

# Repeat breeder ineklerde genital kanal bakteriyolojisi ve antibiyotik direnç profilleri

## Genital tract bacteriology and antibiotic resistance profiles in repeat breeder cows

Elçin GÜNAYDIN<sup>1</sup> (ID), Gülsen GONCAGÜL<sup>2</sup> (ID), Pınar MURSALOĞLU KAYNAR<sup>3</sup> (ID)

### ÖZET

**Amaç:** İneklerde görülen reproduktif sistem bozukluklarından biri olan ve gerçek kızgınlık ile üç veya daha fazla sayıda çiftleşmeyle gebe kalamama durumu olarak tanımlan repeat breeder, üreme verimliliğinin azalması ve beraberinde süt üretiminin azalmasıyla tüm dünyada ciddi ekonomik kayıplara neden olan bir yetiştiricilik problemidir. Bu çalışmanın amacı, herhangi bir genital sistem enfeksiyonuna dair klinik belirti göstermeyen repeat breeder, ineklerde konvansiyonel kültürel yöntemle genital kanalda aerobik üreme gösteren mikroflorayı belirlemek ve baskın bakteri gruplarında antibiyotik direnç profillerini tespit etmektir.

**Yöntem:** Çalışma materyalini dört ila dokuz yaş aralığında Holstein ırkı 32 repeat breeder (üç ve üstü tohumlama) inek içermektedir. İneklerin vajinalarından steril sürüntü örnekleri toplandı. Toplanan sürüntü örnekleri, Fluid Thioglycollate Medium bulunan tüpler içerisine alınarak soğuk zincir şartlarında laboratuvara ulaştırıldı. Bakteriyolojik muayene için örnekler 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon bitiminden sonra

### ABSTRACT

**Objective:** Repeat breeder, which is one of the reproductive system disorders seen in cattle, is defined as the inability to conceive with three or more matings with true heat, is seen to be a breeding problem that causes serious economic losses all over the world with a decrease in reproductive efficiency and therefore a decrease in milk production. The aim of this study is to identify the aerobic microflora and antibiotic resistance profiles of dominant bacterial groups in the genital tract of repeat breeder cows that do not exhibit clinical signs of any genital system infections using conventional cultural methods.

**Methods:** The study material comprised 32 repeat breeder cows of Holstein breed aged between four and nine years (with three or more inseminations). Specimens were collected by sterile swab. The collected swab samples were taken into tubes with Fluid Thioglycollate Medium and delivered to the laboratory under cold chain conditions. Specimens for bacteriological examination were incubated at 37 °C for 24 h. After the end of incubation, isolation and

<sup>1</sup>Kastamonu Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji AD., Kastamonu

<sup>2</sup>Uludağ Üniversitesi, Mennan Pasinli Atçılık Meslek Yüksekokulu, Bursa

<sup>3</sup>Ankara Medipol Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Elçin GÜNAYDIN

Kastamonu Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Kastamonu - Türkiye

E-posta / E-mail : elcin\_gunaydin@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 09.11.2023

Kabul Tarihi / Accepted : 26.11.2023

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2023.44270

Günaydin E, Goncagül G, Mursaloğlu Kaynar P. Repeat breeder ineklerde genital kanal bakteriyolojisi ve antibiyotik direnç profilleri  
Türk Hij Den Biol Derg, 2023; 80(4): 513 - 522

EMB agar ve kanlı agar besiyerinde gelişen kolonilerin izolasyonu ve identifikasyonu yapıldı.

**Bulgular:** Bakteri kolonilerinin izolasyonu ve identifikasyonu sonucunda Protobacteria ağırlıklı olmak üzere Firmicutes ve Actinobacteria filumlarından 14 tür bakteri izole edildi. İzole edilen bakteri türleri arasında *Escherichia coli* (%21,4), *Stenotrophomonas maltophilia* (%14,3), *Staphylococcus haemolyticus* (%11,9), *Staphylococcus sciuri* (%7,1) *Corynebacterium psuedodiphtheriticum* (%7,1) ve *Corynebacterium bovis* (%4,8) bulundu. İzole edilen bakterilerden bazıları repeat breeder ineklerde subklinik endometrit yönlü infertilite nedeni olarak görüldü. Baskın bakteri gruplarına ve infertilite nedeni olan bakterilere karşı sekiz antibiyotiğin duyarlılığı antibiyogramla incelendi.

