



Derleme

Dişi Sığırlarda Mikrobiyota ve Üreme Sağlığı

Ayşe Ilgın Kekeç¹, Serkan İkiz¹, Baran Çelik¹, Ahmet Sabuncu², Georgios Petrovas³,
Gundars Naglis⁴

¹İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye ²İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye ³İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun-i Tohumlama Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye ⁴Trakia Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Doğum, Reprodüksiyon ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Stara Zagora, Bulgaristan

ÖZET

Öz bilgi/Amaç: İnsanlarda ürogenital mikrofloranın reproduktif kanal sağlığı için öneminin araştırıldığı çalışmalarda, dominant mikroorganizmaların genital enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisindeki rolü vurgulanmış; bu çalışmalar veteriner alandaki çalışmalara yol göstermiştir. Literatür araştırmasında, ineklerdeki mikrobiyal flora ile genital kanal sağlığı ve gebelik arasındaki ilişkinin araştırılması üzerine kültür veya metagenomik analizler ile yapılan muhtelif çalışmalar bulunmaktadır. Bu derlemede, kültürel metotlar ile ve kültür bağımsız analizlerle belirlenen ineklerin genital mikrobiyal florası ve bunların reproduksiyon kabiliyeti ile ilişkileri ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Anahtar kelimeler: Dişi sığır, mikrobiyota, üreme sağlığı

Microbiota and Reproductive Health in Cows

ABSTRACT

Background/Aim: In studies of human reproductive track microflora, the prescription for reproductive ductility emphasized the role of dominant microorganisms in the prevention and treatment of genital infections and these studies have led to work in the veterinary area. In the literature survey, there are several works performed by culture or metagenomics analyses on investigation of association between microbial flora and genital channel health and pregnancy in cows. In this review, genital microbial flora of cows determined by culture- depended and in depended analysis and their relationships with reproductive outcomes are detailed.

Key words: Cattle, microbiota, reproductive health

Giriş

Üreme sistemi enfeksiyonları, üreme verimliliğinin düşmesi, süt üretiminin azalması ve bu enfeksiyonların tedavi masrafları nedeni ile süt endüstrisinin karlılığı üzerinde önemli etkiye sahiptir. Avrupa Birliği'nde uterus hastalıklarının ekonomiye getirdiği yıllık maliyetinin 1.411 milyar Avro ve Amerika Birleşik Devletleri'nde ise 650 milyon Amerikan Doları olduğu hesaplanmıştır (Sheldon ve ark, 2009).

İnsanlarda yapılan çalışmalardan elde edilen kanıtlar, vajinal disbiyozun vajinit, metrit ve zührevi enfeksiyonların edinme riskini arttırdığını, sağlıklı bir vajinal mikrobiyotanın daha enfeksiyonlara dirençli olduğunu göstermektedir (Allsworth ve ark, 2011). Bu nedenle, çalışmalar, ineklerin vajinasından probiyotik suşlarının izolasyonu ve ortaya çıkarılması üzerine odaklanmıştır.

İlk çalışmalar süt ineklerinin bakteriyel vajinal mikrobiyotasının kültüre bağlı analizine dayanmaktaydı. Bununla birlikte, 16S rRNA sekanslama tekniklerinin uygulamaları, çeşitli ekosistemlerde çok daha büyük ve daha önce saptanamamış mikrobiyota çeşitliliğini ortaya çıkarmıştır. Metagenomik yöntemlerle araştırılan çok sayıda niş arasında sığır gastrointestinal sistemi (GIT) ve rumen ve insan gastrointestinal ve genitoüriner yolları bulunmakta; ancak sığır vajinal kanal (VT) araştırılmaya yeni başlanmıştır.

Bu derlemede, ineklerin genital mikrobiyal florasının kültür bağımlı ve bağımsız analizleri ve bunların üreme sonuçları ile ilişkileri ayrıntılı olarak verilmiştir.

