

**T.C.**  
**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ**  
**DOKTORA PROGRAMI**  
**DR-2026-0020**

***ESCHERICHIA COLI* KAYNAKLI SIĞIR  
MASTİTİSLERİNİN SÜT MİKROBİYOMUNDA MEYDANA  
GETİRDİĞİ DEĞİŞİKLİKLERİN ARAŞTIRILMASI**

**YİĞİT SEFEROĞLU**  
**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Şükrü KIRKAN**

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-23026 proje numarası ile desteklenmiştir.

Bu tez TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı tarafından desteklenmiştir.

**AYDIN-2026**

## KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Yiğit SEFEROĞLU tarafından hazırlanan “*Escherichia coli* Kaynaklı Sığır Mastitislerinin Süt Mikrobiyomunda Meydana Getirdiği Değişikliklerin Araştırılması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 15/06/2026

Üye	Prof. Dr. Şükrü KIRKAN	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
(T.D.) :		Veteriner Fakültesi
Üye :	Prof. Dr. Serkan İKİZ	İstanbul Üniv. Cerrahpaşa
		Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Üye :	Prof. Dr. Ergün Ömer	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
	GÖKSOY	Veteriner Fakültesi
Üye :	Prof. Dr. Uğur PARIN	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
		Veteriner Fakültesi
Üye :	Doç. Dr. Volkan ÖZAVCI	Dokuz Eylül Üniversitesi Veteriner
		Fakültesi

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün ..... tarih ve ..... sayılı oturumunda alınan ..... nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK

Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Şükrü KIRKAN'a çok teşekkür ederim. 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı ile uluslararası alanda doktora tez çalışmam ve araştırma konum ile alakalı ilgili tecrübe kazanmamı sağlayan TUBİTAK'a ve burs kapsamında bulunduğum Cardiff Üniversitesi Biyobilimler Fakültesi'nden Dr. Cedric BERGER ve Doyle MİLLARD'a desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Ayrıca bana her konuda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Serap SAVAŞAN; öğretim üyeleri Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ, Prof. Dr. Göksel ERBAŞ, Prof. Dr. Uğur PARIN ve Doç. Dr. Hafize Tuğba YÜKSEL DOLGUN'a minnetlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince gösterdiği sabır ve özveri ile bu çalışma ve meslek hayatımın tüm aşamalarında, en stresli dönemlerimde yaşadığım sıkıntılarda yanımda olan sevgili eşim Gizem SEFEROĞLU'na; her koşulda yanımda olup desteklerini esirgemeyen annem Saime SEFEROĞLU, babam Güner SEFEROĞLU ve kardeşim Alp SEFEROĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY .....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
RESİMLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ÖZET .....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Sığır Mastitisinin Etiyolojisi ve Patogenezi.....	3
2.2. Mastitisin Klinik Sınıflandırması .....	3
2.2.1. Subklinik Mastitis.....	4
2.2.2. Klinik Mastitis.....	4
2.2.2.1. Perakut Mastitis.....	4
2.2.2.2. Akut Mastitis.....	4
2.2.2.3. Subakut Mastitis.....	5
2.2.2.4. Kronik Mastitis.....	5
2.3. Mastitise Neden Olan Bakteriyel Etkenlerin Sınıflandırması.....	5
2.3.1. Bulaşıcı (Kontagiyöz) Patojenler.....	5
2.3.2. Çevresel Patojenler.....	6
2.3.2.1. Koliform Bakteriler.....	6

2.3.2.2. Çevresel Streptokoklar.....	6
2.3.3. Diğer Bakteriyel Etkenler.....	6
2.4. <i>Escherichia coli</i> Kaynaklı Mastitis.....	7
2.5. Süt Mikrobiyotası.....	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
3.1. Gereç.....	16
3.1.1. Örnekler.....	16
3.1.2. Cihazlar.....	16
3.1.3. Kullanılan Solüsyonlar ve Besiyerleri.....	17
3.1.3.1. Kanlı Agar.....	17
3.1.3.2. Eosin Methylen-Blue Lactose Sucrose (EMB) Agar.....	17
3.1.3.3. Tryptic Soy Agar.....	17
3.1.3.4. Triple Sugar Iron (TSI) Agar.....	17
3.1.3.5. Urea Broth.....	18
3.1.3.6. Kovac's İndol Ayıracı.....	18
3.1.3.7. Oksidaz Testi.....	18
3.1.3.8. Gram Boyama.....	18
3.1.3.9. Primerler.....	19
3.1.3.10. Tris-Asetat-EDTA (TAE) Tamponu.....	20
3.1.3.11. Jel Agaroza.....	20
3.1.3.12. DNA İşaretleyicisi.....	20
3.1.3.13. Jel Yükleme Boyası.....	20
3.1.4. DNA Ekstraksiyonu.....	20
3.2. Yöntem.....	21
3.2.1. <i>Escherichia coli</i> Fenotipik İzolasyon.....	21
3.2.2. Genotipik <i>E. coli</i> İzolasyonu.....	21

3.2.3. <i>E. coli</i> Patotip İdentifikasyonu.....	23
3.2.4. Süt Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu.....	24
3.2.5. Mikrobiyom Analizi.....	26
3.2.6. Biyoinformatik Analiz.....	29
4. BULGULAR.....	31
4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları.....	31
4.1.1. Fenotipik Bulgular.....	31
4.1.2. Genotipik Bulgular.....	32
4.2. Patotip Bulguları.....	33
4.3. Mikrobiyom Bulguları.....	34
4.3.1. OTU Temelli Benzerlik Analiz Bulguları.....	36
4.3.2. Temel Komponent Analiz (PCA) Bulguları.....	37
4.3.3. Alfa Çeşitlilik Analizi Bulguları.....	39
4.3.4. Beta Çeşitlilik Analizi Bulguları.....	42
4.3.5. Filum Düzeyinde Taksonomik Dağılım Bulguları.....	44
4.3.6. Familya Bazında Taksonomik Dağılım Bulguları.....	48
4.3.7. Genus Bazında Taksonomik Dağılım Bulguları.....	51
4.3.8. Krona Analiz Bulguları.....	55
4.3.9. Lineer Diskriminant Etki Analizi (Lefse) Bulguları.....	64
5. TARTIŞMA.....	67
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	76
KAYNAKLAR .....	77
BİLİMSEL ETİK BEYANI.....	92
ÖZ GEÇMİŞ.....	93

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>aEPEC</b>	: Atipik Enteropatojenik <i>E.coli</i>
<b>ATCC</b>	: American Type Culture Collection
<b>cAMP</b>	: Siklik Adenozin Monofosfat
<b>cGMP</b>	: Siklik Guanozin Monofosfat
<b>CMT</b>	: California Mastitis Test
<b>DAEC</b>	: Diffuz Adherent <i>E.coli</i>
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>EAEC</b>	: Enteroagregatif <i>E.coli</i>
<b>EHEC</b>	: Enterohemorajik <i>E.coli</i>
<b>EIEC</b>	: Enteroinvaziv <i>E.coli</i>
<b>EMB</b>	: Eosin Methylen-Blue Lactose Sucrose Agar
<b>EPEC</b>	: Enteropatojenik <i>E.coli</i>
<b>ETEC</b>	: Enterotoksijenik <i>E.coli</i>
<b>ExPEC</b>	: Ekstraintestinal Patojenik <i>E.coli</i>
<b>HÜS</b>	: Hemolitik Üremik Sendrom
<b>InPEC</b>	: İntestinal Patojenik <i>E.coli</i>
<b>LEfSe</b>	: Doğrusal Diskriminant Analizi Etki Büyüklüğü
<b>LPS</b>	: Lipopolisakkarit
<b>LT</b>	: Isıya Duyarlı Enterotoksin
<b>MPEC</b>	: Meme Patojenik <i>E. coli</i>
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>µl</b>	: Mikrolitre

<b>ng</b>	: Nanogram
<b>NMC</b>	: National Mastitis Council
<b>NGS</b>	: Yeni Nesil Dizileme
<b>OTU</b>	: Operasyonel Taksonomik Unite
<b>PBS</b>	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
<b>PC1</b>	: Birinci Temel Bileşen
<b>PC2</b>	: İkinci Temel Bileşen
<b>PC3</b>	: Üçüncü Temel Bileşen
<b>PCA</b>	: Temel Komponent Analizi
<b>PCoA</b>	: Temel Koordinat Analiz
<b>PCR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RNA</b>	: Ribonükleik Asit
<b>rRNA</b>	: Ribozomal RNA
<b>SHS</b>	: Somatik Hücre Sayısı
<b>ST</b>	: Isıya Dayanıklı Enterotoksin
<b>STEC</b>	: Shiga Toksin Üreten <i>E. coli</i>
<b>TAE</b>	: Tris-Asetat-EDTA
<b>TLR4</b>	: Toll Like Receptor 4
<b>TSA</b>	: Tryptic Soy Agar
<b>TSIA</b>	: Triple Sugar Iron Agar

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	İnsan ve hayvan türlerinde süt mikrobiyotası .....	13
Şekil 2.	<i>E.coli</i> izolatlarının patotiplerinin diyagramı.....	34
Şekil 3.	<i>E.coli</i> mastitisli ve sağlıklı süt örneklerinin OTU'larının benzerlik analiz grafiği.....	36
Şekil 4.	Örneklerin 2 boyutlu Temel Komponent Analiz (PCA) grafiği.....	38
Şekil 5.	Örneklerin 3 boyutlu Temel Komponent Analiz (PCA) grafiği.....	39
Şekil 6.	Örneklerin Shannon indeks grafiği.....	40
Şekil 7.	Örneklerin Chao1 indeks grafiği.....	41
Şekil 8.	Örneklerin Bray-Curtis, 2 boyutlu Temel Koordinat Analiz (PcoA) grafiği.....	43
Şekil 9.	Örneklerin Weighted Unifrac 2 boyutlu Temel Koordinat Analiz (PCoA) grafiği.....	44
Şekil 10.	Patotip ve kontrol gruplarının filumlarının yüzde olarak dağılımı .....	46
Şekil 11.	Patotip ve kontrol gruplarının familyalarının yüzde olarak dağılımı.....	49
Şekil 12.	Mastitis ve kontrol grubu örneklerinin genus düzeyinde mikrobiyom profili....	52
Şekil 13.	Patotip ve kontrol gruplarının genuslarının yüzde olarak dağılımı.....	53
Şekil 14.	Kontrol grubu ile <i>E. coli</i> mastitis grup 1 ve grup 2'nin Krona analizleri.....	56
Şekil 15.	Kontrol grubu ile <i>E. coli</i> mastitis grup 3 ve grup 4'ün Krona analizleri.....	57
Şekil 16.	Kontrol grubu ile <i>E. coli</i> mastitis grup 5'in Krona analizleri.....	58
Şekil 17.	Kontrol grubu ile <i>E. coli</i> mastitis grup 6'nın Krona analizleri.....	59
Şekil 18.	Kontrol grubu K1 örneği Krona analiz grafiği.....	60
Şekil 19.	Kontrol grubu K2 örneği Krona analiz grafiği.....	61
Şekil 20.	<i>E. coli</i> mastitis grup 5, Y7 örneği Krona analiz grafiği.....	62
Şekil 21.	<i>E. coli</i> mastitis grup 6, Y6 örneği Krona analiz grafiği.....	63

<b>Şekil 22.</b> Kontrol ve <i>E. coli</i> mastitis enfeksiyonlu süt örnek genuslarının Lefse (Lineer Diskriminant Etki) analiz grafiği.....	65
<b>Şekil 23.</b> Lefse (Lineer Diskriminant Etki) kladogramları: Genus düzeyinde taksonomik hiyerarşi grafiği.....	66

## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1.</b>	EMB Agar'da <i>E.coli</i> izolatı.....	32
<b>Resim 2.</b>	<i>E. coli</i> 16S rRNA <i>uidA</i> gen bölgesi PCR görüntüsü.....	33

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b>	Bakteriyel mastitis patojenlerinin sınıflandırılması.....	7
<b>Tablo 2.</b>	<i>E.coli</i> izolatlarının genotipik identifikasyonu ve patotiplerinin belirlenmesinde kullanılan primerler.....	19
<b>Tablo 3.</b>	<i>E. coli</i> 16S rRNA <i>uidA</i> gen bölgesi PCR ısıl döngü ve süre diyagramı.....	22
<b>Tablo 4.</b>	Multipleks PCR ısıl döngü ve süre diyagramı.....	23
<b>Tablo 5.</b>	Seçilen örneklerin DNA ölçümleri.....	26
<b>Tablo 6.</b>	Mikrobiyom analizleri için örneklerin grup dağılımları.....	27
<b>Tablo 7.</b>	Barkod PCR karışım oranları.....	28
<b>Tablo 8.</b>	Barkod PCR ısıl döngü ve süre diyagramı.....	29
<b>Tablo 9.</b>	Mikrobiyom analiz grupları.....	35
<b>Tablo 10.</b>	Kontrol grubu ve <i>E. coli</i> mastitis gruplarında en yüksek tespit edilen filumların karşılaştırma tablosu.....	47
<b>Tablo 11.</b>	Kontrol grubu ve <i>E. coli</i> mastitis gruplarında en yüksek tespit edilen familyaların karşılaştırma tablosu.....	50
<b>Tablo 12.</b>	Kontrol grubu ve <i>E. coli</i> mastitis gruplarında en yüksek tespit edilen genusların karşılaştırma tablosu.....	54

## ÖZET

### ***ESCHERICHIA COLI* KAYNAKLI SIĞIR MASTİTİSLERİNİN SÜT MİKROBİYOMUNDA MEYDANA GETİRDİĞİ DEĞİŞİKLİKLERİN ARAŞTIRILMASI**

**Seferoğlu Y. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veterinerlik Mikrobiyolojisi, Doktora Tezi, Aydın, 2026.**

**Amaç:** Bu çalışmada, sığır mastitislerinden izole edilen *Escherichia coli* suşlarının patotipik karakterizasyonu ve mastitisli sütlerin mikrobiyom profillerindeki değişimlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Aydın ilindeki çiftliklerden toplanan 115 mastitisli ve 20 sağlıklı süt örneği incelenmiştir. Tespit edilen *E. coli* izolatlarının patotipleri PCR ile belirlenerek gruplandırılan sütlerin mikrobiyom analizleri 16S rRNA dizileme yöntemiyle gerçekleştirilmiştir.

**Bulgular:** Örneklerin %20'sinde (n=23) *E. coli* tespit edilmiştir. İzolatların tamamı (%100) ETEC genlerini taşıırken, %56,52'sinin (n=13) shiga toksin genleri ve %26,09'unun (n=6) *eae* geni taşıdığı tespit edilmiştir. İzolatların %60,87'sinin (n=14) hibrit patotip karakterinde olduğu tespit edilmiştir. Mikrobiyom analizlerinde, sağlıklı sütlerde *Pseudomonadota* (%42,86) ve *Bacillota* (%41,65) filumlarının dengeli dağılımına karşın, mastitisli sütlerde *Pseudomonadota* filumunun (%91,77-%98,58) belirgin bir disbiyozis tablosu oluşturduğu ve *Enterobacteriaceae* familyasının baskın hale geldiği saptanmıştır. Alfa ve beta çeşitlilik analizleri, enfeksiyonun mikrobiyal çeşitliliği azalttığını ve sütün ekolojik yapısını tamamen değiştirdiğini ortaya koymuştur.

**Sonuç:** Çalışma sonucunda *E. coli*'nin bölgedeki sığır mastitis vakalarındaki prevalansı ile beraber süt mikrobiyomunda farklı patotiplerin yarattığı değişiklikler ortaya konarak süt mikrobiyomunun patotip bazında değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** 16S rRNA dizileme, Disbiyozis, *Escherichia coli*, Mikrobiyom, Patotip, Sığır mastitisi, Süt mikrobiyomu.

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF CHANGES IN MILK MICROBIOME IN BOVINE MASTITIS CAUSED BY *ESCHERICHIA COLI*

Seferoglu Y. Aydın Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Veterinary Microbiology, Doctorate Thesis, Aydın, 2026.

**Objective:** This study aimed to determine the pathotypic characterization of *Escherichia coli* strains isolated from bovine mastitis and the changes in the microbiome profiles of mastitic milk.

**Materials and Methods:** A total of 115 mastitic and 20 healthy milk samples collected from dairy farms in Aydın province were examined. The pathotypes of the detected *E. coli* isolates were identified via PCR, and microbiome analyses of the grouped milk samples were performed using the 16S rRNA sequencing method.

**Results:** *E. coli* was detected in 20% (n=23) of the samples. While all isolates (100%) carried ETEC genes, 56.52% (n=13) were found to carry shiga toxin genes and 26.09% (n=6) carried the *eae* gene. It was determined that 60.87% (n=14) of the isolates exhibited hybrid pathotype characteristics. In microbiome analyses, in contrast to the balanced distribution of *Pseudomonadota* (42.86%) and *Bacillota* (41.65%) phyla in healthy milk, it was found that the *Pseudomonadota* phylum (91.77-98.58%) created a distinct dysbiosis in mastitic milk, and the *Enterobacteriaceae* family became dominant. Alpha and beta diversity analyses revealed that the infection reduced microbial diversity and completely altered the ecological structure of the milk.