**Sonuç:** Repeat breeder olarak belirlenen ineklerden alınan örneklerde Actinobacter filumunda yer alan *C. bovis* ve *C. psuedodiphtheriticum*, Firmicutes filumundan *S. sciuri* ve *S. haemolyticus* izolasyonunun en az Protobacteria filumundan *E. coli* kadar önem arz ettiği sonucuna varıldı. Vajinal mikrobiyomda dominant etken *E. coli*'ye karşı seftiofur'un %100 etki gösterdiği belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Repeat breeder, inek, bakteri, antibiyotik direnci

identification of colonies growing on EMB agar and blood agar medium were performed.

**Results:** Bacteriological isolation and identification of genital canal samples revealed the isolation of 14 bacterial species mainly from the phylum Protobacteria, along with Firmicutes and Actinobacteria filaments. Among the isolated bacterial species, *Escherichia coli* (21.4%), *Stenotrophomonas maltophilia* (14.3%), *Staphylococcus haemolyticus* (11.9%), *Staphylococcus sciuri* (7.1%), *Corynebacterium psuedodiphtheriticum* (7.1%), and *Corynebacterium bovis* (4.8%) were identified. In repeat breeder cows. Some of the isolated bacteria were associated with subclinical endometritis leading to infertility in repeat breeder cows. Susceptibility of eight antibiotics against dominant bacterial groups and infertility-related bacteria were examined by antibiogram.

**Conclusion:** It was determined that bacterial isolations such as *C. bovis* and *C. psuedodiphtheriticum* from the Actinobacteria phylum and *S. sciuri* and *S. haemolyticus* from the Firmicutes phylum in samples taken from cows identified as repeat breeders are as significant as *E. coli* from the Protobacteria phylum. Ceftiofur demonstrated 100% effectiveness against the predominant pathogen *E. coli* in the vaginal microbiome.

**Key Words:** Repeat breeder, cow, bacteria, antibiotic resistance

## GİRİŞ

Dünya genelinde ineklerde yaşam boyunca verimliliğin önemli kriteri üreme verimliliğidir. Üreme verimliliğinin azalması en önemli nedeni ise reproduktif bozukluklardır (1). Reproduktif performansın düşük olduğu süt sığır işletmelerinde, iki doğum arası geçen sürenin uzaması, buzağı sayısının azalması ve gebe inek başına düşen suni tohumlama sayısının arttığı bilinmektedir (2, 3). Üreme fonksiyonlarının enfeksiyon, genetik yapı, besleme ve hormonal

değişimler etkilediği bildirilmektedir (4). Özellikle yetiştiriciler açısından karşılaşılan başlıca sorun, düşük üreme verimliliğine ve uzun süren buzağılama aralıklarına neden olan multifaktoriyel nedenlere bağlı ortaya çıkan "Repeat Breeder Sendromu"dur (3, 5). Ciddi ekonomik kayıplara sebep olan repeat breeder sendromu önemli bir yetiştiricilik sorunudur (6). Süt sığır yetiştiriciliği yapılan işletmelerde en az bir kez doğum yapmış, düzenli seksüel siklus gösteren, herhangi bir üreme patolojisine sahip olmayan, on yaşından genç, fertil bir boğa ile çiftleştiği ya

da motilite sorunu bulunmayan kaliteli sperma ile üç kez tohumlanan ancak, gebe kalmayan inekler "Repeat Breeder" (RB) olarak tanımlanmaktadır (7). Repeat breeder teşhisi konulan ineklerde genital kanal enfeksiyonları göz ardı edilmemesi gerektiği vurgulanmaktadır (8). Özellikle Repeat breederin potansiyel nedenlerinden biri de patolojik endometrittir (9). Üreme organlarının fonksiyonlarının olumsuz etkilenmesinde doğum sonrası bakteriyel kontaminasyonların etkileri bildirilmektedir (10). Sığır vajinal kanalında bulunan mikroorganizmalar arasında *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* spp., *Enterococci* ve *Enterobacteriaceae* bildirilmiştir (11). Gilbert ve ark. yaptıkları çalışmada (11), ürogenital sistemde *E. coli* varlığının, süt ineklerinde gebe kalamama ve bu nedenle tohumlama sayısının artması ile metritis gibi üreme yetersizliğine yol açtığı vurgulanmıştır.