Konu ile İlgili Gerçekleştirilen Çalışmalar

Otero ve arkadaşları (2000), vajina mukozasına kolonize olabilen ve zaman içinde yüksek sayılara ulaşabilen baskın grupları belirlemeyi amaçlamıştır. İnek vajinasının normal mikrobiyal florası ve süten kesimden sonraki gelişimi standart mikrobiyolojik yöntemler kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlar, en baskın bakterilerin streptokoklara, ardından stafilokoklara ait olduğunu ve tüm çalışma süresi boyunca benzer seviyelerde olduğunu göstermiştir. Enterobacteriaceae familyası ve laktobasillerin çok düşük seviyelerde mevcut olduğu, laktobasillerin ineğin büyümesi sırasında arttığı ve bir dereceye kadar hormonlardan etkilendiği bildirilmiştir. Yazarlar, bulgularının, metritis gibi ineklerin genital sistemindeki enfeksiyonların önlenmesinde kullanılmak üzere, GRAS (Genellikle Güvenli Olarak Kabul Edilen) olarak sınıflandırılan probiyotik özelliklere sahip mikroorganizmaların, kullanımın mümkün olduğunu düşünmüşlerdir.

Rodríguez ve arkadaşları (2011), iki farklı grubun (süt ve et inekleri) otokton laktik asit mikroflorasını incelemiş ve probiyotik bir ürün geliştirme potansiyelini açıklamışlardır. Bu çalışmada, tüm vajinal örneklerde laktobasillerin ortalaması log₂, 41 KOB/ml olarak bulunmuş ve bunun, insan, fare veya maymun için bildirilen sonuçlarla karşılaştırıldığında çok düşük sayıda olduğu bildirilmiştir. Bu düşük Laktik Asit Bakterisi (LAB) sayısı, genital sistem sağlığı ile direkt bağlantı kurulmasına olanak sağlamamakta ve genital sistem mukozasının sağlığını korumak için bu hayvanların jinekolojik mekanizmalarının bilinmesi için araştırmalara devam etmenin önemini ortaya çıkarmıştır. Deney gruplarını karşılaştırarak, süt ineklerinin oluşturduğu gruptaki izolatlarının ortalamasının et grubundan biraz daha yüksek olduğunu, ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gözlemlenmiştir. Fermentatif sınıflandırma ile ilgili olarak, suşların çoğu, en sık görülen türü *Lactobacillus plantarum* olan heterofermentatif fakültatif gruba ait (% 75) olduğu görülmüştür.

75) olduğu görülmüştür. Son olarak, elde edilen izolasyon ve karakterizasyon verileri, üretim inekleri için bir probiyotik geliştirmede büyük potansiyele sahip belirli suşların olduğunu göstermiştir.

Santos ve arkadaşları (2011), doğum sonrası sağlıklı ve metritisli süt ineklerinde uterus bakteriyel mikrobiyotasının metagenomik analizini yapmışlardır. Çalışmada, hem gruba özgü 16S ribozomal DNA PCR-denatüre edici gradyan jel elektroforezi (DGGE) hem de geniş aralıklı 16S ribozomal DNA PCR ürünlerinin klon kütüphanesi sekansları bakteri topluluklarındaki farklılıkları açığa çıkarmışlardır. Metritisli ve sağlıklı uterustaki bakteri çeşitliliğinin, daha önce geleneksel kültür yöntemleriyle ortaya konulandan daha fazla ve karmaşık olduğunu gözlemlenmiştir. Sekanslar 5 ana grubu (Gammaproteobacteria, Firmicutes, Fusobacteria, Bacteroidetes ve Tenericutes) ve kültüre edilemeyen bakterileri göstermiştir. Ayrıca DGGE ile, aktinobakterilerin varlığı saptanmıştır. Metritisli hayvanlardaki klon sekanslarının çoğu, Fusobacteria filumuna bağlanmıştır. Özellikle diğer filumlardan olmak üzere birçok bileşen, metritis vakalarından daha önce izole edilmemiştir. Sağlıklı süt ineklerinin klon kütüphanelerinde, Gammaproteobacteria'nın en önemli grup olduğu ve çoğu sekanslama *Mannheimia varigena*, *Pasteurella hemolytica* ve Tenericutes filumunun bazı üyeleri ile yüksek benzerlik gösterdiği bildirilmiştir.