**Conclusion:** In conclusion, the prevalence of *E. coli* in bovine mastitis cases in the region was revealed along with the changes created by different pathotypes in the milk microbiome, leading to the conclusion that the milk microbiome should be evaluated on a pathotype basis.

**Keywords:** 16S rRNA Sequencing, Bovine mastitis, Dysbiosis, *Escherichia coli*, Milk microbiome, Pathotype.

# 1. GİRİŞ

Süt sığırcılığı endüstrisi için mastitis, küresel çapta önemli hastalıklardan biri olup hayvan işletmelerinde ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Meme dokusunun inflamasyonu olarak tanımlanan mastitis, süt veriminde önemli düşüşlere, süt kalitesinde bozulmalara ve yüksek tedavi maliyetlerine yol açarak işletmelerin ekonomisini doğrudan etkilemektedir (Goulart ve Mellata, 2022). Mastitis etiyojisi oldukça karmaşık olup, çok sayıda bakteriyel, çevresel ve yönetimsel faktörden etkilenmektedir. Bu etkenler arasında, *Escherichia coli* özellikle çevre kaynaklı klinik mastitis vakalarında en öne çıkan bakteriyel etkenlerden biridir. *E. coli* kaynaklı mastitisler, genellikle perakut ve şiddetli seyrederken bakterinin hücre duvarından salınan lipopolisakkarit (LPS) endotoksinleri nedeniyle akut sistemik semptomlara (endotoksemi) yol açabilmektedir (Germon ve diğerleri, 2025).

Önceki yıllarda sağlıklı meme bezi ve süt steril olarak kabul edilirken son yıllarda yeni nesil dizileme teknolojilerinde kaydedilen ilerlemeler ile böyle olmadığı ispatlanmıştır. Günümüzde, sağlıklı sığır sütünde dahi, meme fizyolojisinin de bir bileşeni olan kompleks bir mikrobiyal ekosistemin (mikrobiyota) varlığı bilimsel olarak kabul görmektedir (Oikonomou ve diğerleri, 2020). Bu süt mikrobiyotası, memenin lokal immün yanıtlarının modülasyonunda ve patojen kolonizasyonuna karşı biyolojik direnç mekanizmalarının oluşmasında kritik fonksiyonlar üstlenmektedir.

*E. coli* patojeninin meme içine girişi ve neden olduğu şiddetli inflamasyon, mikrobiyal dengeyi bozarak mikrobiyal çeşitliliğin azalmasına ve patojenik veya fırsatçı türlerin baskın hale gelmesi ile disbiyozis olarak adlandırılan duruma yol açmaktadır (Hoque ve diğerleri, 2022). Son yıllarda süt mikrobiyotası ile ilgili yapılan bilimsel çalışmalar mastitisin sadece patojenin varlığıyla değil, aynı zamanda memenin doğal mikrobiyal ekosistemindeki köklü değişimlerle de ilişkili olduğunu göstermektedir.

Bu doktora tez çalışmasının amacı, farklı patotipteki *E. coli* etkenlerinin neden olduğu sığır mastitislerinin sütün mikrobiyal kompozisyonu üzerinde meydana getirdiği spesifik değişiklikleri ve sağlıklı sığır sütlerinin mikrobiyal kompozisyonu ile farklılıklarını ortaya koymaktır. Elde edilecek bulgular ile mastitisin patogenez mekanizmalarının moleküler düzeyde aydınlatılmasına katkı sağlayacak, aynı zamanda süt mikrobiyomu temelli yeni tanı,

tedavi ve koruyucu stratejilerin geliştirilmesi için bilimsel bir zemin oluşturması amaçlanmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Mastitis, meme dokusunun parankimasında meydana gelen inflamatuvar bir reaksiyon olarak tanımlanmaktadır. Genellikle bakteriyel, viral, fungal kaynaklı enfeksiyonlar sonucunda şekillenen bu patolojik durum; süt veriminde azalma, sütün bileşiminde değişiklikler ve meme dokusunda patolojik hasarlar ile karakterizedir (Cobirka ve diğerleri, 2020). Süt sığırcılığı işletmelerinde ekonomik kayıpların en önemli nedenlerinden biri olarak kabul edilen mastitis, hem hayvan refahını olumsuz etkilemekte hem de halk sağlığı açısından risk teşkil etmektedir (Cheng ve Han, 2020).

### 2.1. Sığır Mastitisinin Etiyolojisi ve Patogenezi

Etiyolojik ajanlar, bulaşma yollarına göre başlıca bulaşıcı (kontagiyöz) ve çevresel (çevre kaynaklı) olarak iki ana gruba ayrılır. *E. coli*, tipik bir çevresel patojen olup, sığır dışkısı, altlık ve toprak gibi çevresel rezervuarlardan meme başına bulaşır. *E. coli* mastitisinin patogenezi, büyük ölçüde bakterinin çoğalma hızı ve salgıladığı endotoksinlerin etkisine bağlıdır. LPS, meme dokusundaki immün hücreler (özellikle makrofajlar) tarafından tanınır ve bu tanıma, pro-inflamatuvar sitokinlerin (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 gibi) hızla salınmasına neden olur. Bu sitokin fırtınası, meme içine büyük miktarda nötrofil göçünü tetikler ve klinik olarak ateş, şişlik ve sütte pıhtılaşma gibi akut inflamasyon belirtileriyle sonuçlanır (Dahlberg ve diğerleri, 2023). Nötrofiller, patojeni ve toksinleri temizlemede anahtar rol oynasa da, aşırı inflamatuvar yanıt meme dokusunda kalıcı hasara yol açabilir.

### 2.2. Mastitisin Klinik Sınıflandırması

Mastitisler, klinik belirtilerin şiddetine, süresine ve sütün fiziksel görünümündeki değişikliklere göre subklinik mastitis ve klinik mastitis şeklinde temel olarak iki ana grupta sınıflandırılmaktadır (Belay, 2022; Cobirka ve diğerleri, 2020).

### **2.2.1. Subklinik Mastitis**

Subklinik mastitis, meme dokusunda veya sütte gözle görülür herhangi bir değişikliğin bulunmadığı, ancak süütün somatik hücre sayısında (SHS) artış ve süt veriminde düşüş ile seyreden enfeksiyon tipidir. Bu form, klinik mastitise oranla 15-40 kat daha yaygın görülmesi nedeniyle işletmeler için gizli bir ekonomik tehdit oluşturmaktadır. Teşhis genellikle California Mastitis Test (CMT) gibi saha testleri veya laboratuvar ortamında SHS ölçümü ve mikrobiyolojik kültür yöntemleri ile konulmaktadır (Zigo, 2022).

### **2.2.2. Klinik Mastitis**

Klinik mastitis, memede inflamasyon belirtilerinin (şişkinlik, ağrı, sıcaklık, kızarıklık) ve sütte fiziksel değişikliklerin (pıhtı, kan, sulu görünüm) belirgin olduğu durumdur (Belay, 2022). Klinik mastitisler kendi içinde şiddet derecelerine göre perakut, akut, subakut ve kronik mastitis şeklinde sınıflandırılmaktadır.

#### **2.2.2.1. Perakut Mastitis**

Aniden gelişen, sistemik belirtilerin (yüksek ateş, iştahsızlık, depresyon, dehidrasyon) çok şiddetli olduğu ve bazen ölümlle sonuçlanabilen formdur (Cheng ve Han, 2020).

#### **2.2.2.2. Akut Mastitis**

Meme lobunda belirgin inflamasyon belirtileri ve sütte ciddi değişiklikler mevcuttur. Sistemik belirtiler perakut forma göre daha hafiftir (Cheng ve Han, 2020).

### **2.2.2.3. Subakut Mastitis**

Sistemik belirtilerin görülmediği, meme lobundaki değişikliklerin hafif olduğu ve sütün fiziksel yapısındaki bozulmanın (küçük pıhtılar gibi) sınırlı kaldığı formdur (Cheng ve Han, 2020).

### **2.2.2.4. Kronik Mastitis**

Enfeksiyonun uzun süre devam etmesi sonucunda meme dokusunda fibrozis ve sertleşme şekillenmesiyle karakterizedir. Bu vakalarda zaman zaman klinik alevlenmeler görülebilir (Cobirka ve diğerleri, 2020).

## **2.3. Mastitise Neden Olan Bakteriyel Etkenlerin Sınıflandırması**

Mastitise yol açan mikroorganizmalar, bulaşma yolları ve rezervuar kaynaklarına göre; bulaşıcı (kontagiyöz), çevresel patojenler, fırsatçı ve diğer olmak üzere dört ana grupta incelenmektedir.

### **2.3.1. Bulaşıcı (Kontagiyöz) Patojenler**

Bu gruptaki etkenlerin temel kaynağı enfekte meme loblarıdır. Bulaşma genellikle sağım sırasında sağımcı elleri, ortak kullanılan havlular veya sağım başlıkları aracılığıyla gerçekleşmektedir (Cobirka ve diğerleri, 2020). Önemli bulaşıcı patojenler olarak *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis* ve *Corynebacterium bovis* belirtilmektedir (Haxhiaj, 2022; Gonal, 2025).

Bu etkenler genellikle subklinik ve kronik enfeksiyonlara neden olma eğilimindedirler ve sürü içerisinde hızla yayılabilirler.

### 2.3.2. Çevresel Patojenler

Çevresel patojenlerin kaynağı hayvanın yaşadığı ortamdır (altlık, gübre, su, toprak). Bu mikroorganizmalar genellikle sağımlarında, meme başı kanalının açık olduğu dönemlerde memeye giriş yaparlar (Cobirka ve diğerleri, 2020). Çevresel patojenler koliform ve çevresel streptokoklar olmak üzere iki sınıfta incelenmektedirler.

#### 2.3.2.1. Koliform Bakteriler

*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* ve *Enterobacter spp.* bu grubun en yaygın üyeleridir ve genellikle şiddetli klinik mastitis tablolarına yol açarlar (Haxhiaj, 2022).

#### 2.3.2.2. Çevresel Streptokoklar

*Streptococcus uberis* ve *Streptococcus dysgalactiae* hem çevresel hem de bazen bulaşıcı karakter sergileyebilen fırsatçı patojenlerdir (Cobirka ve diğerleri, 2020).

### 2.3.3. Diğer Bakteriyel Etkenler

Son yıllarda minör patojenler olarak adlandırılan *Koagülaz Negatif Stafilokoklar* (KNS), hem subklinik vakalarda hem de hafif seyirli klinik vakalarda sıkça izole edilmeye başlanmıştır (Lopes, 2022). Bunun dışında bu grupta *Trueperella pyogenes*, *Nocardia spp.* ve *Bacillus spp.* de bulunmaktadır.

Bakteriyel mastitis patojenleri genel sınıflandırması Tablo 1 'de belirtilmiştir.

**Tablo 1.** Bakteriyel mastitis patojenlerinin sınıflandırılması (Cobirka ve diğerleri 2020); Haxhij (2022); Yu (2025).

<b>Patojen Grubu</b>	<b>Başlıca Etkenler</b>	<b>Temel Rezervuar</b>	<b>Bulaşma Yolu</b>
Bulaşıcı	<i>S. aureus</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>Mycoplasma spp.</i>	Enfekte Meme	Sağım Süreci
Çevresel	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella spp</i> , <i>S. uberis</i>	Altılık, Gübre, Su	Sağım Arası / Çevre
Fırsatçı	<i>Koagülaz Negatif Stafilokoklar (KNS)</i>	Meme Derisi	Yaralanma / Sağım
Spesifik	<i>Trueperella pyogenes</i> , <i>Bacillus spp</i> , <i>Nocardia spp.</i>	Çevre / Diğer Dokular	Travma / Sinekler

Bu sınıflandırma, mastitis kontrol programlarının ve tedavi stratejilerinin belirlenmesinde kritik bir öneme sahiptir.

#### **2.4. *Escherichia coli* Kaynaklı Mastitis**

*Escherichia coli*, gram negatif, fakültatif anaerob bir bakteri olup, çevresel mastitis etkenlerinin başında gelmektedir. Enfeksiyon genellikle dışkı, altılık veya kirli su kaynaklı kontaminasyon yoluyla meme başı kanalı aracılığı ile gerçekleşmekte olup *E. coli* kaynaklı mastitis vakalarının şiddeti, bakterinin virülans faktörleri ile konağın inflamatuvar yanıtının hızı ve büyüklüğü ile oluşmaktadır (Burvenich ve diğerleri, 2003).

Sığır mastitisi olgularından izole edilen *Escherichia coli* suşları, genetik ve fenotipik açıdan oldukça heterojen bir yapı sergilemektedir. Geleneksel olarak *E. coli*, bağırsak enfeksiyonlarına neden olan enteropatojenik (InPEC) ve bağırsak dışı enfeksiyonlara yol açan ekstraintestinal patojenik (ExPEC) olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Ancak mastitis olgularından izole edilen suşların kendine özgü özellikleri, bilim dünyasında meme patojenik *Escherichia coli* (MPEC) olarak adlandırılan yeni bir patotip kavramının doğmasına yol açmıştır (Blum ve diğerleri, 2015; Campos ve diğerleri, 2022; Goulart ve Mellata, 2022; Orsi ve diğerleri, 2023; Richards ve diğerleri, 2015).

MPEC, meme dokusuna adapte olmuş ve burada klinik enfeksiyon oluşturma yeteneğine sahip *E. coli* suşlarını tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Diğer ExPEC gruplarından farklı

olarak MPEC suşlarının, meme bezi epiteline tutunma ve burada hayatta kalma stratejilerinin geliştirmiş olduğu belirtilmektedir (Blum ve diğerleri, 2015). MPEC suşlarının sınıflandırılması ve bir patotip olarak kabul edilmesi hala tartışmalı bir konu olsa da, genomik çalışmalar bu suşların genellikle çevresel suşlardan ve bağırsak komensallerinden farklı genetik kümelere sahip olduğunu göstermektedir. Bazı araştırmacılar bu suşların spesifik virülans faktörlerinden ziyade, meme dokusundaki demir gibi bazı kaynakları efektif kullanabilme yetenekleri sayesinde patojenite kazandığını savunmaktadır (Blum ve diğerleri, 2018; Jung ve diğerleri, 2025; Olson ve diğerleri, 2018; Orsi ve diğerleri, 2023; Rahmani ve diğerleri, 2021; Richards ve diğerleri, 2015).

Meme dokusuna giren *E. coli*, hızla çoğalarak hücre duvarındaki endotoksinleri (LPS) serbest bırakır. LPS, meme dokusundaki makrofajlar ve epitel hücreleri üzerindeki Toll benzeri reseptörler (TLR4) tarafından tanınır. Bu etkileşim, pro-inflamatuar sitokinlerin (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) yoğun salınımına ve nötrofillerin hızla meme içine göç etmesine (kemotaksi) neden olur. Bu aşırı inflamatuvar yanıt, sütün somatik hücre sayısını (SHS) milyonlara çıkarırken, şiddetli olgularda sistemik şok, yüksek ateş ve hatta ölüm ile sonuçlanabilir (Petzl ve diğerleri, 2012). Mastitis gelişiminde özellikle primer çevresel mastitis patojeni olarak tanımlanan *E. coli* kaynaklı klinik mastitis olgularında süt mikrobiyal çeşitliliğinde belirgin bir azalma yaşanır ve mikrobiyota *E.coli* baskınlığı altına girmesi sonucu disbiyozis şekillenmektedir (Vasquez ve diğerleri 2019). Çalışmalar, *E. coli* mastitisi tespit edilen ineklerde enfeksiyon öncesinde mikrobiyal çeşitliliğin diğer mastitis etkenlerine kıyasla daha düşük olduğunu ve bu durumun hayvanı enfeksiyona yatkın hale getirerek patogenezi önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir (Falentin ve diğerleri, 2016). Dahlberg ve diğerleri (2023), *E. coli*'nin sadece süt mikrobiyotasını değiştirmekle kalmadığını aynı zamanda meme içi ortamın biyokimyasal yapısını da bozduğu tespit etmişlerdir. LPS kaynaklı inflamasyon, süt pH'ını yükseltmekte ve laktoz konsantrasyonunu düşürmektedir. Bu değişim, *Lactobacillus* gibi kommensal bakterilerin önemli ölçüde inhibisyonuna sebep olmaktadır. Son yıllarda *E. coli* gibi çevresel mastitis etkenlerinin enfeksiyon riskini arttırdığı bildirilen bağırsak-meme aksı (gut-mammary axis) hipotezi üzerinde daha fazla durulmaktadır. Sığırlarda bağırsak mikrobiyotasındaki disbiyozisin sistemik inflamasyonu tetikleyerek meme dokusunun patojenlere karşı direncini zayıflattığı ve bu hayvan dışkılarının açık meme kanalı ile kontaminasyonu sonucunda çevresel mastitis etkenlerinin enfeksiyon riskini arttırdığı belirtilmektedir (Wang ve diğerleri, 2025).