Sığır üreme sisteminde doğum sonrası dönemde kontaminasyonla patojen popülasyonlarına odaklanmış olsa da (12, 13); yakın zamanda vajinal mikro ortamın sığır reproduktif performansında önemli bir rol oynadığı öne sürülmüştür (14-16). Vajinada belirli bakteri popülasyonunun varlığı veya yokluğunun, üreme sistemi bozukluklarının gelişimi için bir risk faktörü olabildiği bildirilmiştir (17, 18). Repeat breeder olgusuna sebep olan genital kanal enfeksiyonların ve buna bağlı infertilite ile sonuçlanan olaylarda döl verimini arttırmak için antibiyotikler, antiseptik solüsyonlar ve hormonlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Hatta bazı uygulamalarda repeat breeder ineklerde antibiyotikler tohumlama sonrası 24 saat içerisinde kullanıldığı gibi tohumlama öncesinde de kullanılmaktadır. Repeat breeder tanısı konulan ineklerden bakteri izolasyonu sonrası yapılan antibiyogram uygulamasında gentamisin, tetrasiklin, kloramfenikol, penisilin, streptomisin, kanamisin, neomisin, oksitetrasiklin, eritromisin ve ampisilin gibi etken maddelere duyarlılık saptandığı bildirilmektedir (19, 20). Bununla birlikte diğer bir çalışmada da izole edilen bakterilerin ampisiline dirençli olduğu görülmüştür (21). Bu çalışmanın amacı, herhangi bir genital sistem enfeksiyonuna dair klinik belirti

göstermeyen repeat breeder ineklerde konvansiyonel kültürel yöntemle genital kanalda aerobik üreme gösteren mikroflorayı belirlemek ve baskın bakteri gruplarında antibiyotik direnç profillerini saptamaktır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Deney hayvanları kullanımı etik kurulu ve diğer etik kurul kararları ve izinleri 15.02.2014 Tarih ve 28914 Sayılı Resmi Gazete’de yayınlanan “Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik”in 8. maddesinin k fıkrası gereği; dışkı veya altlık toplama örneği, sürüntü ile örnek alma, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun (HAYDEK) iznine tabi değildir.

### Çalışma örneği

Bu çalışmada, Marmara Bölgesi’nde farklı dört işletmede, Holstein ırkı 4 ve 9 yaş aralığında olan, üç ve daha fazla tohumlama yapılmış, genital patoloji tespit edilmemiş ancak döl tutmamış 32 repeat breeder inek çalışma örneğini oluşturdu.

### Vajinal örnekleme

Repeat breeder ineklerden vajinal örnekleme yapılmadan önce kontaminasyonu engellemek için kuyruk yukarı kaldırılıp, dış genital bölgede vulva dudakları ve rima vulva benzalkonyum hidroklorür (Zefirolum®, Kimpa, İstanbul) ile temizlendi. Ardından steril bir havlu ile kurulandı. Sonra aralanan vulva dudakları arasından aynı kişi tarafından vajinanın arka kısmından steril sürüntü ile örnekler alındı. Alınan sürüntü örnekleri Fluid Thioglycollate Medium (BBL; 221196) bulunan tüplerin içerisine alınarak soğuk zincir şartları altında laboratuvara ulaştırıldı. Bakteriyolojik muayenede, Fluid Thioglycollate Medium (BBL; 221196) içerisinde bulunan sürüntü örnekleri 37 °C’de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon bitiminden sonra EMB agar (Eosin-Methylenblue-Laktoz-Sakaroz, BBL; 221355) ve kanlı agar (BBL; 297876) besiyerinde izolasyon çalışması gerçekleştirildi. Genel bakteriyolojik incelemeler için besiyerleri aerobik koşullarda, 37 °C’de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon bitiminden sonra gelişen kolonileri,

koloni morfolojisi ve Gram boyama özelliklerine göre değerlendirildi. Bakteriyel izolasyon çalışmaları sonucunda elde edilen saf kültürlerin tanımlanması, BBL kristal (Becton-Dickinson, Sparks, USA) Gram pozitif ve Gram negatif ID sistem kitleri ile bilgisayar programı kullanılarak gerçekleştirildi.

#### Antibiyotik duyarlılık testi

Antimikrobiyal duyarlılık, Mueller Hinton Agar besiyeri kullanılarak, Kirby Bauer Disk Difüzyon yöntemiyle test edildi (22). Antibiyogramda kullanılan antibiyotik diskleri; penicillin (P) (10U; Oxoid), eritromisin (E) (30µg; Oxoid), amoksisilin/klavulanik asit (AMC) (30µg, Oxoid), gentamisin (CN) (10µg; Oxoid), tetrasiklin (TE) (30µg; Oxoid), seftiofur (EFT) (30µg; Oxoid), enrofloksasin (ENR) (5µg; Oxoid), sulfametoksazol/trimetoprim (SXT) (25 µg; Oxoid)'dir. Antibiyotik duyarlılık testi, her

bir bakteri için, Mueller Hinton agar (Oxoid®; 0337) besiyeri yüzeyine 0,5 McFarland düzeyinde bakteri süspansiyonu yayıldıktan sonra ilgili sekiz antibiyotik diski iki petri kabına paylaştırılarak disk difüzyon yöntemiyle gerçekleştirildi. Bu çalışmada test edilen suşlar, inhibisyon zon çapına göre dirençli (R), orta duyarlı (I) ve duyarlı (S) olarak kaydedildi (23).