Wang ve arkadaşları (2013), *Enterococcus*, *Lactobacillus* ve *Pediococcus* cinslerine ait çomaklar ve LAB'nin hem sağlıklı hem de enfekte ineklerin vajinal mukozasında bulunduğunu ve bununla birlikte, enfekte ineklerin, özellikle *Escherichia coli* olmak üzere enterik bakterilerden oluşan vajinal bakteri popülasyonunda muazzam bir artışın var olduğunu söylemiştir. Çalışmada *Pediococcus acidilactici*'nin birçok izolatının, süt ineklerinde uterusenfeksiyonlarının önlenmesi için yeni müdahale stratejilerinin geliştirilmesini kolaylaştırabilecek bir bakteriyosin olan pediocinACh / PA-1 ürettiği rapor edilmiştir.

Ametaj ve arkadaşları (2014) ilk kez, iki inekte *Pediococcus acidilactici* ve bir *Lactobacillus sakei* suşunun karışımının intravajinal uygulanmasının süt ineklerinde 3. hafta doğum sonrası pürülan vajinal akıntı (PVD) insidensini azalttığını göstermiştir. Veriler, akut faz cevabına bağlı uterus enfeksiyonlarının bir parçası olarak karaciğer tarafından üretilen bir protein olan haptoglobinin, LAB karışımı ile tedavi edilen ineklerin plazmasında daha düşük olduğunu ve tedavi edilen ineklerde uterusun daha sağlıklı olduğunu göstermiştir. LAB ile tedavinin, gebelik oranını iyileştirmediği, ancak çoklu doğum yapan ineklerde süt üretimini arttırdığı ve tekli doğum yapan inekleri etkilemediği görülmüştür.

Swartz ve arkadaşları (2014), inek ve koyun vajinal mikrobiyotasının daha önce tarif edilen vajinal mikrobiyal ekosistemlerden benzersiz olduğunu bildirmiştir. Çalışmada inek mikrobiyotasının, koyun mikrobiyotasına kıyasla daha fazla çeşitlilik gösterdiğini ve her ikisinin de insanlardan ve insan dışı primatlardan farklı olduğunu belirtilmiştir. Bacteroidetes, Fusobacteria ve Proteobacteria baskın filumlar olarak belirlenmiştir. Archaea ve laktobasillerin, çok fazla miktarda olmamasına rağmen yaygın olduğu görülmüştür. Çalışmada inek ve koyun vajinal mikrobiyotasının en bol bulunan iki üyesinin *Aggregatibacter spp.* ve *Streptobacillus spp.* olduğunu, buna ek olarak, hem ineklerin hem de koyunların neredeyse nötr bir pH'ya sahip olduklarını gözlemlenmiştir.

Sağlıklı ve genital sistem hastalıklarına sahip olan sığırların vajinal mikrobiyotasının kalitatif analizi, Rodrigues ve arkadaşları (2015) tarafından yapılan çalışmada ortaya

konmuştur. Çalışmada oluşturulan taksonomik profiller, mikrobiyota bileşiminin vajinal sağlık ve hastalık durumu ile tutarlı olduğunu göstermiştir. Yazarlar, mikrobiyotadaki farklılıkların konakçıya bağımlı ve bağımsız faktörler nedeniyle meydana gelebileceğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte, üreme bozuklukları ve sığırların vajinal mikrobiyotasındaki değişiklikler arasındaki ilişkinin birçok faktöre bağlı olduğunu ve gelecekte yapılacak çalışmaların bu ilişkinin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunabileceğini dile getirmişlerdir. Yazarlar, bu hastalıklarda terapötik etkinin artırılması amacıyla vajinal mikrobiyotanın modüle edilmesinde bu bilgilerin faydalı olabileceğini düşünmüşlerdir.

