duyarlılığının tespitinde kullanılabileceğini rapor etmiştir.

Bu çalışmada, Aydın ilinde bulunan 15 işletmedeki klinik olarak sağlıklı sığırdan, nazal mukozanın bakteriyel mikroflorasını belirlemek amacıyla nazal sıvı örnekleri toplanmıştır. Toplam 56 örnek incelenmiş ve 192 bakteriyel izolat 16S rRNA dizi analizi yöntemi kullanılarak tanımlanmıştır.

Çalışmamızda 143 izolat Gram pozitif (%74,5), 49 izolat Gram negatif (%25,5) olarak belirlenmiştir. Gram pozitif bakterilerin baskın olduğu görülmektedir. Vücut kısımlarına göre mikrobiyal flora elemanları da değişmektedir. Gram pozitif hücrelerin hücre duvarında bulunan teikoik asit bu bakterilerin nazal mukozada kolonizasyonunda

önemli bir faktördür (Aly ve ark 1980). Genellikle sistemik infeksiyonlardan Gram negatif bakteriler sorumludur (Quinn ve ark 2002). Bu çalışmada incelenen sığır sürüleri klinik olarak sağlıklıydılar. Çalışmada Gram pozitif bakterileri izolatlarının Gram negatif izolatlara oranla baskın olması bu sebeple ilişkilendirilmiştir. Ayrıca bu bulgular daha önce evcil ve vahşi hayvanlar üzerinde yapılan diğer çalışmalarla da uyumaktadır (Marshall ve ark 1983, Queen ve ark 1994, Barbour ve ark 1997, Megra ve ark 2006.). 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. Bu durumda 13 nolu işletmede bulunan sığır sürüleri diğer işletmedekilere oranla daha büyük stres altındadır yorumu yapılabilir.

Bu çalışmada *Aerococcus* sp., *Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp., *Brevibacillus* sp., *Brevibacterium* sp., *Corynebacterium* sp., *Enterococcus* sp., *Exiguobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *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. cinslerini içeren 26 cins izole edilmiştir. Quinn ve arkadaşlarının daha önce yaptıkları çalışmada ruminantlarda nazal mukoza ve nazofarinkslerinden izole edilen birçok mikroorganizmanın *Pasteurella*, *Arcanobacterium*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Staphylococcus* ve *Streptococcus* türlerini genellikle içerdiği ve bu mikroorganizmaların büyük bir kısmının; üst solunum yolu sisteminde kolonize olmaya kabiliyetli olduğu belirtmişlerdir (Quinn ve ark 2002). Bulgular sonucunda elde ettiğimiz verilerde birçok bakteri cinsi Quinn'in yaptığı çalışmayla paralellik göstermektedir. Çalışmamızda yüksek oranda koagülaz negatif stafilokok (KNS), *Bacillus* ve *Pasteurella* türleri ve saprofitik streptokok olan *A. viridans* elde edilmiştir. Şeker (2009)'in yapmış olduğu çalışmayla paralel bulgular elde edilirken, farklı olarak *Arcanobacter* ve *Moraxella* cinslerine ait türler bizim çalışmamızda bulunmamıştır.

Çalışmamızda *S. epidermidis* (%19,8), *S. aureus* (%11), *B. pumilus* (%6,8), *M. haemolytica* (%6,3), *B. licheniformis* (%5,7), *P. multocida* (%5,2) ve *M. luteus* (%4,2) örneklenen hayvanlardan en sık izole edilen türler olarak belirlenmiştir. Ayrıca, *S. saprophyticus* ve *A. viridans* türlerinin örneklerden elde edilen 192 bakteriyel izolat

arasındaki izolasyon oranları sırasıyla %3,1 ve %2,6 şeklindedir. Elde edilen diğer izolatların oranları ise %2'den küçüktür.

S. epidermidis, nazal mukozada bulunan dominant mikroflora elemanı olarak belirlenmiş ve bu olgu Magwood ve ark (1969), Bailie ve ark (1978) ve Şeker (2009) 'in yaptığı çalışmalarda belirtilmiştir.