#### BULGULAR

Bu çalışmanın kapsamındaki 32 vajinal swabın tamamı (%100) konvansiyonel kültürel yöntemle bakteriyel üreme yönünden pozitif bulundu. İzole edilen bakterilerin ait oldukları filumlar Protobacteria ağırlıklı olmak üzere, Firmicutes ve Actinobacteria'dır. 13 (%40,63) örnekten birden fazla bakteri türü izole edildi. Tablo 1'de izole edilen bakteriler ve izolasyon oranları verildi.

Tablo 1. Repeat breeder ineklerin vajinasından izole edilen bakteriler ve izolasyon oranları

Bakteri türleri	Filum	İzolasyon sayısı (n)	İzolasyon oranı (%)
<i>Escherichia coli</i>	Protobacteria	9	21,4
<i>Corynebacterium bovis</i>	Actinobacteria	2	4,8
<i>Staphylococcus sciuri</i>	Firmicutes	3	7,1
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Protobacteria	1	2,4
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Protobacteria	2	4,8
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Protobacteria	6	14,3
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	Protobacteria	3	7,1
<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	Firmicutes	1	2,4
<i>Morganella morganii</i>	Protobacteria	1	2,4
<i>Corynebacterium psuedodiphtheriticum</i>	Actinobacteria	3	7,1
<i>Bacillus brevis</i>	Firmicutes	2	4,8
<i>Citrobacter koseri</i>	Protobacteria	1	2,4
<i>Enterococcus faecalis</i>	Firmicutes	3	7,1
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Firmicutes	5	11,9
TOPLAM		42	100

Çalışmamızda anlamlı olabilecek bakteri türleri; *E. coli* (n=9, %21,4) bunu takiben *S. maltophilia* (n=6, %14,3), *S. haemolyticus* (n=5, %11,9), *S. sciuri* (n=3, %7,1) *C. psuedodiphtheriticum* (n=3, %7,1) ve *C. bovis* (n=2, %4,8) olarak tespit edildi. Repeat breeder

ineklerden izole edilen ve antibiyogram uygulanan bakterilerde en fazla duyarlılık seftiofura karşı olduğu belirlendi. Seftiofur ve diğer yedi antibiyotiğin direnç profili de Tablo 2'de detaylandırıldı.

Tablo 2. Repeat breeder ineklerin vajinasından izole edilen bakterilerin antibiyogram sonuçları

BAKTERİ TÜRLERİ ve SAYISI	ANTİBİYOTİK								
	P	E	AMC	CN	TE	EFT	ENR	SXT	
<i>Escherichia coli</i> (n=9)	S		6	7	7	5	9	5	7
	I	2	3	2	1	3		4	2
	R	7				1			
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (n=5)	S				5		5	5	4
	I		3	5		1			1
	R	5	2			4			
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=3)	S	1					2	2	1
	I	2		1	2	1	1	1	
	R		3	2	1	2			2
<i>Klebsiella oxytoca</i> (n=2)	S	2	1	1	2		2	1	1
	I		1	1		2		1	1
	R								
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> (n=3)	S	2	3		2		2		
	I	1		3	1			2	1
	R			1		3	1	1	2
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (n=6)	S	4	4				3		4
	I	2	2	4	1		2	5	
	R			2	5	6	1	1	2

S: Duyarlı, I: Orta Duyarlı, R: Dirençli, P: Penisilin E: Eritromisin AMC: Amoksisilin/Klavulonikasin, CN: Gentamisin, TE: Tetrasiklin, EFT: Seftiofur, ENR: Enrofloksasin, SXT: Sulfometoksazol/Trimetoprim