Sığır mastitisi olgularında her ne kadar MPEC kavramı ön planda olsa da meme içi enfeksiyonlarda sindirim sistemi kaynaklı genel patotiplerin varlığı halk sağlığı açısından

önemli yer tutmaktadır (Nüesch-Inderbilen ve diğerleri, 2019). Shiga toksin üreten *E. coli* (STEC), insanlarda kanlı diyare ve Hemolitik Üremik Sendrom (HÜS) gibi ciddi tablolara yol açabilen önemli bir gıda kaynaklı patojendir. Sığırlar, STEC suşlarının (özellikle O157:H7 serotipi) ana rezervuarı olarak kabul edilmekte olup STEC suşları, mastitisli ineklerin sütünden de izole edilebilmektedir. Çalışmalar, mastitisli sütlerde *stx1* ve *stx2* (shiga toksin) genlerini taşıyan suşların varlığını ortaya koymaktadır (Lira ve diğerleri, 2004; Momtaz ve diğerleri, 2012; Murinda ve diğerleri, 2019). Bu suşların meme dokusunda klinik olarak semptom oluşturma riski taşıdıkları intimin (*eae*) gibi adezyon faktörlerine bağlıdır. Mastitisli bir memeden salgılanan STEC, çiğ süt tüketimi veya süt ürünleri yoluyla insanlara bulaşarak zoonotik bir risk oluşturmaktadır. Özellikle subklinik seyreden STEC enfeksiyonları, sütün kalitesini bozmadan patojeni yayma potansiyeline sahiptir (Murinda ve diğerleri, 2019).

EPEC, shiga toksini üretme yeteneğinden yoksun olmasına rağmen, genomunda taşıdığı *eae* (intimin) geni aracılığıyla bağırsak epitel hücrelerinde karakteristik bağlanma özelliği göstermesi ile tanımlanan bir patotiptir. Bazı araştırmalar, klinik mastitis olgularından izole edilen *E. coli* suşlarının bir kısmının atipik EPEC (aEPEC) özellikleri taşıdığını göstermektedir (Dego ve diğerleri, 2012; Pereira ve diğerleri, 2024; Rangel ve Marin, 2009). aEPEC suşları, meme epitel hücrelerine tutunma yetenekleri sayesinde meme içinde kolonize olabilir ve inflamatuvar yanıtı tetikleyebilir. Mastitis kaynaklı EPEC suşlarında *eae* geninin yanı sıra, çeşitli fimbrial yapıların ve demir kazanım sistemlerinin varlığı, bu patotipin meme dokusuna adaptasyonunda rol oynamaktadır (Campos ve diğerleri, 2022).

ETEC'in patojenitesi, temel olarak konak hücresine tutunmayı sağlayan kolonizasyon faktörleri ve salgılanan enterotoksinlere (LT ve ST) dayanır. ETEC suşları, bağırsak epitelinde kullandıkları F5, F41 veya F17 gibi fimbrial adezinleri, meme başı kanalından giriş yaptıktan sonra meme epiteline tutunmak için de kullanabilirler. Bu tutunma ile etken sütün dışarı atılmasını engelleyerek enfeksiyonun oluşmasını sağlamaktadır (Goulart ve Mellata, 2022). Yapısal olarak kolera toksinine benzeyen LT (ısıya duyarlı enterotoksin), adenilat siklaz aktivitesini artırarak hücre içi cAMP (siklik adenzin monofosfat) seviyelerini yükseltir. Bağırsaklarda sıvı kaybına yol açan bu mekanizma meme epitel hücrelerinde de iyon dengesini bozarak sütün ozmotik basıncını ve bileşimini değiştirmektedir (Osman ve diğerleri, 2012; Shpigel ve diğerleri, 2008). Guanilat siklaz aktivasyonu üzerinden cGMP (siklik guanozin monofosfat) artışına neden olmaktadır (Weiglmeier ve diğerleri, 2010). Meme dokusunda ST (ısıya dayanıklı enterotoksin) varlığı, lokal inflamatuvar yanıtın şiddetlenmesine ve vasküler geçirgenliğin artmasına neden olmaktadır. Bazı çalışmalar, ETEC kaynaklı mastitislerde

gözlenen perakut seyirli ödem bu toksinlerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Weiglmeier ve diğerleri, 2010).

Karakteristik adezyon modeli sergileyen EAEC patotipi kronik diyare ile ilişkilidir. Mastitisli sütlerde izolasyonu nadir olsa da, çevresel kaynaklı bulaşmalar sonucunda süt mikrobiyotasında tespit edilebilmektedir (Goulart ve Mellata, 2022).

Kolon epitelini istila ederek dizanteri benzeri tablo oluşturan EIEC grubu genetik olarak *Shigella spp.* ile yakından ilişkilidir. Sığır mastitislerinde patojenik potansiyeli düşük ve genellikle insan kaynaklı kontaminasyon göstergesi olarak kabul edilir (Leimbach ve diğerleri, 2017).

## 2.5. Süt Mikrobiyotası

Süt mikrobiyolojisi, uzun yıllar boyunca sütün meme bezinde steril olduğu ve yalnızca sağım sırasında çevresel kontaminasyonla mikroorganizma kazandığı paradigması üzerine inşa edilmiştir. Ancak son on yılda bakteriyolojik kültürden bağımsız yöntemlerin özellikle gelişen yeni nesil dizileme (NGS) teknolojisi bu anlayışı değiştirmiştir. Günümüzde sığır sütü, kendine özgü taksonomik çeşitliliği, genetik kapasitesiyle beraber konakçı ile sürekli etkileşim halinde olan dinamik bir mikrobiyal ekosistem olarak tanımlanmaktadır (Oikonomou ve diğerleri, 2020).

Süt, temel olarak yağ globülleri ve kazeinden (toplam süt proteininin %80'ini oluşturan birincil süt protein grubu) oluşan karmaşık bir biyolojik içeriktir. Kazeinlerin çöktürülmesinden sonra sıvı fazda süspansiyon halinde bulunan diğer tüm proteinler, peynir altı suyu proteinleri adı altında gruplandırılmaktadır (Dalgleish ve Corredig, 2012). Çözünür kazein olmayan proteinlere ek olarak, peynir altı suyu süpernatanı (süt serumu) ayrıca su ve laktoz içerir; sığır sütündeki serum proteinlerinin iki ana bileşeni  $\alpha$ -laktalbümin ve  $\beta$ -laktoglobulindir. Tipik olarak, süt örneklerinden DNA izolasyonu kazeinin peletlenmesiyle gerçekleştirilmektedir (Quigley ve diğerleri, 2012). Quigley ve diğerleri (2012), çiğ süt ve türevlerinden DNA izolasyonu için yedi farklı yöntemi, DNA verimi ve saflığının yanı sıra aşağı akış PCR için şablon kalitesi açısından göreceli başarılarını değerlendirmişlerdir. Aynı çalışmada, DNA, farklı enzimatik ve mekanik hücre lizis protokollerine tabi tutulan kazein peletinin yeniden süspansiyonuyla izole edilmiştir. Ancak, bazı bakteri türleri süt ortamında çeşitlendirilmiş bir

yaşam döngüsüne sahiptir ve bakteri kolonilerinin süt ürünlerindeki büyümesi, konumu ve dağılımı süt gıda endüstrisi için önemli faktörlerdir (Lima ve diğerleri, 2018).

Süt mikrobiyotası üzerine yapılan araştırmalar çoğunlukla kadınlarda (Fitzstevens ve diğerleri, 2016; Hunt ve diğerleri, 2011; Jost ve diğerleri, 2013) ve ineklerde (Addis ve diğerleri, 2016; Falentin ve diğerleri, 2016; Oikonomou ve diğerleri, 2014) yürütülmüştür. Sonrasında keçi, koyun, eşek, manda, su geyiği, ren geyiği veya fare gibi diğer memelilerde de bazı çalışmalar yapılmıştır (Catozzi ve diğerleri, 2017; Li ve diğerleri, 2017; McInnis ve diğerleri, 2015; Quigley ve diğerleri, 2013; Soto Del Rio ve diğerleri, 2017; Treven ve diğerleri, 2015). Süt mikrobiyotası üzerine yapılan çoğu çalışma, genellikle meme uçlarının veya memelerin dikkatlice temizlenmesini takiben manuel sağım yoluyla toplanan sütü incelemiştir (Boix-Amoròs ve diğerleri, 2016; Jost ve diğerleri, 2013; Oikonomou ve diğerleri, 2012).

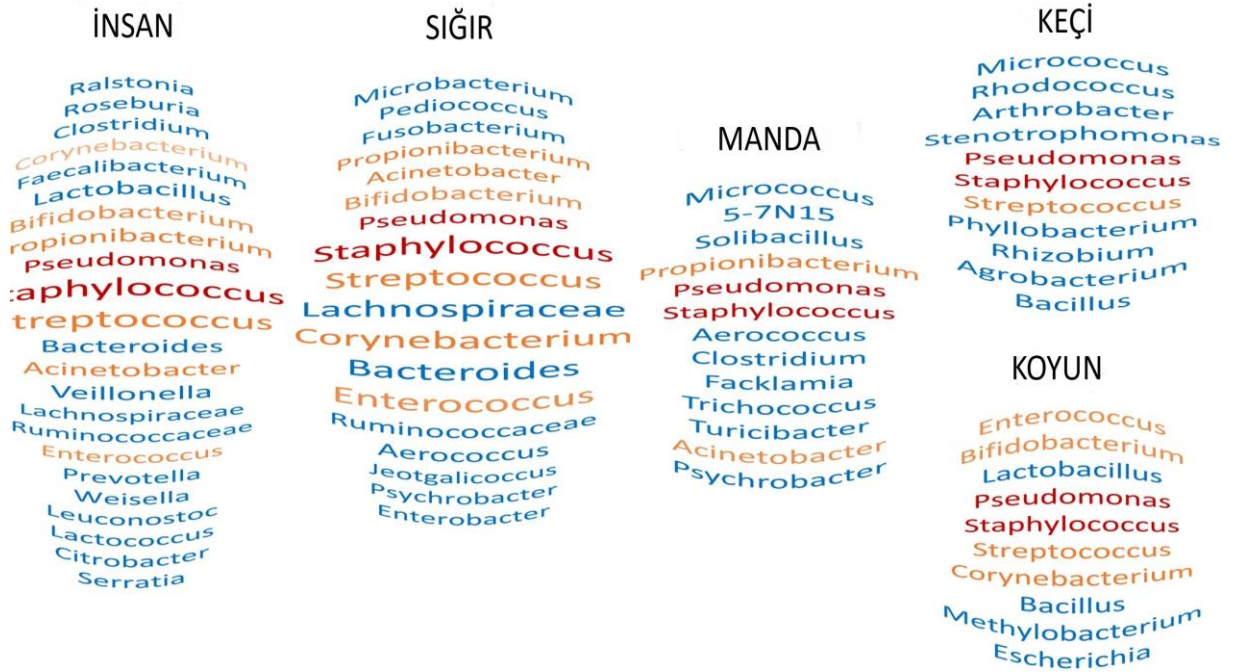
Süt DNA ekstraksiyon protokollerinde fiziksel işlemler (boncukla lizis gibi) bu işlemi içermeyen yöntemlere kıyasla mikrobiyal DNA izolasyonunda daha yüksek doğruluk sağlamış olup sonuçlarda orjinal bakteri popülasyonunu daha net temsil eden bir topluluk sunmuştur. (Yuan ve diğerleri, 2012). Ayrıca, boncuk ile mekanik lizis (bead-beating) tabanlı kitler son zamanlarda sağlıklı ve mastitisli süt örneklerinin yanı sıra kolostrum gibi daha zorlu süt örneklerinden DNA izolasyonunda da uygulanmıştır (Bonsaglia ve diğerleri, 2017; Ganda ve diğerleri, 2016; Lima ve diğerleri, 2017).

Sütten DNA ekstraksiyonunda, sütün yağ globülleri ve kazeinden oluşan karmaşık bir biyolojik içerik olmasından dolayı yapılan çalışmalarda fraksiyonel dağılımın mikrobiyota temsili üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla ve mikrobiyotanın daha sağlıklı ortaya çıkarılması için santrifüj ve ayırma işlemleri uygulanmaktadır. Geleneksel kazein peleti eldesi için örnekler standart hızlarda santrifüj edilerek, süpernatant faz (süt serumu) uzaklaştırılarak çöken kazein matrisi DNA izolasyonu için ana şablon olarak belirlenmektedir (Quigley ve diğerleri, 2012). Yağ fazı analizlerinde, krema veya süt yağı globüllerine de sıklıkla bağlanan bakterilerin (özellikle Stafilokok türleri) izolasyonu hedeflenmiştir (Lima ve diğerleri, 2018). Optimize edilmiş kombine protokollerde ise, PCR hassasiyetini artırmak amacıyla sütün yağ fazı ve kazein peleti birleştirilerek tek bir şablon haline getirilmiştir (Gao ve diğerleri, 2007). Boncuk ile yapılan mekanik lizis (bead-beating) içeren protokoller mikrobiyal hücre duvarlarının, özellikle Gram pozitif bakterilerin etkin bir şekilde parçalanmasını sağlamak amacıyla sütten DNA ekstraksiyonlarında uygulanmaktadır. Bu işlemde, farklı çaplardaki (genellikle 0.1 mm ile 0.5 mm arası) steril zirkonyum veya silika boncuklar kullanılarak yüksek hızlı vibrasyon ile hücre parçalanması gerçekleştirilmektedir. Yapılan çalışmalar, bu mekanik

işlemin kimyasal veya enzimatik lizis yöntemlerine kıyasla daha yüksek DNA verimi ve saflığı sağladığını, dolayısıyla orijinal bakteri popülasyonunu daha doğru temsil eden bir genomik kütüphane oluşturduğunu göstermiştir (Lima ve diğerleri, 2017; Xue ve diğerleri, 2018). Lizis sonrası serbest kalan DNA, ticari kit protokollerine (örneğin; Qiagen DNeasy veya benzeri kolon tabanlı sistemler) uygun olarak saflaştırılmaktadır. İzolasyon sürecinde protein kontaminasyonunu minimize etmek amacıyla proteinaz K uygulaması ve ardından %99 etanol ile çöktürme veya spin kolon filtrasyon adımları bir çok ticari ekstraksiyon kitinde uygulanmaktadır. Ekstraksiyon yöntemlerinin başarısı; amplikon konsantrasyonu, protokoller arası uyum, mikrobiyal temsil kabiliyeti ve sonuçların tekrarlanabilirliği (reproducibility) kriterlerine göre istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Özellikle sağlıklı ve mastitisli meme loblarından elde edilen örneklerde *E. coli*, *Klebsiella spp.* ve *Streptococcus spp.* gibi patojenlerin tespit doğruluğu, seçilen ekstraksiyon yönteminin etkinliğini belirleyen temel parametre olarak kabul edilmektedir (Lima ve diğerleri, 2018; Schwenker ve diğerleri, 2022; Taponen ve diğerleri, 2019).

Murphy ve diğerleri (2017) 10 anne ve bebeği inceleyerek insan sütü mikrobiyotasında 207'den fazla bakteri cinsi tanımlamıştır. Bu çalışmada, süt mikrobiyotası bebek dışkısına kıyasla daha yüksek bir çeşitlilik sergilemiştir. Pärnänen ve diğerleri (2018), ise shotgun metagenomik analiz ile bebek dışkısına kıyasla sütte daha düşük bir bakteriyel çeşitlilik bildirmişlerdir. Hoque ve diğerleri (2019), sağlıklı sığır sütünde; shotgun metagenomik dizileme ile 146 bakteri suşu tanımlamışlardır.

Süt mikrobiyotası üzerine yapılan çalışmalarda yapılan genel değerlendirmede insan ve inek sütü arasında ortak taksonların bulunduğu görülmektedir (Şekil 1). *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Corynebacterium* ve *Enterococcus*, hem insan hem de sığır sütü mikrobiyotası üzerine yapılan çalışmalarda en çok bulunan baskın cinsler arasında olduğu belirtilmektedir (Addis ve diğerleri, 2016; Boix-Amoròs ve diğerleri, 2016; Derakhshani ve diğerleri, 2018a; Jiménez ve diğerleri, 2015; Murphy ve diğerleri, 2017; Oikonomou ve diğerleri, 2014; Urbaniak ve diğerleri, 2016). Bununla beraber Metzger ve diğerleri (2018) *Pseudomonas* cinsinin tespitini negatif kontrol örneklerinde de yüksek oranda bulduklarından dolayı kontaminasyon olarak da değerlendirilebileceğini belirtmişlerdir.



Şekil 1. İnsan ve hayvan türlerinde süt mikrobiyotası (Oikonomou ve diğerleri, 2020).

Yapılan çalışmalarda süt sığırlarında, insanlara göre süt emme periyodunun çok daha erken olması inek ve buzağı arasındaki etkileşimin çok sınırlı olduğu belirtilmektedir. Bununla birlikte, sığır sütü mikrobiyotasının da hem aşama hem de laktasyon sayısı ile zamanla değiştiği bulunmuştur. Lima ve diğerleri (2018), kolostrumun karmaşık ve çeşitli bir mikrobiyota barındırdığı ve bu mikrobiyota zenginliğinin, çoklu doğum yapmış sığırlara kıyasla ilk doğum yapanlarda önemli ölçüde daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Taksonomik profiller ve alfa çeşitliliği de laktasyon evresiyle ilişkili olup, laktasyonun ilk haftasında değişiklik gösterdiği belirtilmektedir (Derakhshani ve diğerleri, 2018b). Ayrıca, klinik olarak sağlıklı Holstein süt ineklerinde, kuru dönem ve doğumdan hemen sonraki zamanlarda meme kanalı ve meme salgılarının (süt veya kolostrum) mikrobiyotası arasında farklılıklar gözlemlendiği tespit edilmiştir (Derakhshani ve diğerleri, 2018c).