Şeker ve Yardımcı (2010), klinik olarak sağlıklı Anadolu manda yavrularından nazal mukozanın bakteriyel mikroflorasını belirlemek amacıyla toplam 160 örnekten 165 bakteriyel izolat toplamışlardır. Mikrobiyolojik ve biyokimyasal tanılamaya göre, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Arcanobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Neisseria*, *Morexella*, *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. Yaptığımız çalışma sonuçlarında en sık izole edilen türler, yukarıda adı geçen yazarlara ait çalışma ile paralellik gösterirken, farklı olarak *Arcanobacterium* ve *Morexella* cinslerine ait bakteri türleri de sıklıkla izole edilmiştir. Ayrıca Şeker ve Yardımcı (2010)'nın yaptığı çalışmada izole ettikleri bakteri cinslerinin haricinde çalışmamızda 17 farklı cins izole edilmiştir. Bu durumun çalışmamızda kullandığımız moleküler tanılama yönteminin ayırt ediciliğinin diğer yöntemlere oranla çok daha yüksek ve güvenilir olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Megra ve ark (2006) 50 sağlıklı keçide solunum yollarındaki aerobik bakteriyel florayı bulmak amacıyla nazal boşluk, tonsil, traşe ve akciğerlerden 200 örnek toplamışlardır. Bu örneklerden 154 izolat elde etmişlerdir. KNS (%22,8), *M. haemolytica* (%18,2), *S. aureus* (%17,2), *P. multocida* (%11,9), *Corynebacterium pseudotuberculosis* (%8,8), *Bacillus* türleri (%7,4), *A. pyogenes* (%6,7), *E. coli* (%6,0) ve *Micrococcus* türleri (%1,0) tanımlanmıştır. Ayrıca *S.aureus*, KNS, *M. haemolytica*, *P. multocida*, *A. pyogenes* ve *Bacillus* türlerini tüm anatomik örneklerden izole etmişlerdir. Diğer yandan *C. pseudotuberculosis*, *E. coli* ve *Micrococcus* türlerinin sadece nazal boşluk ve tonsillerden alınan örneklerde izole edildiğini belirtmişlerdir.

Diğer bir non-patejenik 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 (Collier ve Rossow 1964). Bunun yanı sıra Holth ve ark (2000) yaptıkları çalışmada *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 sığır florasına yaşanan çevreden ve besi ortamından taşındığı belirtilmiştir. Bu sebeple çalışmamızdaki *Bacillus* türlerinin sıklığı anlamlıdır.

Çalışmamızda *M. luteus* %4,2 oranında izole edilmiştir. Bu diğer bakteri türlerine oranla yüksek bir orandır. 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 (Shemsedin 2002), tavşanlarda (Ajuwape ve Aregbesola 2002) ve keçilerde (Carter 1984) yapılan nazal flora çalışmalarında da *M. luteus* yüksek oranlarda rapor edilmiştir. Çalışmamızın veri sonuçları daha önce yapılan bu çalışmalarla da örtüşmektedir.

Çalışmamızda %6,3 oranına sahip olan *M. haemolytica* ve %5,2 sıklık oranında bulunan *P. multocida* türleri solunum sisteminde en çok bilinen fırsatçı patojenlerdir. Quinn ve ark (2002) yılında yaptıkları çalışmada *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 patolojik bakteriyel ajanlardır.

Benzer biçimde Megra ve ark (2006) 'nın sağlıklı koyunların üst solunum yollarında *P. multocida* ve *M. haemolytica* yüksek oranda yaşadığını, stres şartları altında akciğere infekte ettiğini bildirmektedirler.

Queen ve ark (1994) klinik olarak sağlıklı 14 yabani dağ koyunu (*Ovis canedensis*) ve 10 evcil koyun (*Ovis aries*) 'dan nazal ve tonsillar örnek alarak bakteri izolasyonu yapmışlardır. Elde ettikleri 194 izolatin 115'i Gram pozitif, 79 tanesi ise Gram negatif olarak tespit etmişlerdir. *Staphylococcus* cinsi Gram pozitifler arasında de en sık izole edilen bakteridir ayrıca yerli koyun türünde yabani dağ koyununa göre insidansı daha yüksek bulunmuştur. Bunun aksine *Streptococcus* türleri kayalık koyununda yüksek

oranlarda bulunmaktadır. *P. haemolytica* bu çalışmada en yaygın bulunan Gram negatif bakteri türüdür. Evcil koyun örneklerinden elde edilen beş tonsillar izolattın beşinde de *P. haemolytica* bulunurken on nazal izolattın hiçbirinde rastlanılmamıştır. Kayalık koyununda ise sekiz tonsillar izolattın yedisinde, on nazal izolattın da üçünde bu bakteriye rastlanılmıştır. Ayrıca *P. haemolytica*, *P. multocida* ve *A. pyogenes* türlerinin solunum hastalıklarıyla ilgili çok sık izole edilen bakteriler olduğu bildirilmiştir.