## TARTIŞMA

Dünya çapında hayvancılıkta en önemli konu üremenin sürdürülebilir olmasıdır. Ekonomik çerçevede bakıldığında da amaç optimum süreler içinde gebeliğin sağlanarak yavru elde edilebilmesidir. Süt inekçiliğinde infertilite ve özellikle “Repeat Breeder Sendromu”nun sıklıkla görülmesi ve yılda bir yavru alabilme hedefinden uzaklaşılmasına dolayısıyla da ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (8). Sığır vajinasının mikrobiyal popülasyonu, çevreden ascedens bulaşma nedeniyle uterus dahil üreme sistemine ait diğer bölümlere göre artmış bakteriyel çeşitlilik ve zenginlik seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir (15). Sağlıklı inekteki vajinal mukoza aerobik, fakültatif anaerobik ve zorunlu anaerobik mikropların dengelenmiş ve dinamik bir bileşimde bir kolonizasyona sahiptir. Bu çalışmada, repeat breeder sütçü ineklerin vajinal mikrobiyomundan konvansiyonel kültürel yöntemle Proteobacteria, Firmicutes ve Actinobacteria filumunda yer alan bakteriler izole edilmesi şaşırtıcı değildir çünkü sütçü sığırlarda diğer üreme organlarında olduğu gibi sığır vajinasının mikrobiyomunda baskın Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes ve Actinobacteria filumlarıdır (24-28). Repeat breeder sendromuna inekleri predispozan kılan faktörlerin yanı sıra infertilite sebebi olarak genital kanal enfeksiyonlarının da göz önünde bulundurulması gerektiği vurgulanmaktadır. Patojen veya non-patojen bakteriler anormal uterus ortamına, uterus yangılarına, uterus endometriyumunda patolojik lezyonlara ve embriyonik ölümlere neden olmaktadır. Endometritis ile ilişkilendirilen vajinal mikrobiyom cinsleri arasında *Bacteroides*, *Helococcus*, *Prevotella*, *Porphyromonas* ve *Fusobacterium* bildirilmiştir (27, 29). Çalışmamızda, yoğunlukla Proteobacteria ve az miktarda da Firmicutes filumlarının izole edilmesi uterus enfeksiyonlarında özellikle Proteobacteria filumundan *Enterobacteriaceae* familyasında (%18,62) dikkati çeker artış olduğunu, az miktarda da Firmicutes filumunun sayısında artışa rastladıklarını bildiren Rodrigues ve ark.’nın (30) sonuçlarıyla

örtüşmektedir. İnsanlarda *Lactobacillus* spp.’nin vajinal mikrobiyom içinde yaygın olarak bulunduğu ve potansiyel olarak gebeliğin oluşmasına yardımcı olabilecek önemli bakteriler içinde olduğundan sıkça söz edilir (31). Ancak, sığırlarda *Lactobacillus* cinsi genellikle düşük yoğunlukta (<1%) tespit edilmekte ve yaygın olarak tanımlanmamaktadır (15). Bu çalışmanın sonucunda da vajinal mikrobiyomdan *Lactobacillus* spp. izolasyonu gerçekleşmedi. Bununla birlikte sığırların normal östrus döngüsü boyunca progesteron ve östradiol konsantrasyonlarındaki değişikliklerle birlikte vajinal mikrobiyomda, foliküler fazda *Lactobacillus* yoğunluğunda bir artış olduğunu, ancak *Lactobacillus*’un göreceli yoğunluğunun hala %0,2 düzeyinde düşük olduğunu belirtilmektedir (27).

Sığırların üreme yaşamları boyunca çeşitli zamanlarda kommensal veya patojen bakterilerin tanımlanması, üreme başarısı ve başarısızlığını anlamak için hayati öneme sahiptir. Primipar ve multipar sığırlar arasında dahi vajinal mikrobiyom farklılıkları bildirilmektedir (25). Üreme bozukluğu olan ineklerde, 16S rRNA dizileme yoluyla yapılan tanımlamalar, *Ureaplasma*’nın en yaygın cinslerden biri olduğunu ve bu durumun çeşitli çalışmalarda tekrarlandığını gösterilmektedir. Bu durum, *Ureaplasma*’nın, *Mollicutes* sınıfı ve *Tenericutes* filumuna ait *Mycoplasma* ile yakın ilişkisi nedeniyle, sığırlarda çeşitli üreme sorunları ile ilişkilendirildiği anlamına gelmektedir (31). Çalışmamızda, konvansiyonel kültürel yöntemle aerobik koşullarda üreyen bakterilerin tespiti yapıldığı için mikrobiyotada varsa bile *Ureaplasma* veya *Mycoplasma* izole edilmedi.

Kültür tabanlı konvansiyonel teknikleri kullandığımız bu çalışmada, sıklıkla *E. coli* bunu takiben *S. maltophilia*, *S. haemolyticus* izole edilmesi aynı teknikler kullanılarak üreme enfeksiyonu gözlemlenen ineklerde *Truperella* ve *Escherichia* gibi cinslerin varlığını rapor eden çalışmalarla örtüşmektedir (31). *E. coli* klinik endometritle bağdaştırılan en önemli bakterilerden biri olması dolayısıyla yüksek oranda *E. coli* izolasyonunun

önemli olduğu kanısında yız (29, 32). *E. coli*'nin pap, sfa, hlyA, cnF1 ve fim gibi üropatojenik virülans faktörleri ile ürogenital sistemin epitel hücrelerine adhezin olması, biyofilm oluşumu, flagella aracılı hareketliliği, ekzotoksinleri gibi önemli virülans faktörlerinden dolayı üreme sistemi enfeksiyonu kaynağı olduğuna dair raporlar bulunmaktadır (33). Aynı zamanda fimH geni, *E. coli*'nin ineklerde genital bölgeye adhezyonunu sağlayarak uterus enfeksiyonlarının daha şiddetli seyretmesine yol açmaktadır. fimH geninin, konakçı dokuların epitel hücrelerine adhezyon, istila ve biyofilm oluşumu ile ilişkili bir Tip 1 pili olduğu vurgulanmaktadır (34).