Coğrafyanın farklı mikrobiyota modellerinde rol oynadığı çalışmalarda belirtilmektedir. Süt mikrobiyotası ile ilgili coğrafi etkiye dair bir çalışmada İspanyol, Fin, Güney Afrikalı ve Çinli kadınların süt mikrobiyotaları arasında ülkeler arası önemli farklılıklar olduğunu göstermiştir (Kumar ve diğerleri, 2016). Ancak bu coğrafi farklılıkların çevre, diyet ve hatta genetik gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanabileceği belirtilmektedir. Sığırlarda, coğrafyanın etkisi direkt olarak incelenmemiş olsa da, süt mikrobiyotasının çiftlik ortamı ve yönetim uygulamalarıyla ilişkili olduğu çalışmalarla ortaya konulmuştur (Derakhshani ve diğerleri,

2018a; Doyle ve diğerleri, 2017; Frétiin ve diğerleri, 2018; Metzger ve diğerleri, 2018). Metzger ve diğerleri (2018), altlık materyali ile sığır sütü mikrobiyota profilleri arasında bir ilişki bildirmişlerdir. Altlık olarak gübre, talaş, kum ve geri dönüşümden elde edilen kum materyallerini incelemişlerdir. Gram negatif bakteri yoğunluğu, koliform grubu bakteriler, *Klebsiella* ve *Streptococcus* türleri yönünden gruplandırarak yaptıkları incelemede grupların hepsi gübrede en yoğun olarak tespit edilirken; geri dönüşümden elde edilen kum örnekleri grupların en düşük olarak tespit edildiği materyal olduğunu belirlemişlerdir. Altlıklara göre yaptıkları süt örneklemelerinde mikrobiyotanın altlık materyali ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Doyle ve diğerleri (2017) ise sağım öncesi meme başı temizliği dahil olmak üzere sağım uygulamalarının süt mikrobiyotasını etkilediğini bildirmişlerdir.

Beslenmenin de hem insanlarda hem sığırlarda süt mikrobiyotasını etkilediği bildirilmiştir. İnsan sütü bakteri popülasyonunun belirli yağ asidi profilleriyle ilişkili olması diyet ile süt bileşimi arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir (Kumar ve diğerleri, 2016). Maternal besin alımıyla bu ilişki, Williams ve diğerleri (2017) tarafından da bildirilmiş, doymuş ve tekli doymamış yağ asitleri, karbonhidratlar ve protein alımı ile sütün bakteriyel popülasyonundaki çeşitli taksonların bolluğu arasında ilişki gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, sığırlarda Zhang ve diğerleri (2015) de diyetin sığır sütü mikrobiyotası üzerinde olası bir etkisi olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu çalışmada yüksek konsantre diyet, sütteki bazı mastitise neden olan patojenlerin daha yüksek yoğunluğu ile ilişkilendirilmiştir.

Lima ve diğerleri (2018), sağlıklı sığır sütü örneklerinin farklı fraksiyonlarında (süt, süt yağı, pelet) yapılan sekans dizi analizleri sonucunda *Bacillota* (%57,7) ve *Pseudomonata* (%26) filumlarının baskın olduğunu; *Ruminococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcaceae*, *Bacillaceae*, *Streptococcaceae* ve *Pseudomonadaceae*'nin de tespit edilen en yaygın bakteri familyaları olduğunu tespit etmişlerdir.

Porcellato ve diğerleri (2020), sağlıklı sığırlarda sütün esas olarak *Corynebacteriaceae* ve *Staphylococcaceae* familyalarının oluşturduğu karmaşık bir mikrobiyotaya sahip olduğunu belirterek bu iki familyayı tüm ineklerde tespit ettiklerinden dolayı meme sağlığı için potansiyel etkileri olan çekirdek mikrobiyotanın bir parçası olarak tanımlamışlardır. *Ruminococcaceae* ve *Aerococcaceae*'nin yoğunluk olarak bu familyaları takip ettiğini bildirmişlerdir. Sekans sonuçlarına göre *Corynebacteriaceae* familyasının baskın olarak *Corynebacterium bovis*'den oluştuğunu; *Staphylococcaceae* familyasında ise en düşük oranda (%1,29) mastitis ile ilişkili patojen tür olan *Staphylococcus aureus* olarak tespit ederlerken baskın olarak *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. chromogenes* ve *S. xylosus*'dan oluştuğunu tespit etmişlerdir.

Sadece *Corynebacterium* cinsini içeren *Corynebacteriaceae* ailesi, daha önce insanlarda deriyle ilişkili mikrobiyomun bir parçası olarak tanımlanmış ve ayrıca meme kanalı ve rahim gibi sığırların vücut bölgelerinde de bulunmuştur (Ballas ve diğerleri, 2020; Braem ve diğerleri, 2012; Callewaert ve diğerleri, 2013; Dimitriu ve diğerleri, 2019). Bu sebeple sağlıklı süt örneklerinde *Corynebacteriaceae*'nin yüksek yoğunlukta bulunması büyük oranda deriyle ilişkili mikrobiyom ile ilişkilendirilebilir. *Corynebacterium* türlerinin meme içindeki rolü hala bilinmemekle birlikte mastitis patojenlerine karşı koruyucu bir rolü olabileceği düşünülmektedir. *Corynebacterium* ve diğer genuslar arasında denge için rekabet ve patojen bakterilerin inhibisyonu, daha önce mikrobiyom çalışmalarında bildirilmiştir (Bomar ve diğerleri, 2016; Hardy ve diğerleri, 2019).

Güncel bir çok süt mikrobiyomu çalışmasından farklı olarak sağlıklı meme bezlerinin mikrobiyotası üzerindeki kuru dönem tedavisinin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, en bol bulunan cinsler *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Staphylococcus* ve *Psychrobacter* olarak tanımlanmış, yani *Corynebacterium* cinsi haricinde diğer alıntılanan çalışmalarda bildirilenlerden farklı cinsler olduğu ortaya konulmuştur. Çalışma sonucunda antimikrobiyal kuru dönem tedavisi süt mikrobiyomunda herhangi bir etkiye sahip olmadığı belirtilmiştir (Bonsaglia ve diğerleri, 2017). Derakhshani ve diğerleri (2018c) ise penisilin ve novobiosin kombinasyonu kullanılarak yapılan kuru dönem tedavisinden sonra süt ve kolostrum örneklerinde oldukça baskın olarak *Pseudomonata* filumuna ait bakteri cinslerinin arttığını raporlamışlardır.

## 3. GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Gereç

#### 3.1.1. Örnekler

Araştırmamızda Aydın ili sınırları içerisinde 100 baş ve üzeri hayvan varlığına sahip belirlenen 4 çiftlikten meme bölgesinde kızarıklık, şişlik ve sütlerinde pıhtılaşma gibi mastitis semptomları gözlenen 115 adet mastitisli inek sütü ve aynı çiftliklerden mastitis geçmişi olmayan 20 sağlıklı inek sütü olmak üzere toplamda 135 adet süt örneği toplandı. Süt örnekleri National Mastitis Council (NMC) tarafından bildirilen şartlarda aseptik şartlarda toplanmıştır. Hayvanların meme başları %70 etanol ile dezenfekte edildikten sonra mastitisli memelerden yaklaşık 10 ml süt koruyucu içermeyen steril plastik şişelere alındı (National Mastitis Council [NMC], 2016). Alınan süt örnekleri strafor içerisinde kuru buz ile Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalına en kısa sürede getirilerek analiz işlemine kadar -20 °C'de saklanmıştır.

#### 3.1.2. Cihazlar

Çalışma kapsamında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı'nda bulunan spektrofotometreler (Nanodrop Maestro, Maestrogen; Qubit 2.0 Fluorometer, Thermo Fisher Scientific), termal kuru blok ısıtıcı (HB120-S, DragonLab), santrifüj (Minispın Plus, Eppendorf), soğutmalı santrifüj (NF 800R, Nüve), doku parçalayıcı (TissueLyser II, Qiagen), distile su cihazı (ND 12, Nüve), etüv (EN 500, Nüve), termal döngüleyici (Prima-Trio, Himedia), güvenlik kabini (S2020, Thermo Scientific) elektroforez güç kaynağı (250-90, Thermo Scientific), oxford nanopore dizileme cihazı (Nanopore MinION), otoklav (NC 90M, Nüve), hassas terazi (Basiclite, Sartorius), UV jel görüntüleme sistemi (Infinity VX2 1100-26MX, Vilber Lourmat) ve vorteks (MX-S, DragonLab) kullanıldı.

### **3.1.3. Kullanılan Solüsyonlar ve Besiyerleri**

#### **3.1.3.1. Kanlı Agar (HiMedia M073)**

Blood Agar	40 gr
Distile su	1000 ml

121 °C’de 15 dakika sterilizasyon işleminden sonra 50°C’ye kadar soğutulup, içine %5 oranında defibrine koyun kanı ilave edilerek 12,5 ml steril plastik petrilere döküldü.

#### **3.1.3.2. Eosin Methylen-Blue Lactose Sucrose (EMB) Agar (HiMedia M022S)**

Eosin Methylene Blue Agar	37,5 gr
Distile su	1000 ml

121 °C’de 15 dakika sterilizasyon işleminden sonra 50°C’ye kadar soğutulup 12,5 ml steril plastik petrilere döküldü.

#### **3.1.3.3. Tryptic Soy Agar (Merck 1.05458.0500)**

Tryptic Soy Agar	40 gr
Distile su	1000 ml

121 °C’de 15 dakika sterilizasyon işleminden sonra 50°C’ye kadar soğutulup 12,5 ml steril plastik petrilere döküldü.

#### **3.1.3.4. Triple Sugar Iron (TSI) Agar (Merck 1.03915.0500)**

Triple Sugar Iron Agar	65 gr
Distile su	1000 ml

Hazırlanan karışım cam tüplere 7'şer ml aktarılıp portüplere yerleştirildikten sonra 121 °C'de 15 dakika sterilizasyon sonrası tüpler yatık şekilde oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı.

### **3.1.3.5. Urea Broth (Merck 1.08483.0500)**

Urea Broth	38.5 gr
Distile su	1000 ml

Yüksek ısıya maruz bırakılmadan hazırlanan karışım önceden sterilizasyonu yapılmış cam tüplere 0.22 µm enjektör filtre (Minisart High Flow PES, Sartorius) ile 4'er ml aktarılarak hazır hale getirildi.

### **3.1.3.6. Kovac's İndol Ayıracı (Merck 1.11350.0001)**

Üre broth içerisindeki kültürlerin her birine 0.5 ml damlatılarak test gerçekleştirildi.

### **3.1.3.7. Oksidaz Testi (Merck 1.00181.0002)**

Test edilecek bakteri kültürleri test stripleri üzerinde uygulandı.

### **3.1.3.8. Gram Boyama (HiMedia K001L)**

Kristal viyole, distile su, lugol çözeltisi, %95 ethanol, sulu fuksin kullanılmıştır.

### 3.1.3.9. Primerler

Enteropatojenik *E.coli* (EPEC) (*bfpB*); EPEC/Enterohemorajik *E.coli* (EHEC) (*eae*); Enterotoksijenik *E.coli* (ETEC) (*est1b*); Enteroagregatif *E.coli* (EAEC) (*pic*); Enteroagregatif *E.coli* (EAEC) (*aafl*); Enteroinvaziv *E.coli* (EIEC) (*ipaH*); Enteroinvaziv *E.coli* (EIEC) (*virF*); Diffuz adherent *E.coli* (DAEC) (*daaE*); diğer patotipler (*astA*) ve *E.coli* kontrol için *uidA* primerleri ile PCR işlemleri yapıldı. Kullanılan primer dizilimleri, konsantrasyonları, patotip belirlenmesindeki hedef genler, gen bölgeleri, hedeflenen ampikon boyutları Tablo 2’de belirtilmiştir.

**Tablo 2.** *E. coli* izolatlarının genotipik identifikasyonu ve patotiplerinin belirlenmesinde kullanılan primerler (Chandra ve diğerleri, 2013).

Patotip	Hedef Gen	Ürün	Gen Bölgesi	Primer 5' – 3'	Ampikon Boyutu	Konsantrasyon (µM)
EPEC	<i>bfpB</i>	Bundle forming pilus protein	Plazmid	F 5'-GACACCTCATTGCTGAAGTCG-3' R 5'-CCAGAACACCTCCGTTATGC-3'	910 bp	0.2
EPEC / EHEC	<i>eae</i>	İntimin	Kromozom	F 5'-TCAATGCAGTTCGGTTATCAGTT-3' R 5'-GTAAGTCCGTTACCCAACTG-3'	482 bp	0.2
EHEC	<i>stx1</i>	Shiga toksin 1	Faj	F 5'-CGATGTTACGGTTTGTACTGTGACAGC-3' R 5'-AATGCCACGCTTCCCAGAAATG-3'	244 bp	0.2
EHEC	<i>stx2</i>	Shiga toksin 2	Faj	F 5'-GTTTTGACCATCTTCGTCTGATTATTGAG-3' R 5'-AGCGTAAGGCTTCTGCTGTGAC-3'	324 bp	0.2
ETEC	<i>est1b</i>	Isıya dayanıklı toksin	Plazmid	F 5'-TGTCTTTTTCACCTTTCGCTC-3' R 5'-CGGTACAAGCAGGATTACAACAC-3'	171 bp	0.2
EIEC	<i>ipaH</i>	İnvazyon plazmid antijeni	Plazmid	F 5'-CTCGGCACGTTTTAATAGTCTGG-3' R 5'-GTGGAGAGCTGAAGTTTCTCTGC-3'	933 bp	0.3
EAEAC	<i>virF</i>	Transkripsiyonel regülatör <i>virF</i>	Plazmid	F 5'-AGCTCAGCAATGAACTTTGAC-3' R 5'-TGGGCTTGATATCCGATAAGTC-3'	618 bp	0.2
EAEAC	<i>pic</i>	Serin proteaz taşıyıcı	Kromozom	F 5'-AGCCGTTCCGACAGGCC-3' R 5'-AAATGTCAGTGAACCGACGATTGG-3'	1111 bp	0.2
EAEAC	<i>aafl</i>	Agregatif aderans fimbria III protein	Plazmid	F 5'-CACAGGCAACTGAAATAAGTCTGG-3' R 5'-ATTCCCATGATGTCAAGCACTTC-3'	378 bp	0.1
DAEC	<i>daaE</i>	Dr adhezin protein	Kromozom	F 5'-GAACGTTGGTTAATGTGGGGTAA-3' R 5'-TATTCACCGTTCGGTTATCAGT-3'	542 bp	0.1
Diğer Patotipler	<i>astA</i>	Enteroagregatif toksin	Plazmid / Kromozom	F 5'-TGCCATCAACACAGTATATCCG-3' R 5'-ACGGCTTGTAGTCCTTCCAT-3' F 5'-ATGCCAGTCCAGCGTTTTTGC-3'	102 bp	0.3
<i>E. coli</i> Kontrol	<i>uidA</i>	β-d-glukuronidaz	Kromozom	R 5'-AAAGTGTGGTCAATAATCAGGAAGTG-3'	1487 bp	0.2

### **3.1.3.10. Tris-Asetat-EDTA (TAE) Tamponu (Thermo Fisher Scientific B49)**

50X TAE Tamponu 10 ml

Distile su 490 ml

Agaroz jel elektroforezi için 50x Tris-Asetat-EDTA (TAE) tamponu kullanıldı.

### **3.1.3.11. Jel Agaroz (İnvitrogen 16500100)**

Hazırlanan TAE tampon çözeltisi ile jel elektroforezis işlemi için %2 oranında jel agaroz eklendi.

### **3.1.3.12. DNA İşaretleyicisi (GeneRuler 100 - 10.000 bp Ready-to-use SM1173)**

Jel elektroforezinde ampikon boyutlarının tespiti için 3 µl kullanıldı.

### **3.1.3.13. Jel Yükleme Boyası (Hibrigen 6x Mavi MG-YBM-01)**

1 µl 6x jel yükleme boyası 5 µl DNA örneği ve DNA Ladder için kullanıldı.