Başka bir çalışmada Şeker ve ark (2009) “Görünüşte sağlıklı ve sağlıksız Holstein sığırlarının nazal boşluklarında bakteriyel inceleme” adlı çalışmada 70’i sağlıklı görünen ve 30’u solunum yolu hastalık belirtileriyle (burun akıntısı, öksürük, nefes darlığı) sağlıksız görünen olmak üzere toplam 100 sığırdan örnek toplamışlardır. Sağlıklı sığırların burun sıvı örneklerinden en sık izole edilen tür *S. epidermis* (%32,9) ve *S. aureus* (%24,3) iken sağlıksız sığırlarda en çok rastlanan türlerin; *P. aeruginosa* (%40), *P. multocida* (%40) ve *M. haemolytica* (%100) olduğunu bulmuşlardır. Sağlıklı sığırlardan elde edilmiş izolasyonlar arasında Gram pozitif bakterilerin hakim olduğu saptanırken, Gram negatif bakteriler çoğunlukla sağlıksız sığırlardan izole edilmiştir. Çoğu Gram pozitif bakteri; sağlıklı hayvanların üst solunum yolu sahasındaki mukoza membranlarında izole edilmiştir. Ayrıca evcil ve yabani hayvanların üst solunum sisteminde fırsatçı patojenlerden olan *P. multocida* (%11,4) ve *M. haemolytica* (%14,3) bakterilerinin de diğer bakterilere göre yüksek oranda bulunduğu ortaya çıkarılmıştır. (Şeker ve ark 2009). Yaptığımız çalışmada sadece görünüşte sağlıklı olan sığırlardan örnek toplanmıştır ve sonucunda Şeker ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmaya eşdeğer veriler elde edilmiştir. En sık izole edilen türler *S. epidermidis* ve *S. aureus* bizim çalışmamızda da en sık izole edilen türlerdir.

Allen ve ark (1990) besi sığırlarında nazofaringel ve bronş-alveolar lavaj kültürleriyle ilişkili solunumun sistemi mikrobiyal florasını incelemişlerdir. Bunun için 59 besi sığırdan örnek toplamışlardır. Sonuç olarak prevalansı en yüksek mikroorganizmaların *P. multocida* ve *M. bovis* olduğunu tespit etmişlerdir.

Rowe ve ark (2001) yaptıkları çalışmada sağlıklı hayvanların nazofarinks ve tonsillerinde *M. haemolytica*’nın izole edilebileceğini belirtmişlerdir. Sağlıklı sığırlarda yapılan diğer araştırmalarda *P. multocida* taşıyıcı oranı İran’da %4,05 (Hajikolaei ve ark 2006), Sri Lanka’da %2,7 (Hiramune ve De Alwis 1982), Malezya’da %0,4 oranında rapor

edilmiştir (Ghandrasekaran ve ark 1981). Benzer bir çalışmada Şeker ve Yardımcı (2010) hayvanlardan yüksek oranda *M. haemolytica* (%25) ve *P. multocida* (%17,5) izole etmiştir. Baker (1998)'e göre stres faktörleri, viral enfeksiyonlu veya enfeksiyonsuz, solunum yolunda kommensal bakterilerin proliferasyonuna izin veren mukosilier klerans mekanizmasını baskılayıcı etkenlerdendir.

Solunum sistemi enfeksiyonlarının oluşumunda etken, konakçı ve çevresel koşullar birbiriyle ilişkilidir. Sığırların içinde buldukları çevresel şartlar, beslenme koşulları ve stres faktörleri solunum sistemi hastalıklarının oluşmasında temel etkenlerdir (Yates 1982, Frank 1986). İklim, yetiştirme ve pazarlama koşulları da hayvanlarda duyarlılık oluşturup, hastalık şiddetine etki edebilir (Bowland ve Shewen 2000).

Pasteurella pnömonilerinin sıklıkla görüldüğü ABD, Kanada ve İngiltere'de iklim koşullarının bu hastalığın yayılışında önemli rol oynadığı bilinmektedir. İngiltere gibi ılıman-nemli iklim özelliği gösteren ülkelerde solunum sistemi hastalıklarının sığırlarda önemli bir problem olduğu belirtilmektedir (Bowland ve Shewen 2000). Erbaş ve Kaya'nın (2008) "Aydın ve İzmir bölgesindeki sığırlardan *Pasteurella multocida*'nın izolasyonu, tiplendirilmesi ve antibiyotiklere duyarlılıkları" adlı çalışmalarında 570 örneğin 28'inde (%4,9) *P. multocida* izole edilmiştir. Baysan (2007), yaptığı çalışmada Çine, Nazilli ve Aydın mezbahalarından toplanan 309 adet sığır intratracheal sıvap örneğini incelemiş, *P. multocida* ve *P. haemolytica* insidansını sırasıyla %9,7 (30 adet) ve %1,3 (4 adet) olarak bulmuştur. Aydın'da *P. haemolytica*'nın az, *P. multocida* suşlarının fazla olması yörenin Akdeniz iklimi özellikleri göstermesi ile açıklanabilir.