Ineklerde repeat breeder olgusuna birçok faktör sebep olsa da subklinik endometritlerin rolünün büyük olduğu bilinmektedir. Özellikle bu çalışmada herhangi bir üreme enfeksiyonuna klinik belirti göstermeyen repeat breeder ineklerden *Actinobacter filumunda* yer alan *C. bovis* ve *C. pseudodiphtheriticum*, Firmicutes filumundan *S. sciuri* ve *S. haemolyticus* izolasyonu en az *E. coli* kadar önem arz etmektedir. Çünkü *Anaerococcus*, *Corynebacterium* ve *Staphylococcus* cinslerinin özellikle subklinik endometritli ineklerden izole edildiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (29, 32).

Ayrıca genital sistem kanalında subklinik lezyon ve yangıların bazen spermatozoonun taşınması sırasında olumsuz etkileri ile fertilizasyonun şekillenmesini engellediği bildirilmektedir (8). Genital sistemdeki mukus bileşimi viskozitesi üreme sisteminin döngüsellliği ve sağlık durumuna göre farklılık gösterebilir. Normal şartlar altında vajinal mukozal ekosistem bakterileri yakalayan onların spesifik antikorlarına bağlanma etkinliğini kolaylaştıran müsinlerin aktivitesi ile özellikle ekzojen patojenlere karşı bariyer görevi görmektedir. Genital kanal içerisinde bakteri popülasyonunun varlığı bu mukusla olduğu kadar dolaşımdaki steroid hormonların varlığına bağlı olduğu bildirilmiştir (35). Bu bağlamda doğum sonrası ya da ascedens yolla genital sistem kanalına giren bakterilerin neden olduğu kontaminasyonlar ve bakterilerin burada konuçlanması hipofiz bezinden lüteinize edici hormon (LH) salınımını baskılamaktadır

(36). LH yeterli seviyeye ulaşmadığında ovulasyon gerçekleşmez. İlaveten yetersiz LH salınımı düşük seviyedeki insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-I) gibi faktörler foliküler büyümeyi engelleyerek ovulasyon şansını azaltmaktadır (37).

Çalışmada vajinal mikrobiyomun dominant bakteri türü *E. coli*'ye karşı seftiofurun %100 duyarlı olması oldukça sevindiricidir. Çünkü yapılan çalışmalarda sütçü ineklerde seftiofur dirençli *E. coli*'ler bildirilmiştir (38, 39).

Östrus döngüsü boyunca vajinal mikrobiyomun steroid hormonların salınımından etkilenmesi fertilitiyi etkileyerek ekonomik kayba neden olmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız konvansiyonel kültürel yöntemle aerobik koşullarda sınırlı sayıda bakteri tespiti yapılabildiği için eksiksiz vajinal mikrobiyomun tespitinde, prokaryot ribozomun 30S alt biriminin RNA bileşenini kodlayan 16S rRNA geni kullanarak bir veya daha fazla hipervaryabl bölge amplifiye edilmesi ve dizinlemesi taksonomik kompozisyonu ve çeşitliliği belirlememize olanak tanıdığından metagenomik analizlerle çalışılmasının daha anlamlı olacağı kanaatindeyiz (40). Bu yöntemle, hangi mikropların mevcut olduğu, bir örnekteki bir taksona (örneğin, filum veya cins) ait toplam popülasyonun yüzde oranı veya göreceli yoğunluğu hakkında bilgi edinilerek bu mikrobiyota bileşimi vajinal sağlık ve hastalık durumunu ortaya koyabilecektir. Enfeksiyon durumunda tedavinin başarılı olması ancak mikrobiyomun eksiksiz bir şekilde ortaya konup, doğru antimikrobiyal ajan kullanılması ile başarılabilir.

Sonuç olarak repeat breeder sorununun nedenlerinden biri olan aerobik enfeksiyöz ajanlar saptandı ve bu ajanların antibiyotik direnç profilleri ortaya konuldu. Böylece belirlenen enfeksiyöz ajanların neden olduğu repeat breeder olgularında tedavi sürecinin başarıya ulaşması ve beraberinde sütçü ineklerde reproduktif sürekliliğin sağlanması ile ekonomik kayıpların önüne geçilmesine katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.