Nascimento ve arkadaşları(2015), düve, gebe veya gebe olmayan Brezilya'daki en önemli et sığırı ırkı olan Nellore ırkı ineklerde vajinal mikrobiyotayı karakterize etmeyi amaçlamıştır. Yaptıkları çalışma, değerlendirilen hayvanlar ve gruplar(düve,

süt ineklerinin serviksindeki baskın filum olduğunu, metritli ineklerde servikal bakteriyel çeşitliliğin azaldığını ve baskın bakteri genusunun *Porphyromonas* ve *Fusobacterium* olduğunu saptamışlardır. Yazarlar, servikal bakteriyel çeşitlilik ve metrit arasındaki ilişkinin daha fazla araştırma gerektirdiğini belirtmiştir.

Sonuç

Sonuç olarak, sağlıklı ineklerde ve üreme sistemi bozukluğuna sahip olan ineklerde genital mikrobiyotanın daha iyi anlaşılması, bağırsak mikrobiyotasının anlaşılması kadar gereklidir. Üreme hastalıklarından korumak için, probiyotik suşların belirlenmesi ve kullanılması en iyi ekonomik seçeneklerden biri olacaktır. Aynı zamanda antibiyotik tedavisi maliyetlerinden ve antibiyotik direncinden kaçınmak için de iyi bir alternatif potansiyeline sahiptir.

Table 1. Plasma fibrinogen concentrations (mean ± Standart Deviation) of 29 clinically healthy and 44 diseased dogs as measured three different techniques.

Tablo 1. Sağlıklı ve hasta köpeklerde farklı yöntemlerle ölçülmüş plazma fibrinojen düzeyleri (Ortalama±Standart hata, Minimum-maksimum)

	Fibrinogen (g/L) By Millar Mean ± SD Min-max	Fibrinogen (g/L) By Schalm Mean ± SD Min-max	Fibrinogen (g/L) By Clauss Mean ± SD Min-max
All animals n=73	3.14 ± 1.51 (0.62-7.92)	2.88 ± 1.20 (1-6)	2.87 ± 1.08 (0.69-6.20)
Healthy n = 29	2.72 ± 1.24 ^a (1.10-7.60)	2.40 ± 0.65 ^a (1-4)	2.80 ± 1.25 (0.69-5.61)
Diseased n = 44	3.42 ± 1.62 ^b (0.62-7.92)	3.20 ± 1.38 ^b (1-6)	2.91 ± 0.96 (1.52-6.20)
P	0.05	0.01	NS

a,b: Statistical difference between groups with different letters in the same column is significant. P < 0.05; P < 0.01

gebe ve gebe olmayan) arasında, daha önce kültür bağımlı metotlar kullanılarak yapılan çalışmalardan rapor edilen sonuçlara göre çok daha büyük bir mikrobiyal varyasyonu tanımlamıştır ve bu konu ile ilgili yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğuna işaret etmiştir. Bulunan mikrobiyom aynı zamanda vajinal kolonizasyonun, gastrointestinal kolonizasyondan etkilendiğini de göstermektedir.

Wang ve arkadaşları (2016), sağlıklı ve endometritli süt ineklerinde vajinal mikrobiyal topluluk yapısının PCR-DGGE ve real-time PCR ile karşılaştırmalı olarak araştırmışlardır. Sonuçlar, doğum sonrası sağlıklı ineklerin vajinal mikroflorasının *L. Sakei subsp.* Ve *Weissella korensi* tarafından domine edildiğini, endometritli ineklerde ise bakteri çeşitliliği artarken, baskın bir bakteri suşu olmadığını göstermiştir. Yazarlar bozulmuş vajinal mikrobiyal topluluğun, endometrit oluşumunda etkili olabileceğini belirtmişlerdir. Dolayısıyla mikrobiyal toplulukların analiz edilmesinin, ineklerde endometriti tedavi etmek için probiyotik geliştirmek için kullanılabilecek bilgiler sağladığını rapor etmişlerdir.

Genis ve arkadaşları(2016), laktik asit bakterilerinin, ve sığırların endometriyum yangısı ve endometriyal *Escherichia coli* enfeksiyonunda tedavi potansiyelini belirtmişlerdir. Sonuçlar, sığırlarda endometriyal enfeksiyon ve inflamasyonun modülasyonunda bazı LAB'ların açık bir potansiyelini göstermektedir.