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.

Çalışmamızda düşük oranlarda *E. coli* ve *Klebsiella* türleri bulunmuştur. Nazal kaviteden izole edilen bu bakteriler sosyal davranışlar ve hayvanların büyüdüğü çevre kaynaklı nazal floraya geçici olarak yerleştiği düşünülmektedir. Benzer şekildeki bulgular Şeker ve Yardımcı (2010)'nın yapmış olduğu çalışmada da rapor edilmiştir.

5. SONUÇ

Çalışmada toplam 192 materyal (56 nazal sıvap örneği) mikrobiyolojik ve moleküler olarak incelendi. Buna göre elde edilen sonuçlara göre;

1) Çalışmamızda 143 izolat Gram pozitif (%74,5), 49 izolat Gram negatif (%25,5) olarak belirlenmiştir.

2) Çalışmamızda 26 bakteri cinsine ait tür elde edilmiştir. Bu bakteri cinslerinden Gram pozitif olanlar; *Aerococcus* sp., *Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp., *Brevibacillus* sp., *Brevibacterium* sp., *Corynebacterium* sp., *Enterococcus* sp., *Exiguobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Staphylococcus* sp. , Gram negatif olan bakteriler ise; *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.' dir.

3)Yaptığımız çalışmada mikrobiyal ve moleküler çalışma sonuçları birbirleriyle bire bir örtüşmektedir.

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

5)Diğer bir non-patejenik organizma olan ve çalışmada yüksek sıklıkta izole edilen *Bacillus* türlerinin [*B. pumilus* (%6,8), *B. licheniformis* (%5,7)] ise florada geçici olduğu ve bu bakterilerin sığır florasına yaşanan çevreden ve besi ortamından taşındığı düşünülmektedir. Yapılan birçok çalışmada hayvanların doğal içgüdüsel davranışları yardımıyla florada su ve toprak bakterilerinin yaygın olarak bulunabildiği rapor edilmektedir.

6) Sığırlarda solunum yolu hastalıkları ve nazal flora ile ilgili yapılan çalışmalar göz önüne alındığında; araştırmamızda örnek topladığımız 15 sığır 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.

7) 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 bakteriler üst solunum yolu mukozasında çok rahat kolonize olabildiği ve ancak stres gibi faktörlerle akciğerleri infekte ettikleri yapılan diğer çalışmalarda rapor edilmiştir.

8) İzolatların tür düzeyinde doğru bir şekilde identifikasyonlarının yapılmasında sekans analizinin kullanılmasının faydalı, güvenilir ve pratik olduğu düşünülmektedir

9) Yörede solunum sistemi problemi bulunan sığırların da nazal boşluk bakteriyel florasının moleküler identifikasyonlarının yapılması, sağlıklı ve sağlıksız 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 duruma sebep olmadan önlenmesine katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

ÖZET

Eskin Z. Sağlıklı Sığırların Nazal Boşluk Bakteriyel Florasının Moleküler İdentifikasyonu

Bu çalışmada, klinik olarak 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.

Çalışmada 15 çiftlikteki 56 sığırdan alınan nazal sıvap örnekleri kullanılmıştır. Nazal sıvaplardan klasik konvansiyonel yöntemler kullanılarak bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiş, etkenlerin makroskopik ve mikroskopik morfolojileri incelendikten sonra, identifikasyonları üniversal primerler kullanarak 16S rRNA geninin polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmasıyla yapılmıştır. 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. Koagulaz 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 identifiye edilen türler olarak belirlenmiştir.

Yaptığımız çalışmada mikrobiyal ve moleküler çalışma sonuçları birbirleri ile paraleldir. Bundan sonra yapılacak olan çalışmalarda, yörede solunum sistemi problemi bulunan sığırların da nazal bakteriyel florasının moleküler identifikasyonlarının yapılması, sağlıklı ve sağlıksız florada bulunan mikroorganizmaların karşılaştırılması, her iki florada da en sık izole edilen etkenlerin virulens ve antibiyotik direnç genlerinin karşılaştırılarak incelenmesinin yapılması önerilmektedir.