## ETİK KURUL ONAYI

\* Bu çalışma, Etik Kurulu onayı gerektirmemektedir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Lobago F, Bekana M, Gustafsson H, Kindahl H. Reproductive performances of dairy cows in smallholder production system in Selalle, Central Ethiopia. *Trop Anim Health Prod*, 2006; 38(4): 333-42.
2. Sarıbay, MK, Köse AM, Yılmaz MA. Repeat breeder ineklerin tedavisinde GnRH ve Gonadotropinlerin (LH, hCG, PMSG) kullanımı. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg*, 2018; 58(1): 34-41.
3. Lopez-Gaitus F, Garcia-Ispuerto I. Treatment with an elevated dose of the GnRH analogue dephereline in the early luteal phase improves pregnancy rates in repeat-breeder dairy cows. *Theriogenology*, 2020; 155: 12-6.
4. Noakes DE, Parkinson TJ, England GC. *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. Tenth Ed. Edinburg: Elsevier Health Sciences. 2018.
5. Singh J, Alanda AS, Adams GP. The reproductive pattern and efficiency of female buffaloes. *Anim Reprod Sci*, 2000; 61: 593-604.
6. Pothmann H, Prunner I, Wagener K, Jaureguiberry M, de la Sota RL, Erber R, et al. The prevalence of subclinical endometritis and intrauterine infections in repeat breeder cows. *Theriogenology*, 2015; 83: 1249-53.
7. Abdisa T. Review on the reproductive health problem of dairy cattle. *J Dairy Vet Sci*, 2018; 5(1): JDVS.MS.ID.555655.
8. El-Khadmwy HH, Ahmed WM, Hanafi M. Observations on repeat breeding in farm animals with emphasis on its control. *J Reprod Infertil*, 2011; 2(1): 1-7.
9. Ahmed FO. The efficacy of intra-uterineinfusion of Iodine compounds on the reproductive efficiency of postpartum and repeat breeder dairy cows in the Sudan. PhD thesis, Faculty of Veterinary Medicine, University of Khartoum. 2009.
10. Sheldon IM, Dobson H. Postpartum uterine health in cattle. 2004, *Anim Reprod Sci*, 82-83 :295-306.



11. Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Erb HN, Frajblat M. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*, 2005; 64(9):1879-88.
12. Jeon SJ, Vieira-neto A, Gobikrushanth M, Daetz R, Mingoti RD, Parize AC, et al. Uterine microbiota progression from calving until establishment of Metritis in dairy cows. *Appl Environ Microbiol*, 2015; 81: 6324-32.
13. Bicalho MLS, Machado VS, Higgins CH, Lima FS, Bicalho RC. Genetic and functional analysis of the bovine uterine microbiota. Part I: Metritis versus healthy cows. *J Dairy Sci*, 2017; 100(5): 3850-62.
14. Ault TB, Clemmons BA, Reese ST, Dantas FG, Franco GA, Smith TPL, et al. Uterine and vaginal bacterial community diversity prior to artificial insemination between pregnant and nonpregnant postpartum cows. *Amer Soc Anim Sci*, 2019; 97(10): 4298-304.
15. Clemmons BA, Reese ST, Dantas FG, Franco GA, Smith TPL, Adeyosoye OI, et al. Vaginal and uterine bacterial communities in postpartum lactating cows. *Front Microbiol*, 2017; 8: 1047.
16. Messman RD, Contreras-Correa ZE, Paz HA, Perry G, Lemley CO. Vaginal bacterial community composition and concentrations of estradiol at the time of artificial insemination in Brangus heifers. *J Anim Sci*, 2020; 98 (6): skaa178.
17. Ault TB, Clemmons BA, Reese ST, Dantas FG, Franco GA, Smith TPL, et al. Bacterial taxonomic composition of the postpartum cow uterus and vagina prior to artificial insemination. *J Anim Sci*, 2019; 97 (10): 4305-13.
18. Bicalho M, Santin T, Rodrigues M, Marques C, Lima S, Bicalho R. Dynamics of the microbiota found in the vaginas of dairy cows during the transition period: Associations with uterine diseases and reproductive outcome. *J Dairy Sci*, 2017; 100: 3043-58.
19. Aköz M, Dinç DA. Döl tutmayan (repeat breeder) öneklerde pgf2α ve intrauterin köpük sprey (rifaximina) uygulamalarının gebe kalma oranı üzerine etkisinin araştırılması. *Hay Araş Derg*, 2001;11(2): 51-5.
20. Singh M. Antibigram of bacteria isolated from repeat breeder cows suffering from endometritis in Himachal Pradesh. *Himachal Vet J*, 1998; 2: 37-8.
21. Sharma S, Singh M, Vasishtha NK. Isolation and antimicrobial susceptibility of aerobic bacteria recovered from the uteri of dairy cows suffering from endometritis. *Indian J Anim Sci*, 2009; 79: 278-82.
22. Hudzicki J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol 1. American Society for Microbiology. 2016.
23. M07-A10 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute. 10th Edition. 2015.
24. Chen SY, Deng F, Zhang M, Jia X, Lai SJ. Characterization of vaginal microbiota associated with pregnancy outcomes of artificial insemination in dairy cows. *J Microbiol Biotechnol*, 2020; 30: 804-10.
25. Moreno CG, Luque AT, Galvão KN, Otero MC. Bacterial communities from vagina of dairy healthy heifers and cows with impaired reproductive performance. *Res Vet Sci*, 2022; 142: 15-23.
26. Quadros DL, Zanella R, Bondan C, Zanella GC, Faccioli FL, da Silva AN. Study of vaginal microbiota of Holstein cows submitted to an estrus synchronization protocol with the use of intravaginal progesterone device. *Res Vet Sci*, 2020; 131: 1-6.
27. Quereda JJ, Barba M, Mocé ML, Gomis J, Jiménez-Trigos E, García-Muñoz Á. Vaginal microbiota changes during estrous cycle in dairy heifers. *Res Vet Sci*, 2020; 7: 371.
28. Kudo H, Sugiura T, Higashi S, Oka K, Takahashi M, Kamiya S, et al. Characterization of reproductive microbiota of primiparous cows during early postpartum periods in the presence and absence of endometritis. *Res Vet Sci*, 2021; 8: 736996.