Wang ve arkadaşları (2018), metritli süt ineklerinde ve sağlıklı ineklerde farklı fizyolojik aşamalarda servikal bakteri topluluğunun karakterizasyonunu incelemişlerdir. Firmicutes'in,

Kaynaklar

- Allsworth JE, Peipert JF (2011). Severity of bacterial vaginosis and the risk of sexually transmitted infection, American Journal of Obstetrics and Gynaecology, 205(2):113-6.
- Ametaj BN, Iqbal S, Selami F, Odhiambo JF, Wang Y, Gänzle MG, Dunn SM and Zebeli Q (2014). Intravaginal Administration of Lactic Acid Bacteria Modulated the Incidence of Purulent Vaginal Discharges, Plasma Haptoglobin Concentrations, and Milk Production in Dairy Cows, Research in Veterinary Science, 96 (2), 365–370.
- Genis S, Bach À, Fàbregas F and Arís A (2016). Potential of Lactic Acid Bacteria at Regulating *Escherichia coli* Infection and Inflammation of Bovine Endometrium, Theriogenology, 85 (4), 625–637.
- Laguardia-Nascimento M, Branco KMGR, Gasparini MR, Giannattasio-Ferraz S, Leite LR, Araujo FMG, de Matos Salim AC, Nicoli JR, Oliveira GC and Barbosa-Stancioli EF (2015). Vaginal Microbiome Characterization of Nellore Cattle Using Metagenomic Analysis. PLoS ONE, 10(11): e0143294.
- Otero C, Saavedra L, Silva de Ruiz C, Wilde O, Holgado AR and Nader-MacóAs ME (2000). Vaginal Bacterial Microflora Modifications during the Growth of Healthy Cows, Letters in Applied Microbiology, 31 (3): 251-254.
- Rodríguez C, Cofré JV, Sánchez M, Fernández P, Boggiano G and Castro E(2011). Lactobacilli Isolated from Vaginal Vault of Dairy and Meat Cows during Progesterone Stage of Estrous Cycle, Anaerobe, 17(1), 15-18.
- Rodrigues NF, Kästle J, Coutinho TJD, Amorim AT, Campos GB, Santos VM, Marques LM, Timenetsky J and de Faries ST (2015). Qualitative Analysis of the Vaginal Microbiota of Healthy Cattle and Cattle with Genital-Tract Disease, Genetics and Molecular Research, 14 (2), 6518-6528.
- Santos TM, Gilbert RO, Bicalho RC(2011). Metagenomic Analysis of the

- Uterine Bacterial Microbiota in Healthy and Metritic Postpartum Dairy Cows. *J Dairy Sci.*, 94(1), 291-302.
- Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofrio G, Schuberth HJ(2009). Defining Postpartum Uterine Disease and the Mechanisms of Infection and Immunity in the Female Reproductive Tract in Cattle. *Biology of Reproduction*, 81(6), 1025-32.
- Swartz JD, Lachman M, Westveer K, O'Neill T, Gear T, Kott RW, Berardinelli JG, Hatfield PG, Thomson JM, Roberts A and Yeoman CJ (2014). Characterization of the Vaginal Microbiota of Ewes and Cows Reveals a Unique Microbiota with Low Levels of *Lactobacilli* and Near-Neutral pH, *Frontiers in Veterinary Science /Veterinary Infectious Diseases* October, 1:19
- Wang J, Sun C, Liu C, Yang Y and Lu W(2016). Comparison of Vaginal Microbial Community Structure in Healthy and Endometritis Dairy Cows by PCR-DGGE and real-time PCR, *Anaerobe*;38, 1-6.
- Wang Y, Ametaj BN, Ambrose DJ and Gänzle MG (2013). Characterization of the Bacterial Microbiota of the Vagina of Dairy Cows and Isolation of Pediocin Producing *Pediococcus acidilactici*, *BMC Microbiology*, Jan 29, 13:19
- Wang Y, Wang J, Li H, Fu K, Pang B, Yang Y, Liu Y, Tian W and Cao R (2018). Characterization of the Cervical Bacterial Community in Dairy Cows with Metritis and during Different Physiological Phases, *Theriogenology*, 108, 306-313.