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

SUMMARY

Eskin Z. Molecular Identification of Bacterial Flora of the Nasal Cavity of Healthy Calves

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 classical 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 (*Aerococcus* sp., *Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp., *Brevibacillus* sp., *Brevibacterium* sp., *Corynebacterium* sp., *Enterococcus* sp., *Exiguobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Staphylococcus* sp.) and 49 (25.5%) were Gram-negative (*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.). 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%), *Corynebacterium* sp. (1.0%) were the most commonly identified species.

In our study, results of classical conventional methods microbial and molecular identification techniques were found to be similar. It was suggested that works related with molecular identification of nasal bacterial flora of the calves with respiratory system problems in the field should be conducted and, comparison of microorganisms bacterial species located in healthy and unhealthy flora should be carried out, and virulence and antibiotic resistance genes of the most common agents isolated from both flora should be determined at the future studies.

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

KAYNAKLAR

Ajuwape TP, Aregbesola EA. The bacterial flora of the upper respiratory tracts of normal rabbits. Israel Veterinary Medical Association 2000; 57: 1-5.

Akçapınar H ve Özbeyaz C. Hayvan Yetiştiriciliği Temel Bilgileri. I. Baskı, Kariyer Matbaacılık: Ankara, 1999.

Allen JW, Viel L, Bateman KG, Rosendal S, Shewen PE, Physick-Sheard P. The microbial flora of the respiratory tract in feedlot calves: Associations between nasopharyngeal and bronchoalveolar lavage cultures. Canadian Journal of Veterinary Research 1990; 55: 341- 346.

Aly R, Shinefield HR, Litz C, Maibach HI. Role of teichoic acid in the binding of *Staphylococcus aureus* to nasal epithelial cells. Journal of Infectious Diseases 1980; 141: 463- 465.

Ames TR, Baker JC, Wiske SE. Lower respiratory tract diseases. In: Smith BP, Large Animal Internal Medicine, 3rd ed. Toronto: Mosby Comp; 2002. p. 550-570.

Anderesson MD. DNA 6X Loading Dye. Cancer Center.

Erişim Adresi: <http://www.mdanderesson.org/education-and-research/departments-programs-and-labs/labs/dent-laboratory/protocols/dna-6x-loading-dye.html>.

Erişim Tarihi: 04.09.2012

Anonim-1. Erişim Adresi: <http://www.adsyb.org.tr/xlsstats.asp>

Erişim tarihi: 29.07.2012

Anonim-2. Erişim Adresi: <http://www.scribd.com/doc/59443375/tus-ders-notlar%C4%B1-indir>

Erişim Tarihi: 24.07.2012

Anonim-3. Erişim Adresi: www.asm.gov.tr/UserFiles/File/egitim/gaziegitim/gbozdayi.ppt

Erişim tarihi: 06.06.2012

Anonim-4. Erişim Adresi: <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/121216.htm>

Erişim tarihi: 24.07.2012

Anonim-5. Erişim Adresi: http://tip.erciyes.edu.tr/Ders_Notlari/Temel_tip/Mikrobiyoloji/Huseyin_Kilic/BAKTER%C4%B0LER%C4%B0N%20SINIFLANDIRILMASI.pdf

Erişim Tarihi: 15. 06. 2012

Arcangioli MA, Duet A, Meyer G, Dernburg A, Bezille P, Poumarat F, Le Grand D.

The role of *Mycoplasma bovis* in bovine respiratory disease outbreaks in veal calf feedlots.

Veterinary Journal 2008; 177: 89- 93.

Baele M, Chiers K, Devriese LA, Smith HE, Wisselink HJ, Vaneechoutte M,

Haesebrouck F. The Gram-positive tonsillar and nasal flora of piglets before and after

weaning. Journal of Applied Microbiology 2001; 91: 997- 1003.

Bailie WE, Stowe EC, Schmitt AM. Aerobic bacterial flora of oral and nasal fluids of

canines with reference to bacteria associated with bites. Journal of Clinical Microbiology

1978; 7: 223- 231.

Baker JC. Respiratory Disease. In: Aillo SE, Mays A (Eds.), The Merck Veterinary

Manual. NJ: Merck and Rhone-Poulence Company; 1998. p. 1049-1125.

Barbour EK, Nabbut NH, Hamadeh SK, Al-Nakhli. Bacterial identity and

characteristics in healthy and unhealthy respiratory tracts of sheep and calves. Veterinary

Research Communications 1997; 21: 421- 430. PMID: 9266661.