### **3.1.4. DNA Ekstraksiyonu (FUJIFILM QuickGene DNA Tissue Kit S 637-23559)**

Mastitisli ve sağlıklı süt örneklerin DNA ekstraksiyonu FUJIFILM QuickGene DNA Tissue Kit S ile gerçekleştirildi.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. *Escherichia coli* Fenotipik İzolasyon

Mastitisli süt örneklerinin (n=115) %5 Koyun Kanlı Agar ve Eosin Methylen-blue Lactose Sucrose (EMB) Agar'a inokulasyonları gerçekleştirildi. İnokulasyonu gerçekleştirilen örnekler 37 °C'de 24-48 saat inkubasyona bırakıldı. İnokulasyona bırakılan petripler 24 ve 48 saat sonucunda kontrol edilerek Kanlı Agar'da gram negatif şüpheli koloniler ve EMB Agar besiyerinde siyah koloni ile beraber metalik refle tespit edilen koloniler Tryptic Soy Agar (TSA)'da saflaştırıldı. Saflaştırılan kolonilerden yapılan gram boyama sonucunda Gram negatif basil mikroskopik teşhisi konulanlara oksidaz testi uygulandı. Oksidaz testi negatif tespit edilen izolatlar sonrasında Mannitol fermentasyon besiyeri, Triple Sugar İron Agar (TSIA), Ure broth besiyerlerine inokulasyonları gerçekleştirildi. Mannitol fermentasyon besiyerinde pozitif reaksiyon, TSIA besiyerinin tamamında asit oluşumu sonrası sarı renk oluşumu görülen ve Ure broth besiyerinde reaksiyon negatif izolatlarla yine Ure broth besiyerinde indol testi uygulandı. Son olarak indol testi pozitif olarak tespit edilen izolatların fenotipik *Escherichia coli* olarak identifikasyonu yapıldı (Hogan ve diğerleri, 1999).

Sağlıklı süt örnekleri (n=20) %5 Koyun Kanlı Agar'a inokulasyonları gerçekleştirildi. İnokulasyona bırakılan petripler 24 ve 48 saat sonucunda kontrol edilerek bakteriyel üreme tespit edilen örnekler çalışmadan çıkarıldı.

### 3.2.2. Genotipik *E. coli* İzolasyonu

Fenotipik olarak tanımlanan *E. coli* izolatlarından kaynatma yoluyla DNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi. İzolatlardan bir öze dolusu koloni 0.5 ml steril distile su bulunan eppendorf tüpe aktarıldı. Vorteks yardımı ile homojenizasyon yapıldıktan sonra termal blokta 100 °C'de 15 dakika inkubasyona bırakıldı. İnokulasyon sonrasında hücre kalıntılarını ve denatüre olmuş proteinleri çöktürmek amacıyla 13.500 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi yapıldı. Santrifüj sonrasında serbest kalan genomik DNA'yı içeren üst faz (süpernatant) yeni steril eppendorf tüplere aktarılarak moleküler analiz işlemine kadar -20 °C'de saklandı (Dashti ve diğerleri, 2009).

DNA örneklerinin tür spesifik identifikasyonu amacıyla  $\beta$  -*d-glucoronidase* kromozom gen bölgesinden elde edilen *uidA* genine spesifik primer ile yapılan PCR işlemi gerçekleştirildi. PCR reaksiyonu 25  $\mu$ L toplam hacimde gerçekleştirilmiştir. 23 örnek ile birlikte *E. coli* ATCC 25922 izolatı pozitif kontrol olarak kullanıldı. Reaksiyon karışımının son konsantrasyonu 10  $\mu$ L 2X Taq master miks, 0,5  $\mu$ L 50 mM magnezyum klorür ( $MgCl_2$ ), 12,5  $\mu$ L deiyonize su ve 1  $\mu$ L kalıp DNA içerecek şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan master mikslere eklenecek *uidA* primer konsantrasyonu 0.2  $\mu$ M olarak belirlenmiştir. Tablo 3’de PCR termal döngü kondisyonları belirtilmiştir.

**Tablo 3.** *E. coli* 16S rRNA *uidA* gen bölgesi PCR ısıl döngü ve süre diyagramı (Müller ve diğerleri, 2007).

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Başlangıç Denatürasyon	1	94°C	5 dk
Denatürasyon		94°C	30 sn
Bağlanma	30	62°C	30 sn
Uzama		72°C	90 sn
Son Uzama	1	72°C	5 dk
Bekletme	1	4°C	$\infty$

PCR ürünleri %2 agaroz jelde yürütme işlemi için oluşturulan 25  $\mu$ l’ lik PCR ürünlerinden 10’ar  $\mu$ l pipet yardımıyla alınıp, 3  $\mu$ l 6x loading dye ile karıştırılarak jeldeki uygun pozisyondaki kuyucuğa yüklendi. Jele, örnekler ve markerların yüklemesi yapıldıktan sonra elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonda bağlanarak 80V 500A akımda 40 dakika yürütüldü. Elektroforez işleminin ardından elde edilen jel, Vilber Lourmat jel görüntüleme sisteminde incelenerek UV ışığı altında bant uzunlukları değerlendirildi. sonrasında 1487 bp’de ampikon uzunluklarında bant oluşturan örnekler *E. coli* olarak tespit edildi (Müller ve diğerleri, 2007). Fenotipik olarak *Escherichia coli* identifikasyonu yapılan izolatların tamamı genotipik olarak bu şekilde 16S PCR ile doğrulandı.

### 3.2.3. *E. coli* Patotip İdentifikasyonu

Genotipik olarak da *Escherichia coli* olarak tespit edilen izolat DNA'ları ile patotiplerinin belirlenmesi için; Enteropatojenik *E. coli* (EPEC) (*bfpB*), EPEC/ Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) (*eae*), Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) (*est1b*), Enteroagregatif *E. coli* (EAEC) (*pic*, *aafII*), Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC) (*ipaH*, *virF*), Diffuz adherent *E. coli* (DAEC) (*daaE*), diğer patotipler (*astA*) primerleri kullanılarak PCR işlemleri yapıldı. PCR reaksiyonu 25 µL toplam hacimde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımının son konsantrasyonu 10 µL 2X Taq master miks, 1 µL 50 mM magnezyum klorür (MgCl<sub>2</sub>), 11 µL deiyonize su ve 1 µL kalıp DNA içerecek şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan master mikslere eklenecek primer konsantrasyonları *bfpB*, *eae*, *est1b*, *pic*, *virF*, *stx1*, *stx2* için 0.2 µM; *aafII*, *daaE* için 0.1 µM; *astA* ve *ipaH* için 0.3 µM olarak belirlenmiştir. PCR termal döngü kondisyonları aşağıdaki Tablo 4'de belirtilmiştir.

**Tablo 4.** Multipleks PCR ısıl döngü ve süre diyagramı (Chandra ve diğerleri 2013).

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Başlangıç Denatürasyon	1	94°C	5 dk
Denatürasyon		94°C	30 sn
Bağlanma	35	62°C	30 sn
Uzama		72°C	1 dk
Son Uzama	1	72°C	5 dk
Bekletme	1	4°C	∞

PCR ürünlerine %2 agaroz jelde yürütme işlemi gerçekleştirildi. Oluşturulan 25 µl' lik PCR ürünlerinden 10'ar µl pipet yardımıyla alınıp, 3 µl 6x loading dye ile karıştırılarak jeldeki uygun pozisyondaki kuyucuğa yüklendi. Jele, örnekler ve markerların yüklemesi yapıldıktan sonra elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonda bağlanarak 80V 500A akımda 40 dakika yürütüldü. Elektroforez işleminin ardından elde edilen jel, Vilber Lourmat jel görüntüleme sisteminde incelenerek UV ışığı altında bant uzunlukları her biri için ayrı ayrı değerlendirildi. Yürütme sonrasında 1111 bp (*pic*) ve 378 bp (*aafII*) ampikon

seviyesinde tespit edilen örnekler EAEC; 618 bp (*virF*) ve 933 bp (*ipaH*) amplikon seviyesinde tespit edilen örnekler EIEC; 244 bp (*stx1*) ve 324 (*stx2*) bp amplikon seviyesinde tespit edilen örnekler EHEC; 910 bp (*bfpB*) amplikon seviyesinde tespit edilen örnekler EPEC; 482 bp (*eae*) amplikon seviyesinde tespit edilen örnekler EPEC/EHEC; 171 bp (*est1b*) amplikon seviyesinde tespit edilen örnekler ETEC; 542 bp (*daaE*) amplikon seviyesinde tespit edilen örnekler DAEC; 102 bp (*astA*) amplikon seviyesinde tespit edilen örnekler diğer patotipler olarak değerlendirildi.

### 3.2.4. Süt Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için mastitisli ve normal süt örneklerinden 5 ml kullanıldı. İlk olarak steril falkon tüplerine alınan süt örnekleri trigliserit, yağ globülleri ile süt serumu olarak adlandırılan protein olarak zengin kısmın bakteri ve somatik hücrelerden ayrılması amacıyla soğutmalı santrifüjde 4°C'de 6.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası bakteri ve somatik hücrelerin bulunduğu pelet kısmı ve yağ kısmının bulunduğu en üst kısım arasındaki süt serumu olarak adlandırılan yarı saydam sıvı yağ bölümü karıştırılmadan dikkatlice alınarak uzaklaştırıldı (Jeršek, 2014; Lima ve diğerleri, 2018). Elde edilen pelet, yağ karışımına 200 µl phosphate-buffered saline (PBS) eklenerek vorteks işlemiyle homojen karışım elde edildi ve sonrasında steril eppendorf tüpe aktarıldı.

Süt serumunda bulunan proteinlerin ayrılması için yapılan ön santrifüj sonrasında PBS ile sulandırılan pelet-yag karışımına DNA ekstraksiyonu için Fujifilm QuickGene DNA Tissue Kit S protokolü firmanın talimatları doğrultusunda modifiye edilerek uygulanmaya başlandı. İlk olarak homojenizasyon için örnek üzerine 250 µl MDT tamponu ile birlikte mekanik parçalama için örneklere, 3 adet cam boncuk (0.1 mm çapında) eklenerek doku parçalama (Qiagen - TissueLyser II) cihazında 3.000 rpm hızda, 120 saniye süreyle 2 kez homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi. Lizis için homojenize edilen karışıma 25 µl EDT tamponu eklenerek örnekler 55°C'de 60 dakika süreyle termal blokta (DLAB HB120-S Dry Bath) inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 13.500 rpm hızda 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen üst fazdan (süpernatant) 200 µl alınarak yeni bir 1.5 ml'lik eppendorf tüpe aktarıldı. RNA kontaminasyonunu gidermek amacıyla örneğe 20 µl RNaz A eklenerek vorteks işlemi gerçekleştirildi. Sonrasında kapaklarda kalan sıvıları gidermek amacıyla kısa süreli santrifüj (flash spin down) yapılmıştır. Örnekler oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildikten sonra 180

$\mu$ l LDT tamponu eklenerek örnekler tekrar maksimum hızda 15 saniye boyunca vortekslendi ve ardından kısa süreli santrifüj (flash spin down) işlemi uygulandı ve termal blokta 70 °C'de 10 dakika süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında yine vorteks ile flash spin down uygulaması yapılarak lizat elde edildi ve Fujifilm press cihazı (QC-Mini 480) kartuşlara yerleştirilen eppendorf tüp içerisindeki ekstraksiyon filtrelerine transfer edildi. Filtrelerde bulunan lizatlara cihaz hava basıncı işlemi uygulandı. Sonrasında cihaz içerisindeki filtrede bulunan lizatlara yıkama işlemi için 750  $\mu$ l WDT solüsyonu eklenerek hava basıncı işlemi uygulandı. Yıkama işlemi 3 kez aynı şekilde yapıldıktan sonra elüsyon işlemi için filtrelerin bulunduğu eppendorf tüpler atılarak yeni steril tüpler yerleştirildi. 40  $\mu$ l CDT solüsyonu filtrelere eklenerek 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında tekrar hava basıncı uygulanarak elde edilen DNA'lar yeni eppendorf tüplere alındı. DNA örneklerinin Qubit 2.0 fluorometer ile ölçümleri yapıldı. DNA miktarları kayıt altına alınan örnekler patotip tayinlerinden sonra gruplandırılarak mikrobiyom analizinde kullanılıncaya kadar -20 derin dondurucuda saklandı (Tablo 5).

**Tablo 5.** Seçilen örneklerin DNA ölçümleri.

Örnek Numarası	DNA ölçümleri (ng/μl)
Y1	54,60
Y2	94,20
Y3	63,40
Y4	16,50
Y9	116,00
Y5	80,60
Y7	10,98
Y10	19,50
Y6	32,60
Y8	54,40
K1	25,40
K2	13,50
K3	18,20
K4	16,40
K5	14,80
K6	20,40

### 3.2.5. Mikrobiyom Analizi

Mikrobiyom analizleri için *E. coli* patotiplendirmeleri yapılmış sütlerden DNA izole edilen 10 örneği içeren 6 çalışma grubu ve sağlıklı sütlerden DNA izole edilen 6 örneği içeren 1 kontrol grubu oluşturuldu. Gruplardaki örnekler Y1, Y2 (Grup 1); Y3 (Grup 2); Y4 (Grup 3); Y9 (Grup 4); Y5, Y7, Y10 (Grup 5); Y6, Y8 (Grup 6); K1, K2, K3, K4, K5, K6 (Kontrol grubu)

olacak şekilde oluşturuldu (Tablo 6). Gruplarda bulunan örnekler için 16S rRNA barkoding kit protokolü uygulandı.

**Tablo 6.** Mikrobiyom analizleri için örneklerin grup dağılımları.

<b>Grup</b>	<b>Örnek Numarası</b>
Grup 1	Y1
	Y2
Grup 2	Y3
Grup 3	Y4
Grup 4	Y9
	Y5
Grup 5	Y7
	Y10
Grup 6	Y6
	Y8
Kontrol	K1
	K2
	K3
	K4
	K5
	K6

Bu gruplar içerisinde bulunan 10 *E. coli* patotipine sahiplendirilmesi için tespit edilen farklı patotipler ve sağlıklı sütlerden izole edilen DNA örnekleri gruplandırılarak 16 adet havuzda toplanmış örneklerle barkod numarası verilmek üzere PCR işlemi yapıldı. Amplikon

kütüphanelerinin oluşturulması için kullanılacak primer çifti 16S rRNA geninin V1-V9 bölgesini kapsayan yaklaşık 1500 bp'lik bölge hedeflenmiştir (Klindworth ve diğerleri, 2013; Zeng ve diğerleri, 2013). Hedef spesifik primer çiftlerinin 5' ucuna, oluşturulan kütüphanenin Oxford Nanopore Technologies Nanopore barkod DNA dizileri eklenmiştir. 16S rRNA'ya özgü hedef spesifik primer-konnektör sekansları ileri primer için 5'-TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC - AGRGTTTGATYHTGGCTCAG -3' ve geri primer için 5'- ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC - TACCTTGTTAYGACTT -3' şeklindedir. İlk PCR Proof Reading DNA Polymerase 2x Reaction Mix ve her bir primerden 200 nm kullanılarak uygulanmıştır. PCR ürünü agaroz jelde yürütülerek boyutu (~1450 bp) doğrulandı. Barkod primerlerinin kuyruklara bağlanması amacıyla yapılan PCR işleminden sonra DNA yoğunluk ölçümü gerçekleştirildi. 1ml'de en az 20 ng DNA içermesi hedeflendi. Süt örneklerinden elde edilen DNA'lar Qubit 2.0 fluorometer ile ölçülerek 16S Barcoding Kit 24 V14 (SQK-16S114.24) protokolünde belirtildiği şekilde yoğunlukları ayarlandı ve sonrasında barkodlama PCR işlemi gerçekleştirildi (Tablo 7, Tablo 8).

**Tablo 7.** Barkod PCR karışım oranları.

<b>Bileşen</b>	<b>Miktar (µl)</b>
LongAmp Taq 2X Master Mix	25 µl
Barcod Primer	10 µl
ddH <sub>2</sub> O	5 µl
Kalıp DNA	10 µl
Toplam	50 µl

**Tablo 8.** Barkod PCR ısıtım döngüsü ve süre diyagramı.

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Başlangıç	1	95°C	3 dk
Denatürasyon			
Denatürasyon		95°C	30 sn
Bağlanma		55°C	30 sn
	25		
Uzama		72°C	90 sn
Son Uzama	1	72°C	5 dk
Bekletme	1	4°C	∞

PCR işleminden sonra ürünler PCR ürünü purifikasyon kiti kullanılarak saflaştırıldı. Amplikon kütüphanesi hazırlanması için Ligation sequencing kit (SQK-LSK109; Oxford Nanopore Technologies) ve Native barcoding kit (EXP-NBD104-114; Oxford Nanopore Technologies) protokolleri kullanıldı. İlk olarak 60 uL son hacimdeki örneklerin (100-200 fmol) uçları hazırlanıp, dA kuyruk eklenmiş ve tamir işlemi gerçekleştirildikten sonra saflaştırma işlemi için için 0.5X MagBeads (MobiomX) kiti kullanıldı. Native barkodların, hazırlanmış uçlara bağlanması için oda sıcaklığında 10 dakika boyunca bekletildi. Numuneler daha sonra saflaştırılmış ve spektrofotometrik olarak ölçüldü. Barkodlanmış numunelerin her birinden eşit miktarda DNA alınarak tek bir tüpte 35 uL nihai hacime ulaşılacak şekilde birleştirildi. Adaptörler, barkodlu numunelerin uçlarına bağlanmış, saflaştırılmış ve ölçümü yapılmıştır. Hazırlama işlemlerinden sonra 50 fmol kütüphane bir Spot-On akış hücresine (FLO-MIN106D) yüklenmiştir. Sekanslama çalışması, Mk1C™ cihazında (Oxford Nanopore Technologies) MinKNOW™ yazılımı kullanılarak başlatıldı. Yeterli veri elde edildiğinde veya 72 saatlik maksimum çalışma süresi tamamlandığında sekanslama durdurularak elde edilen veriler biyoinformatik analizine tabi tutuldu.