29. Miranda-CasoLuengo R, Lu J, Williams EJ, Miranda-CasoLuengo AA, Carrington SD, Evans ACO, et al. Delayed differentiation of vaginal and uterine microbiomes in dairy cows developing postpartum endometritis. *PLoS One*, 2019; 14: e0200974.
30. Rodrigues N, Kästle J, Coutinho TJD, Amorim AT, Campos G, Santos V. et al. Qualitative analysis of the vaginal microbiota of healthy cattle and cattle with genital-tract disease. *Genet Mol Res*, 2015;14: 6518-28.
31. Poole RK, Soffa DR, McAnally BE, Smith MS, Hickman-Brown KJ, Stockland EL. Reproductive microbiomes in domestic livestock: Insights utilizing 16S rRNA gene amplicon community sequencing. *Animals*, 2023; 13(3): 485.
32. Pascottini OB, van Schyndel SJ, Spricigo JFW, Rousseau J, Weese JS, Leblanc SJ. Dynamics of uterine microbiota in postpartum dairy cows with clinical or subclinical endometritis. *Sci Rep*, 2020; 10: 12353.
33. Sheldon IM. Genes and environmental factors that influence disease resistance to microbes in the female reproductive tract of dairy cattle. *Reprod Fertil Dev*, 2015; 27(1): 72-81.
34. de Cássia BL, Oba E, Bicudo SD, da Silva LD, Siqueira AK, de Souza MMM, et al. Virulence factors and phylogenetic group profile of uterine *Escherichia coli* in early postpartum of highproducing dairy cows. *Anim Prod Sci*, 2019; 59: 1898-905.
35. Srinivasan M, Adnane M, Archunan G. Significance of cervico-vaginal microbes in bovine reproduction and pheromone production-A hypothetical review. *Res Vet Sci*, 2021; 135:66-71.
36. Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Pfeiffer DU, Dobson H. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction*, 2002; 123(6): 837-45.
37. Silva J, Figueiredo J, Van den Hurk R. Involvement of growth hormone (GH) and insulinlike growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology*, 2009; 71: 1193-208.
38. Donaldson SC, Straley BA, Hegde NV, Sawant AA, DebRoy C, Jayarao BM. Molecular epidemiology of ceftiofur-resistant *Escherichia coli* isolates from dairy calves. *Appl Environ Microbiol*, 2006; 72(6): 3940-8.
39. Schmidt JW, Griffin D, Kuehn LA, Brichta-Harhay DM. Influence of therapeutic ceftiofur treatments of feedlot cattle on fecal and hide prevalences of commensal *Escherichia coli* resistant to expanded-spectrum cephalosporins, and molecular characterization of resistant isolates. *Appl Environl Microbiol*, 2013; 79(7): 2273-83.
40. Weinroth MD, Belk AD, Dean C, Noyes N, Dittoe DK, Rothrock MJ. Considerations and best practices in animal science 16S ribosomal RNA gene sequencing microbiome studies. *J Anim Sci*, 2022; 100: skab346.