Batmaz H. *Pasteurella* pneumonileri ve ekonomik önemi. Uludağ Üniversitesi Sığırların

Solunum Sistemi Hastalıkları Sempozyumu, TÜBİTAK. 2006, Bursa. p. 58-64.

Baule C, Kulcsar G, Belak K, Albert M, Mittelholzer C, Soos T, Kucsera L, Belak S.

Pathogenesis of primary respiratory disease induced by isolates from a new genetic cluster

of bovine viral diarrhoea virus type I. Journal of Clinical Microbiology 2001; 39: 146- 153.

Baysan E. Aydın yöresinde sığırlarda solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan

Pasteurella spp. etkenlerinin izolasyon, identifikasyon ve antibiyotiklere olan

duyarlılığının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık

Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye. 2007.

Bowland SL, Shewen, PE. Bovine respiratory disease: commercial vaccines currently available in Canada, Canadian Veterinary Journal 2000; 41: 33-48.

Callan RJ, Garry FB. Biosecurity and bovine respiratory disease. Veterinary Clinics: Food Animal Practice 2002; 18: 57- 77.

Carter GR. Isolation and identification of bacteria from clinical specimens. In: Charles C. Thomas (Eds), Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology, USA: 4th ed; 1984. p. 19- 30.

Chai H, Archambault M, Prescott JF. 16S Ribosomal RNA Sequence-Based Identification of Veterinary Clinical Bacteria. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 2003; 15: 465–469.

Collier JR, Rossow CF. Microflora of apparently healthy and pneumonia prone herds. Journal of Veterinary Research 1964; 25: 101- 103.

DeRosa DC, Mechor GD, Staats JJ, Chengappa MM, Shryock TR. Comprasion of *Pasteurella* sp. simultaneously isolated from nasal and transtracheal swabs from cattle with clinical signs of bovine respiratory disease. Journal of Clinical Microbiology 2000; 38: 327- 332.

Emikpe BO, Oyero OG, Akpavie SO. Isolaton and antibiogram of aerobic nasal bacterial flora of apparently healthy West African Dwarf Goats. Revue Elev. Med. Vet. Pays trop 2009; 62: 17- 21.

Erbaş G, Kaya O. Aydın ve İzmir bölgesindeki sığırlardan *Pasteurella multocida*' nın izolasyonu, tiplendirilmesi ve antibiyotiklere duyarlılıkları. Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi 2008; 30 (44): 7-14.

Farshid M, Shahriar EGC, Janzen E, West K, Wobeser G. Coinfection with bovine viral diarrheea virüs and *Mycoplasma bovis* in feedlot cattle with chronic pneumonia. Canadian Veterinary Journal 2002; 43, 863- 868.

Fragkou IA, Mavrogianni VS, Cripps PJ, Gougoulis DA, Fthenakis GC. The bacterial flora in the teat duct of ewes can protect against and can cause mastitis.. Veterinary Research Communications 2007; 38: 525- 545.

Frank GH. The role of *Pasteurella haemolytica* in the bovine respiratory disease complex, Veterinary Medical Association 1986; 12: 841–846.

Gagea MI, Bateman KG, Shanahan RA, van Dreumel T, McEwen BJ, Carman S, Archambault M, Caswell JL. Naturally occurring *Mycoplasma bovis*- associated pneumonia and polyarthritis in feedlot beef calves. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 2006; 18: 29- 40.

Gardner G, Assadourian E, Sarin R. Günümüzde Tüketim, In: Starke L (Eds.) Dünyanın Durumu: Sürdürülebilir Toplum İçin Worldwatch Enstitüsü Raporu, 2004;p. 3-23. Sander AB (çev.), TEMA Vakfı Yay, İstanbul. Türker, 1993 – ö.t.

Ghandrasekaran S, Yeap PC, Chuink BH. Biochemical and serological studies of *Pasteurella multocida* isolated from cattle and buffaloes in Malaysia. British Veterinary Journal 1981; 137: 361- 367.

Guyton AC. Tıbbi Fizyoloji. In: Textbook of Medical Physiology., Gökhan N, Çavuşoğlu H (çev.), 7th Edİstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 1989 (W.B. Saunders Company).

Hajikolaei MRH, Ghorbanpour M, Sayfi-Abadshapouri MR, Rassoli A, Jahferian H. Occurrence of *Pasteurella multocida* in nasopharynx of healthy buffaloes and their immunity status. The Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2006; 50: 435- 438.