### 3.2.6. Biyoinformatik Analiz

Sekanslama işleminden sonra fast5 formatında elde edilen sonuçlar guppy yazılımı (base-calling ve de-multiplexing) kullanılarak fastq formatına dönüştürüldü. 16S rRNA bölgesi ortalama 1500 bp olduğundan dolayı, 1250-1750 bp uzunluğundaki okumalar Trimmomatic

kullanılarak filtrelendi ve geri kalan okumalar analizin dışında tutuldu. Temizlenen okumalar, python programlama dili kullanılarak özelleştirilmiş bir iş akışıyla analiz edildi. Bu iş akışı ile filtreleme işlemi sırasında her sekans BLAST algoritması ile eşleştirildi. Eşleştirme sonuçlarında %60'tan fazla referansı kapsama ve %80 ikili benzerliğe sahip dizilerin taksonomik verileri alınarak bir OTU'lar oluşturuldu. Oluşturulan OTU (.biom) dosyası ile filogenetik analizlerin yapılabilmesi için qiime2 platformunun sağladığı araçlarla birlikte farklı indexler kullanılarak alfa çeşitlilik analizi, PCA (Temel Komponent Analiz), PCoA, beta çeşitlilik analizleri, biyobelirteç ve fenotip analizleri yapılmıştır. Taksonomik sınıflandırmaları düzenlemek ve dinamik krona çizelgeleri hazırlamak için Mothur platformu kullanıldı. Analizlerde yer alan grafik ve tablolar python programlama dilinin kütüphaneleri ile yapıldı. Elde edilen kapsamlı verilerden çekirdek mikrobiyotayı saptamak için görülen taksonların %1'den fazla görülmüş olanlar değerlendirildi (O'Donnell ve diğerleri, 2017).

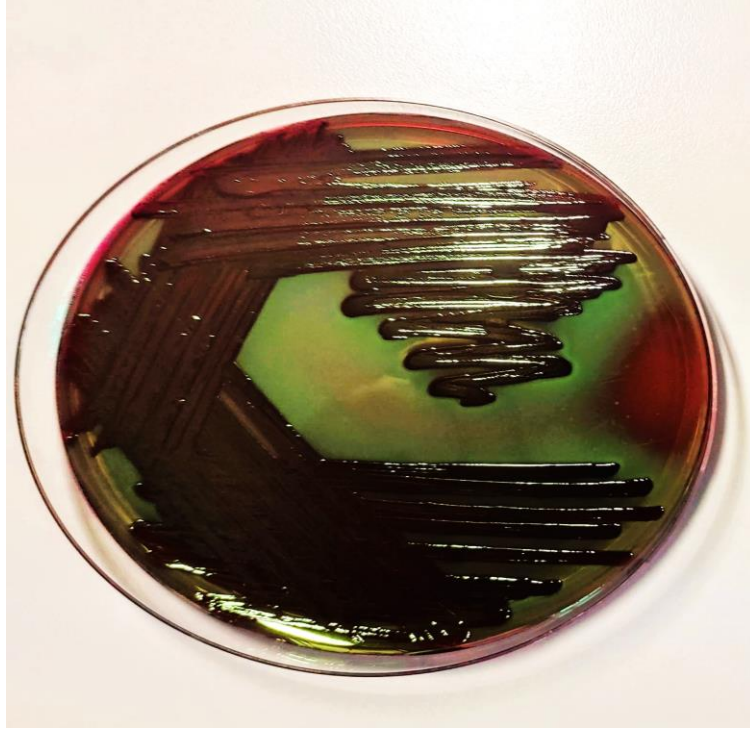
## 4. BULGULAR

### 4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Araştırmamızda Aydın ili sınırları içerisindeki çiftliklerden 115 adet inekten mastitisli ve aynı çiftliklerden toplamda 20 adet sağlıklı süt örneği toplanmıştır.

#### 4.1.1. Fenotipik Bulgular

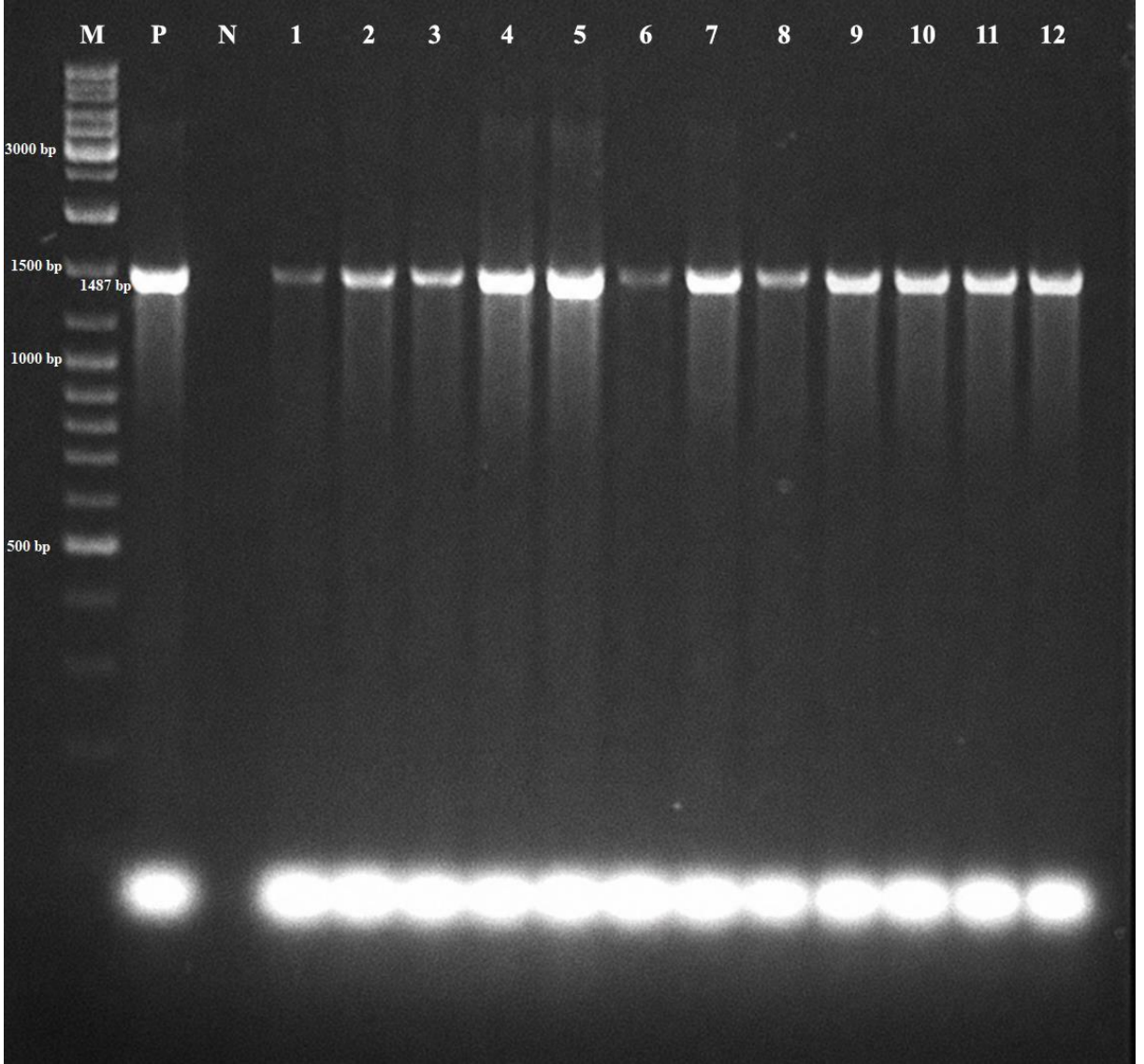
Mastitisli 115 süt örneğinde üreyen Gram negatif şüpheli koloniler ve EMB Agar'da siyah ya da metalik refle oluşturan kolonilerin saflaştırılması sonrasında Gram negatif basil mikroskopik teşhisi konularına ilk olarak oksidaz testi uygulandı. Oksidaz testi negatif tespit edilen izolatlar sonrasında Mannitol fermentasyon besiyeri, Triple Sugar Iron Agar (TSIA) ve Ure broth besiyerlerine inokulasyonları gerçekleştirildi. Mannitol fermentasyon testi pozitif, TSIA'da besiyerinin tamamında asit oluşumu sonrası sarı renk oluşumu görülen ve Ure broth besiyerinde negatif reaksiyon, indol testi pozitif olarak tespit edilen izolatların fenotipik *Escherichia coli* olarak identifikasyonu yapıldı. Mastitisli 115 süt örneğinin 23'ünde (%20) *E. coli* tespit edildi.



**Resim 1.** EMB Agar'da *E. coli* izolatu.

#### **4.1.2. Genotipik Bulgular**

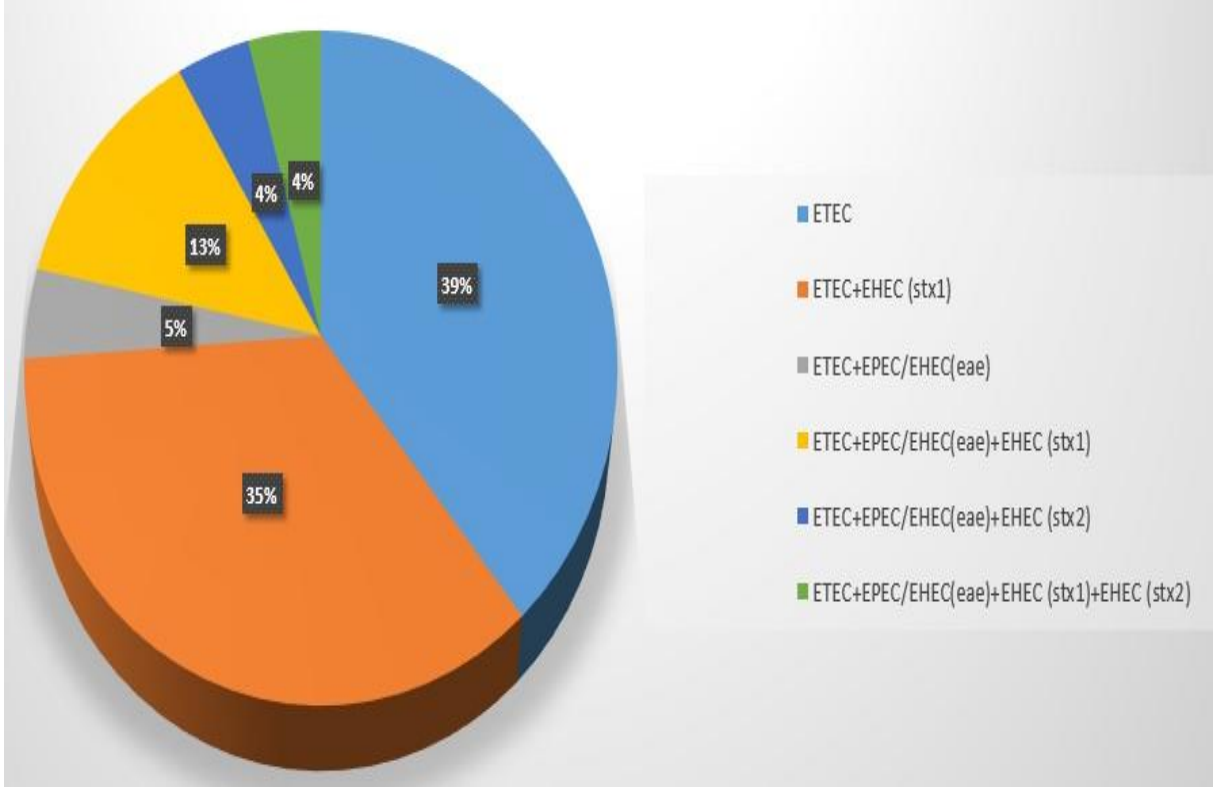
Fenotipik olarak tespit edilen 23 *Escherichia coli* izolat DNA'ları ile *uidA* gen bölgesi primeri kullanılarak yapılan PCR işlemi sonucunda %2'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. 23 *Escherichia coli* izolatının tamamında *uidA* için 1487 bp hedeflenen ampikon bölgesinde bantlar tespit edilerek genotipik olarak da doğrulandı.



**Resim 2.** *E. coli* 16S rRNA *uidA* gen bölgesi PCR görüntüsü. M: 100 bp DNA işaretleyicisi; P: Pozitif kontrol; N: Negatif kontrol; 1-12: *uidA* PCR pozitif örnekler.

#### 4.2. *E. coli* Patotip Bulguları

23 *E. coli* izolatının patotiplerinin tespiti için uygulanan PCR işlemleri sonrası, ampliconlar %2'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. Analiz sonucunda 9 izolat ETEC, 8 izolat ETEC+EHEC (*stx1*), 3 izolat ETEC+EPEC/EHEC(*eae*)+EHEC (*stx1*), 1 izolat ETEC+EPEC/EHEC(*eae*), 1 izolat ETEC+EPEC/EHEC(*eae*)+EHEC(*stx2*), 1 izolat ETEC+EPEC/EHEC(*eae*)+EHEC(*stx1*)+EHEC(*stx2*) olarak tespit edildi (Şekil 2).



Şekil 2. *E.coli* izolatlarının patotiplerinin diyagramı.

### 4.3. Mikrobiyom Bulguları

Araştırmamızda kullanılan sağlıklı sütlerden elde edilen DNA'lar kontrol grubu (K1-K6) olarak ve mastitisli süt örneklerinden (Y1-Y10) izole edilen *E. coli* patotiplerinden elde edilen DNA'lar kontrol gruplarını oluşturmuştur. Araştırmamızda 1 kontrol ve 6 araştırma grubu olmak üzere göre toplam 7 grupta mikrobiyom analizleri yapılmıştır. Analiz için seçilen örneklerin grup bilgileri, ekstraksiyon yapılan örneklerin ve PCR ürünlerinin Qubit 2.0 fluorometer ile ölçülen DNA yoğunlukları Tablo 9'da belirtilmiştir.

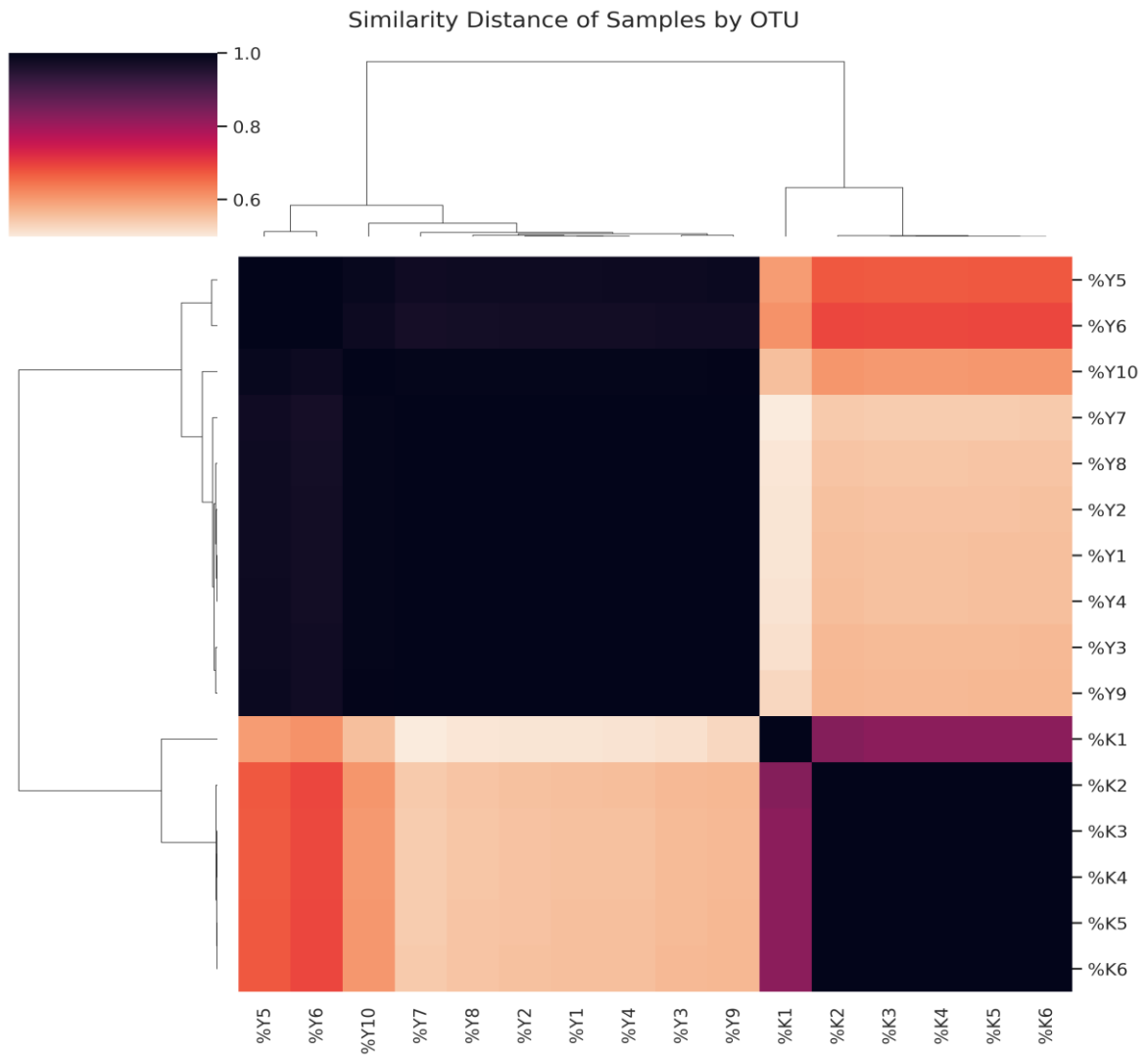
**Tablo 9.** Mikrobiyom analiz grupları.