Hartel H, Nikunen S, Neuvonen E, Tanskanen R, Kivela SL, Aho P, Soveri T, Saloniem H. Viral and bacterial pathogens in bovine respiratory disease in Finland. Acta Veterinaria Scandinavica 2004; 45: 193- 200.

Hernandez-Castro R, Martinez-Chavarria L, Diaz-Avelar A, Romero-Osorio A, Godinez- Reyes C, Zavala-Gonzalez A, Verdigo-Rodriguez A. Aerobic bacterial flora of the nasal cavity in Gulf of California sea lion (*Zalophus californianus*) pups. The Veterinary Journal 2004; 170: 359- 363.

Hiramune T, De Alwis MCL. Haemorrhagic septicaemia carrier status of cattle and buffalo in Sri Lanka. Tropical Animal Health and Production 1982; 14: 91- 92.

Holth JB, Krieg NR, Sneath HAP, Stanley JT, Williams T. *Bergey's manual of determinative bacteriology USA: Lippincott. Williams and Wilkins, Philadelphia PA;2000.*

Jaramillo-Arango CJ, Hernandez-Castro R, Suarez-Güemes f, Martinez-Maya JJ, Aguilar-Romero F, Jaramillo-Meza L, Trigo FJ. Prevalence of *Mannheimia haemolytica* isolated from bovine nasal exudates and associated factors in dairy farms in the North-Central of Mexico. Journal of Animal and Veterinary Advances 2007; 6: 404-409.

Katsuda K, Kamiyama M, Kohmoto M, Kawashima K, Tsunemitsu H, Eguchi M. Serotyping of *Mannheimia haemolytica* isolates from bovine pneumoniae. Veterinary Journal 2008; 178: 146-148. PMID: 17822930.

Küçüker AM, Tümbay E, Anđ Ö, Erturan Z. Tıbbi Mikrobiyoloji. In: Franz H, Kayser A, Bienz A, Eckert J, Zinkernagel RM. 9. Baskı. Nobel Tıp Kitapevileri; 2002. p . 210.

Madec F, Kobisch M, Le Menec M. Inventory of the bacterial flora in the pig respiratory system. Choice of the sample collection method for a better diagnosis and control of respiratory system. Journees de la Recherche Porcine En France 1986; 308.

Magwood SE, Barnum DA, Thomson RG. Nasal bacterial flora of calves in healthy and pneumonia-prone herds. Canadian Journal of Comparative Medicine 1969; 33: 237- 243.

Marshall MM, Songer JG, Chielli CJ, Devos JC. Isolations of aerobic bacteria from wild desert bighorn sheep (*Ovis canadensis nelsoni* and *Ovis canadensis mexicana*). Journal of Wildlife Disease 1983; 19: 98-100.

Megra T, Sisay T, Assaged B. The aerobic bacterial flora of the respiratory passageways of healthy goats in Dire Dawa Abattoir, Eastern Ethiopia. Revue de Médecine Vétérinaire 2006; 157: 84-87.

Mehndiratta PL, Bhalla P, Ahmed A, Sharma YD. Molecular Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains by PCR-RFLP of SPA gene: a Reference Laboratory Perspective. Indian Journal of Medical Microbiology 2009; 27: 116–122.

Mutter R, Mannheim W, Bisgaard M. Taxonomy of the group. In: Adlam C, Rutter JM (Eds.), *Pasteurella and Pasteurellosis*: Academic Press,1989, Inc. New York. p. 3-34.

Nicholas RA, Ayling RD. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. Research in Veterinary Science 2003; 74: 105-112.

Nicholas RAJ, Ayling RD, Stripkovits L. An experimental vaccine for calf pneumonia caused by *Mycoplasma bovis*: clinical, cultural, serological and pathological findings. *Vaccine* 2002; 20: 3569- 3575.

Queen C, Ward ACS, Hunter DL. Bacteria isolated from nasal and tonsillar samples of clinically healthy Rock Mountain bighorn and domestic sheep. *Journal of Wildlife Disease* 1994; 30: 1- 7.

Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 1st Edn. Blackwell Publishing Professional, Iowa, 2002. pp:461-464. ISBN: 0-632-05525-1.

Rantakokko-Jalava K, Nikkari S, Jalava J. Direct Amplification of RNA Genes in Diagnosis of Bacterial Infections. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38: 32–9.

Rodostits OM, Leslie KE, Fetrow J. *Herd Health Food Animal Production Medicine*. WB Saunders Comp. 2nd ed. Philadelphia, 1994; 394-434.

Rowe HA, Poxton IR, Donachie W. Survival of *Mannheimia haemolytica* (*Pasteurella*) in tracheobronchial washings of sheep and cattle. *Veterinary Microbiology* 2001; 81: 305-314.

Sghir A, Antonopoulos D, Mackie RI. Design and Evaluation of a Lactobacillus Group-Specific Ribosomal RNA-Targeted Hybridization Probe and Its Application to the Study of Intestinal Microecology in Pigs. *Systematic and Applied Microbiology* 1998; 21: 291–296.

Shemsedin M. Bacterial species isolated from respiratory tract of camels slaughtered at Dire Dawa abattoir, Eastern Ethiopia. *Debre Zeit* 2002; 1-25.

Sorum H, Sunde M. Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Veterinary Research* 2001; 32: 227–241.

Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon J J, Gibson G, Collins MD, Dore J. Direct rDNA Community Analysis Reveals a Myriad of Novel Bacterial Lineages within the Human Gut. *Applied and Environmental Microbiology* 1999; 65: 4799–4807.

Şeker E, Kuyucuoğlu Y, Konak S. Bacterial examinations in the nasal cavity of apparently healthy and unhealthy Holstein cattle. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 2009; 8 (11): 2355- 2359.

Şeker E, Yardımcı H. The aerobic bacterial flora of the nasal cavity in healthy Anatolian water buffalo calves. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2010; 57: 65- 67.

Türker S. Cumhuriyetin 70. Yılında Hayvancılık Endüstrisi, *TÜBİTAK Bilim ve Teknik Dergisi*, Kasım Özel Sayı 1993; 1: 53-58.

Welsh RD, Dye LB, Payton ME, Confer AW. Isolation and antimicrobial susceptibilities of bacterial pathogens from bovine pneumonia. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 2004; 16: 426-431. PMID: 15460326.

Woo PC, Leung AS, Leung KW, Yuen KY. Identification of Slide Coagulase Pozitive, Tube Coagulase Negative *Staphylococcus aureus* by 16S Ribosomal RNA Gene Sequencing. Molecular Pathology 2001; 54: 244–7.

Yaman K. Fizyoloji, 2. Baskı, Uludağ Üniversitesi Basımevi, Yayın No. 84, Bursa, 1996. p. 367-370.

Yates WDG. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. Canadian Journal of Comparative Medicine 1982; 46: 256–263.

Yıldırım Y. Kars yöresindeki kültür ırkı sığırlarda bovine Leukemia virus (BLV) enfeksiyonunun seroprevalansı. Kars Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2008; 14(1):99-103.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Almanya’da doğdu. İlköğretim ve ortaöğretim eğitimini Bolu’da lise eğitimini ise Bolu ve Ankara’da tamamladı. Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nde 2009 yılında lisans eğitimi tamamladı. 2010 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca her aşamada bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yardımlarını benden esirgemeyen, bana örnek ve destek olan danışman hocam Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ'a en içten dileklerle teşekkür ediyorum. Çalışmalarında desteğini gördüğüm başta Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Osman KAYA ve diğer Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri'ne, tezim için materyal toplamama yardımcı olan Uzm. Vet. Hek. Seyhan KAYNARCA ve Uzm. Hemşire Emel İNEGÖL'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Sahip olduğu engin bilgi ve tecrübelerini Adnan Menderes Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ndeki öğrencilerle ve öğretim üyeleriyle paylaşan, hayatta başarılı olmak için bizlere daima ışık olan, değerli büyüğüm, sevgili hocam; ADÜ Tıp Fak. Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a içtenlikle teşekkür ederim.

Tez sürecim boyunca ve öncesinde manevi desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen, yol arkadaşım sevgili Biyolog Şeniz ÖKSÜZ'e, emeğiyle ve desteğiyle her zaman yanımda olan arkadaşlarım Biyolog Esra KENAR'a, Uzm. Biyolog Zeynep ERDEM'e ve Arzu DEMİRCİ'ye. Benimle güzel dostluklarını paylaşan hayatta başarılı olmamı dileyen tüm arkadaşlarıma en içten dileklerle teşekkürlerimi sunuyorum.

Tüm yaşamımda en büyük desteğim, başarımlarım için maddi ve manevi hiçbir şeyi esirgemeyen, güçlü kişiliklerinden örnek aldığım, tecrübeleriyle büyüdüğüm, sevgili annem Nimet ESKİN'e ve sevgili babam Zihni ESKİN'e, her konuda sonsuz özveriyle beni minnettar kılan sevgili ablalarım Nermin TUNÇ ve Tevhide AYYILDIZ'a ve tüm aileme içtenlikle teşekkür ederim.