Grup	Patotipler	Örnek Numarası	DNA ölçümleri (ng/µl)	PCR ürünü ölçümleri (ng/µl)
Grup 1	ETEC+EPEC/EHEC( <i>eae</i> )+EHEC( <i>stx1</i> )	Y1	54,60	79,60
		Y2	94,20	60,60
Grup 2	ETEC+EPEC/EHEC( <i>eae</i> )+EHEC( <i>stx1</i> )+EHEC( <i>stx2</i> )	Y3	63,40	67,20
Grup 3	ETEC+EPEC/EHEC( <i>eae</i> )	Y4	16,50	78,80
Grup 4	ETEC+EPEC/EHEC( <i>eae</i> )+EHEC( <i>stx2</i> )	Y9	116,00	104,00
Grup 5	ETEC	Y5	80,60	61,00
		Y7	10,98	110
		Y10	19,50	97,00
Grup 6	ETEC+EHEC( <i>stx1</i> )	Y6	32,60	79,40
		Y8	54,40	89,40
Kontrol	Sağlıklı	K1	25,40	52,20
		K2	13,50	67,80
		K3	18,20	50,10
		K4	16,40	47,60
		K5	14,80	53,40
		K6	20,40	58,70

### 4.3.1. OTU Temelli Benzerlik Analiz Bulguları

Çalışmada kontrol grubunun tamamında 1.520.384; *E. coli* mastitis grubunun tamamında 3.582.136 okuma gerçekleştirilerek toplamda 5.102.520 OTU tespit edildi.

*E. coli* mastitis enfeksiyonlu sığırlardan alınan süt numuneleri (Y grubu) ile sağlıklı kontrol grubu (K grubu) arasındaki OTU benzerlik mesafeleri Şekil 3'deki ısı haritası ile gösterilmektedir. Bu analize göre, *E. coli* mastitis enfeksiyonunun sütün mikrobiyal yapısında önemli değişikliklere yol açtığı ve iki grup arasında belirgin bir farklılık olduğu dengeli bir şekilde görülmektedir.



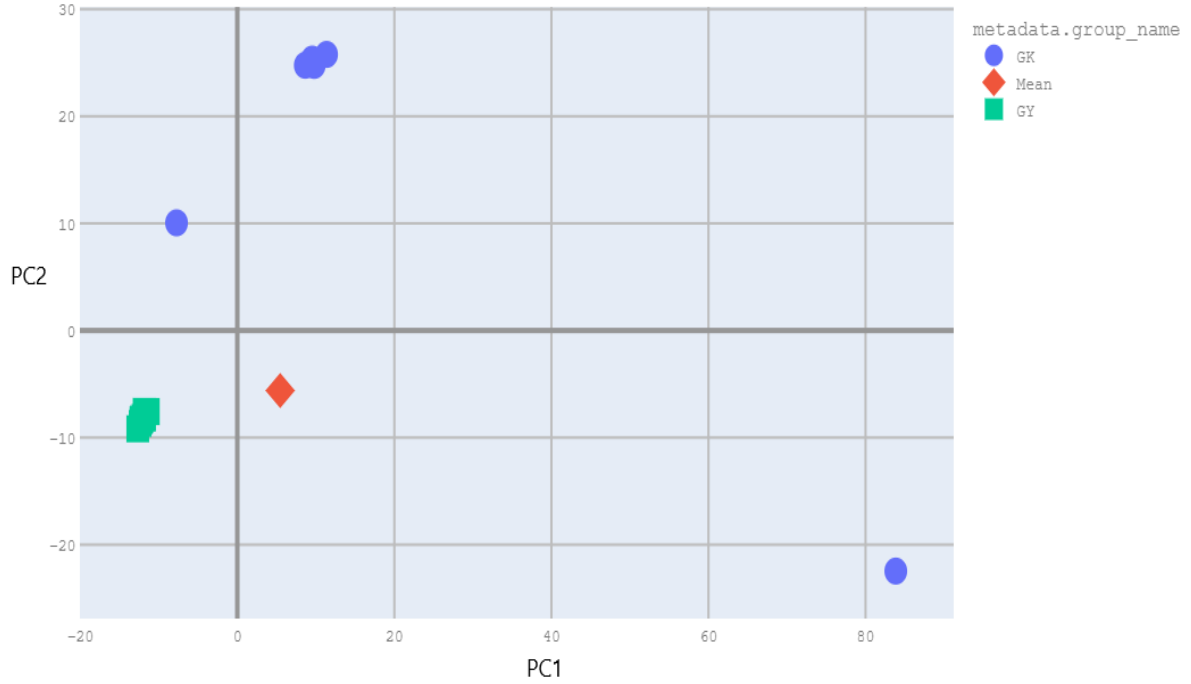
Şekil 3. *E. coli* mastitisi ve sağlıklı süt örneklerinin OTU'larının benzerlik analiz grafiği. Y1-Y10: *E. coli* mastitisi süt örnekleri; K1-K6: Sağlıklı süt örnekleri

#### 4.3.2. Temel Komponent Analiz (PCA) Bulguları

Kontrol grubu ve mastitis grubu arasındaki iki boyutlu (2D) temel komponent analizi (PCA), *E. coli* mastitis enfeksiyonunun sütün mikrobiyom yapısında meydana getirdiği belirgin ayrılığı ortaya koymaktadır. Kontrol grubu örnekleri PC1 (Birinci Temel Bileşen) x ekseninde pozitif değerlerde (ortalama 19.08) konumlanırken, mastitis grubu örnekleri PC1 ekseninde negatif değerlerde (ortalama -11.45) konumlanmıştır. İki grup arasındaki PC1 eksenindeki fark yaklaşık 30.53 birim olup, bu fark *E. coli* enfeksiyonunun sütün mikrobiyom yapısında meydana getirdiği belirgin disbiyozisi göstermektedir. Ayrıca, kontrol grubu örnekleri PC2 (İkinci Temel Bileşen) y ekseninde geniş bir aralıkta dağılmış (-22.52 ile 24.73) olup, mastitis grubu örnekleri ise dar bir aralıkta (-9.17 ile -7.61) konumlanmıştır. Bu durum, sağlıklı sütün mikrobiyomunun bireysel farklılıklar gösterirken, *E. coli* mastitis enfeksiyonunun sütün mikrobiyomunu daha homojen bir şekilde değiştirdiğini göstermektedir (Şekil 4).

Altı patotip grubunun 2 boyutlu PCA analizi sonucunda, *E. coli* mastitis enfeksiyonunun patotip-spesifik olarak küçük farklar ile sütün mikrobiyom yapısını değiştirdiği belirlenmiştir. Grup 1 örnekleri PC1 ekseninde -11.72 ile -11.59 aralığında (ortalama -11.65), Grup 2 PC1 ekseninde -12.02'de, Grup 3 -11.17'de, grup 4 -11.62'de konumlanmıştır. Grup 5 PC1 ekseninde -11.54 ile -10.71 aralığında (ortalama -11.16), Grup 6 örnekleri ise -11.56 ile -11.33 aralığında (ortalama -11.44) konumlanmıştır. Tüm patotip grupları PC1 ekseninde benzer negatif değerlerde konumlanmış olup, bu durum altı patotip grubunun sütün mikrobiyomunda birbirine benzer değişiklikleri meydana getirdiğini göstermektedir. Ancak, PC2 eksenindeki dağılım incelendiğinde, gruplar arasında anlamlı farklılıklar gözlenmiştir. Grup 5 örnekleri PC2 ekseninde ortalama -7.84 konumlanırken; grup 2 PC2 ekseninde -9.17'de konumlanmıştır. Grup 5 ile Grup 2 arasındaki PC2 farkı 1.33 birim olup, bu fark mastitis grupları arasında gözlenen en büyük farkı temsil etmektedir. Grup 3 PC2 ekseninde -8.19, grup 6 -8.27, grup 4 -8.42 ve grup 1 ortalama -8.53 üzerinde konumlanmıştır. Grup 5 ile grup 2 arasındaki PC2 farkı mastitis grupları arasında gözlenen en büyük farkı temsil etmektedir. Grup 2'nin en düşük PC2 değerine sahip olması, bu patotipinin sütün mikrobiyomunda diğer patotiplerden farklı bir ikincil mikrobiyom değişikliği meydana getirdiğini göstermektedir. Buna karşın, grup 5'de daha yüksek PC2 değerlerine sahip olması ve grup örneklerinin aralarında daha geniş bir aralık (0.69 birim) göstermesi, bu patotiplerin

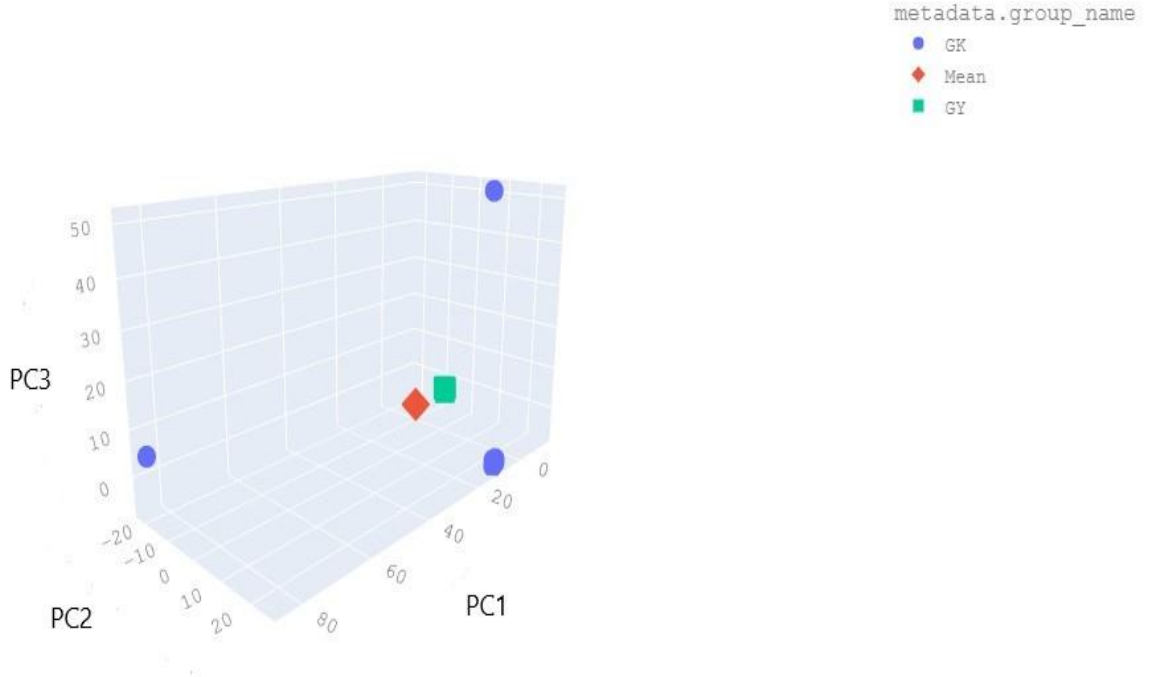
sütün mikrobiyomunda daha heterojen bir ikincil değişiklik profili oluşturduğunu göstermektedir (Şekil 4).



Şekil 4. Örneklerin 2 boyutlu Temel Komponent Analiz (PCA) grafiği.

■ : *E. coli* mastitisli sütler; ● : Sağlıklı sütler; ◆ : Genel ortalama

Altı patotip grubunun 3D PCA analizi sonucunda, *E. coli* mastitis enfeksiyonunun patotip-spesifik olarak sütün mikrobiyom yapısını değiştirdiği belirlenmiştir. PC3 (Üçüncü Temel Bileşen) eksenini üzerindeki dağılım incelendiğinde grup 3 en yüksek değerde (-2.46) konumlanırken, grup 2 en düşük değerde (-3.17) konumlanmıştır. Grup 1 -2.80, grup 4 -2.64, grup 5 -2.88 ve Grup 6 ortalama -2.82 biriminde konumlanmıştır. Grup 2 ile grup 5 arasındaki PC3 farkı 0.29 birim olup, bu fark 2D analizde gözlenen PC2 farkına benzer şekilde, bu iki patotip grubunun sütün mikrobiyomunda farklı profiller oluşturduğunu göstermektedir. Grup 3 ile grup 2 arasındaki PC3 farkı ise 0.71 birim olup, mastitis grupları arasında gözlenen en büyük PC3 farkıdır. PC3 eksenini üzerindeki bu farklar, farklı *E. coli* patotiplerinin sütün mikrobiyomunda üçüncü seviye değişiklikleri meydana getirdiğini göstermektedir (Şekil 5).



**Şekil 5.** Örneklerin 3 boyutlu Temel Komponent Analiz (PCA) grafiği.

■ : *E. coli* mastitisli sütler; ● : Sağlıklı sütler; ◆ : Genel ortalama

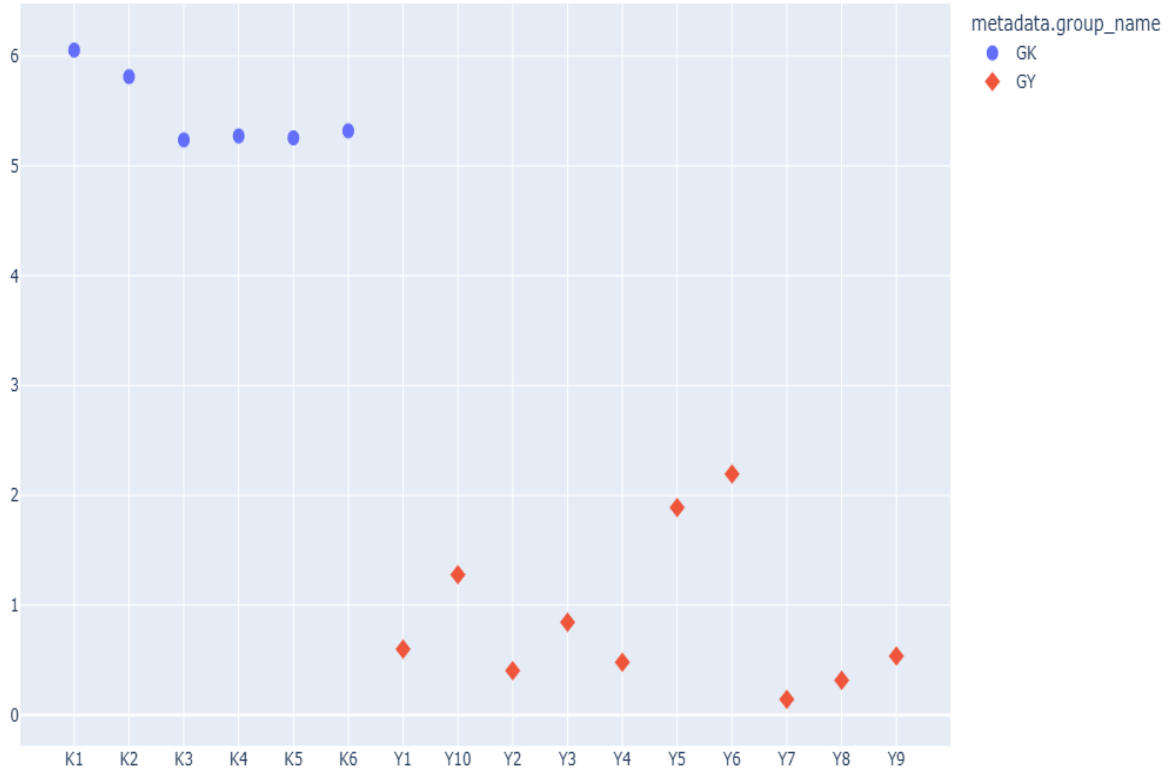
#### 4.3.3. Alfa Çeşitlilik Analizi Bulguları

Kontrol grubu örneklerinin Shannon indeks değeri ortalaması 5,49 olarak saptanmıştır. Bu yüksek Shannon indeks değerleri, sağlıklı sütün mikrobiyomunun yüksek mikrobiyal çeşitliliğine ve dengeli bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir.

Mastitis grupları Shannon indeks değerlerine göre yüksekten düşüğe doğru sıralandığında; grup 6 (1,25), grup 5 (1,10), grup 2 (0,84), grup 4 (0,53), grup 1 (0,50), grup 3 (0,47) şeklinde bir dağılım ortaya çıkmaktadır. Grup 6 ve grup 3 arasındaki Shannon index farkı 0,77 olup, bu fark patotiplerin çeşitlilik açısından farklı profiller gösterdiğini göstermektedir.

*E. coli* mastitis gruplarındaki örnekler kendi aralarında incelendiğinde; grup 5 ve grup 6 örnekleri, grup içinde belirgin Shannon indeks varyasyonu göstermektedir. Grup 5'te örnekler arasında Shannon index farkı 1,74 olup, grup 6'da ise 1,87 olmuştur. Buna karşın, diğer grup örnekleri kendi grupları içerisinde daha homojen bir Shannon index profili göstermektedir.

Kontrol grubu örnekleri incelendiğinde ise en yüksek Shannon indeks değeri 6,05 ile K1'de, ikinci en yüksek değer ise 5,81 ile K2 örneğinde tespit edilmiştir. Diğer 4 örneğin değerleri 5,2-5,3 seviyesinde saptanmıştır (Şekil 6).



**Şekil 6.** Örneklerin Shannon indeksi grafiği.

◆ : *E. coli* mastitisli sütler; ● : Sağlıklı sütler

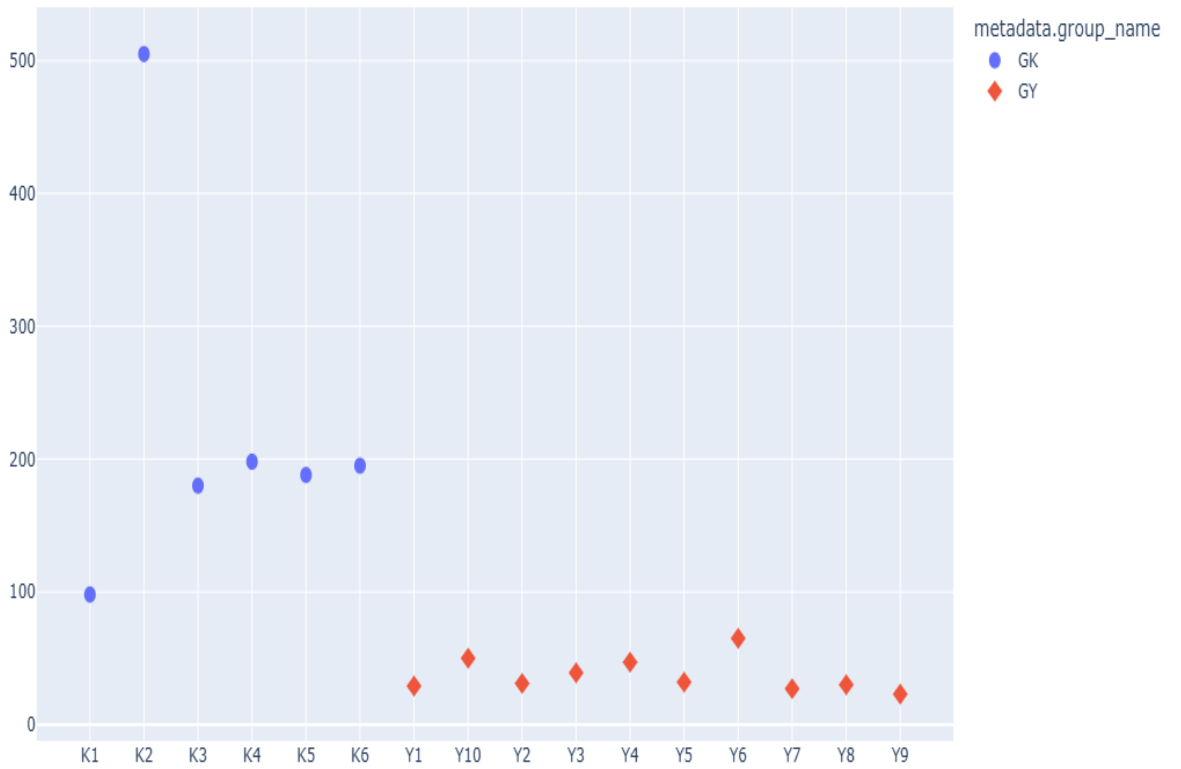
Kontrol grubu örneklerinin Chao1 ortalaması 227,33 olarak saptanmıştır. Bu yüksek Chao1 değerleri, sağlıklı sütün mikrobiyomunun zengin bir mikrobiyal çeşitliliğe ve yüksek takson zenginliğine sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 7).

Mastitis grupları Chao1 indeks değerlerine göre yüksekten düşüğe doğru sıralandığında; grup 6 (47,50), grup 3 (47,00), grup 2 (39,00), grup 5 (36,33), grup 1 (30,00), grup 4 (23,00) şeklinde bir dağılım ortaya çıkmaktadır. Grup 6 ile grup 4 arasındaki Chao1 farkı 24,50 olup, bu fark patotiplerin farklı profiller gösterdiğini göstermektedir.

*E. coli* mastitis gruplarındaki örnekler kendi aralarında incelendiğinde; grup 5 ve grup 6 örnekleri, grup içinde belirgin Chao1 varyasyonu göstermektedir. Grup 5'te Chao1 farkı 23,00 olup, grup 6'da ise 35,00 olmuştur. Buna karşın, diğer grup örnekleri kendi grupları içerisinde daha homojen bir Chao1 profili göstermektedir. *E. coli* mastitis örneklerinde grup bazında ortalama değerler incelendiğinde Shannon index ve Chao1 verilerinin uyumlu olduğu görülmektedir.

Kontrol grubu örnekleri incelendiğinde ise en yüksek Chao1 değeri 505 ile K2'de, en düşük değer ise 58 ile K1 örneğinde tespit edilmiştir. Diğer 4 örneğin değerleri 180-198 arasında saptanmıştır (Şekil 7).

K1 örneğinin kontrol grubu içerisinde en yüksek Shannon indeks değerine sahipken; Chao1 değerinin kontrol grubu içerisinde en düşük değerde bulunması tür sayısının az olduğunu ama mevcut olan türlerin birbirine çok yakın oranda yani dengeli olarak bulunduğu şeklinde yorumlanmıştır.



**Şekil 7.** Örneklerin Chao1 indeks grafiği.

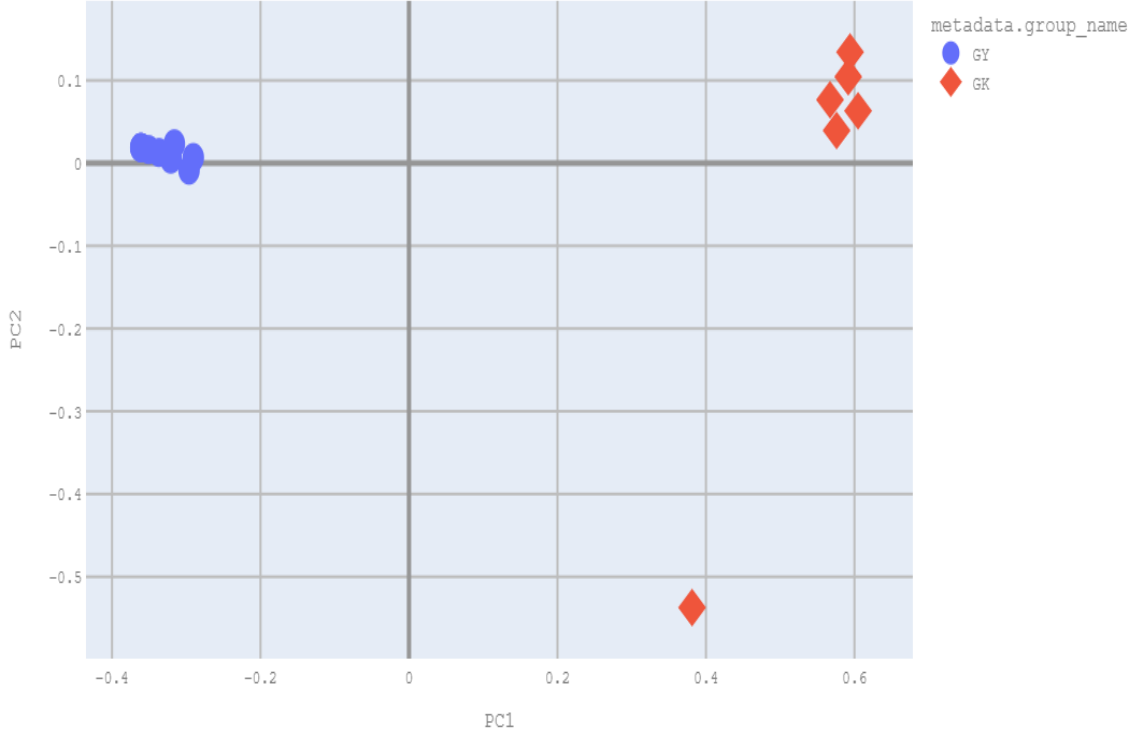
◆ : *E. coli* mastitisli sütler; ● : Sağlıklı sütler

#### 4.3.4. Beta Çeşitlilik Analizi Bulguları

Sağlıklı süt örnekleri incelendiğinde, K2, K3, K4, K5 ve K6 örneklerinin aralarındaki arasındaki Bray-Curtis mesafe aralığı 0,37 ile 0,50 aralığında tespit edilmiştir. Buna karşın, K1 örneğinin diğer sağlıklı süt örneklerine olan Bray-Curtis mesafe aralığı 0,68 ile 0,73 olarak bulunmuştur. Bu bulgu, K1 örneğinin kontrol grubu içinde diğer örneklerden önemli derecede farklı bir mikrobiyom yapısına sahip olduğunu göstermektedir. Grafikte K1 örneğinin PC1 değeri 0,40 olarak hesaplanmıştır. K2, K3, K4, K5 ve K6 örneklerinin PC1 ortalaması 0,66 olup, aralık 0,62 ile 0,70 arasında değişmektedir. K1'in PC1 değeri (0,40), K2-K6 örneklerinin PC1 ortalamasından 0,26 birim daha düşüktür. Bu 0,26 birimlik fark, K1 örneğinin PC1 ekseninde diğer kontrol örneklerinden sol tarafta (daha düşük PC1 değerinde) konumlandığını göstermektedir. K1 örneğinin PC2 değeri 0,08 olarak hesaplanmıştır. K2, K3, K4, K5 ve K6 örneklerinin PC2 ortalaması 0,046 olup, aralık 0,03 ile 0,06 arasında değişmektedir. K1'in PC2 değeri (0,08), K2-K6 örneklerinin PC2 ortalamasından 0,034 birim daha yüksektir. Bu fark, K1 örneğinin PC2 ekseninde diğer kontrol örneklerinden yukarıda (daha yüksek PC2 değerinde) konumlandığını göstermektedir (Şekil 8).

*E. coli* mastitis örneklerinin tamamı ve kontrol grubu örnekleri arasında PC1 ekseninde 0,88 birim fark belirlenmiş olup, bu fark mastitis enfeksiyonunun sütün mikrobiyom yapısında meydana getirdiği net değişikliği göstermektedir. Mastitis grubu PC1 ortalaması -0,26 iken, kontrol grubu PC1 ortalaması 0,61 olarak belirlenmiştir. PC2 ekseninde ise mastitis grubu ve kontrol grubu arasında 0,18 birim fark gözlenmiştir. Mastitis grubu PC2 ortalaması -0,13 iken, kontrol grubu PC2 ortalaması 0,05 olarak belirlenmiştir. Bu fark, mastitis enfeksiyonunun sütün mikrobiyomunda ikincil seviyede de değişikliklere neden olduğunu göstermektedir.

*E. coli* mastitis grupları ise kendi aralarında karşılaştırıldığında PC1 eksenindeki grupların farklarının 0,03-0,07 arasında seyrettiği belirlendi. Grup 3 ve grup 4, PC1 ekseninde aynı değere (-0,26) sahip olduğu tespit edildi. PC2 ekseninde değerlendirildiğinde ise grup 1 ve grup 4 örnekleri üzerinde pozitif değerlerde (0,01 ile 0,02) konumlanmışken; grup 5 ve grup 6 örnekleri ise negatif değerlerde (-0,24 ile -0,32) konumlanmıştır. Bu ayrılık, *E. coli* mastitis patotiplerinin sütün mikrobiyom yapısında farklı karakteristikler meydana getirdiğini göstermektedir.



**Şekil 8.** Örneklerin Bray-Curtis, 2 boyutlu Temel Koordinat Analiz (PcoA) grafiği.

◆ : Sağlıklı sütler; ● : *E. coli* mastitisli sütler

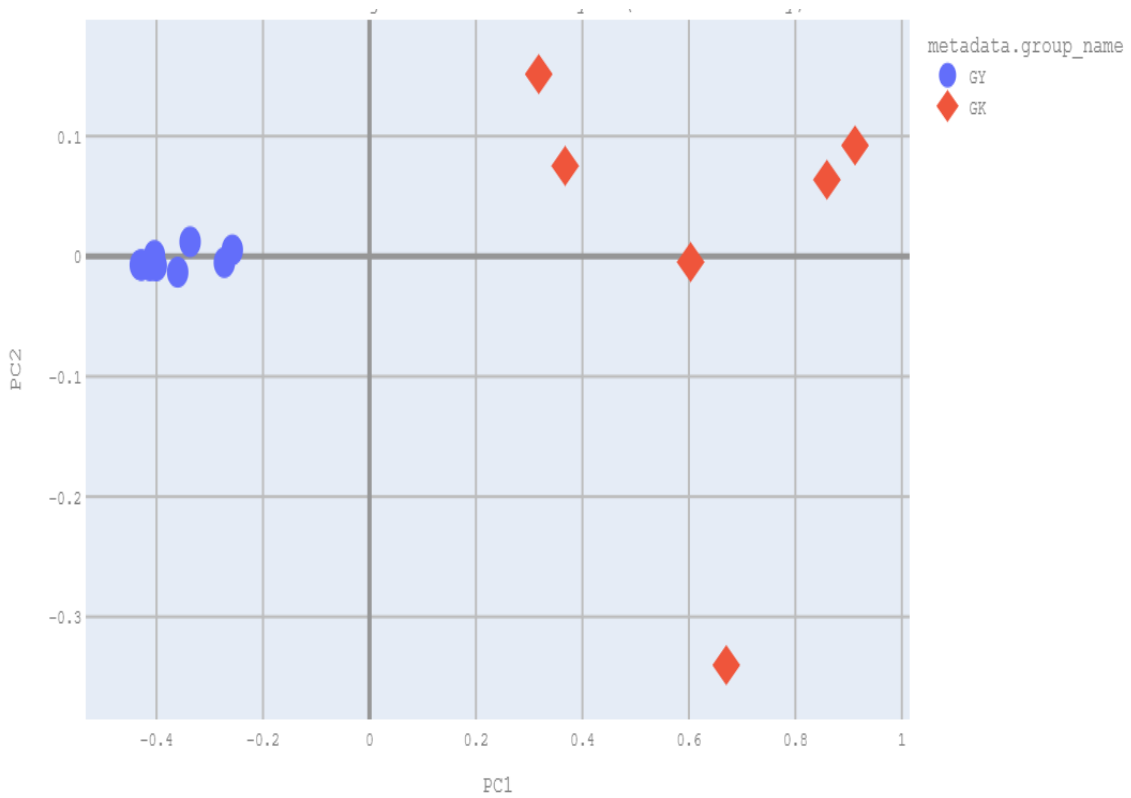
Sağlıklı süt örneklerinin Weighted UniFrac mesafesi tablosuna dayalı PCoA analizi sonucunda, kontrol grubu örneklerinin PC1 ekseninde 0,15 ile 0,80 aralığında (ortalama 0,47) geniş bir dağılım gösterdiği görülmektedir. PC2 ekseninde ise kontrol grubu örnekleri -0,33 ile 0,13 aralığında (ortalama -0,006) konumlanmış olup, bu dağılım Bray-Curtis analizine kıyasla daha heterojen bir yapı göstermektedir. Kontrol grubu örnekleri PCoA grafiğinde sağ tarafta (kırmızı kare) konumlanmış olup, PC1 ve PC2 eksenleri üzerinde belirgin farklılıklar gözlenmiştir (Şekil 9).

Mastitis grubu ve kontrol grubu örnekleri arasında PC1 ekseninde 0,75 birim fark tespit edilmiş olup, bu fark mastitis enfeksiyonunun sütün mikrobiyom yapısında meydana getirdiği net değişikliği göstermektedir. PC2 ekseninde ise mastitis grubu ve kontrol grubu arasında 0,003 birim fark gözlenmiştir. Mastitis grubu PC2 ortalaması -0,01 iken, kontrol grubu PC2 ortalaması -0,006 olarak belirlenmiştir. Bu çok küçük fark, Weighted UniFrac analizi açısından PC2 ekseninin mastitis ve kontrol gruplarını ayırmada Bray Courtis kadar etkili olmadığını göstermektedir.

Weighted UniFrac analizi açısından, K1 örneğinin kontrol grubu içindeki konumu, Bray-Curtis analizinden önemli ölçüde farklıdır. Bray-Curtis analizinde K1'in ortalama mesafesi 0,70

olup, tüm kontrol örnekleri arası ortalama mesafeden 0,19 birim daha yüksek iken; Weighted UniFrac analizinde K1'in ortalama mesafesi 0,50 olup, tüm kontrol örnekleri arası ortalama mesafeden sadece 0,046 birim daha yüksektir. Bu fark, K1 örneğinin takson bileşimi açısından çok farklı olsa da, filogenetik açıdan orta düzey farklı olduğunu göstermektedir.

Mastitis grubu içinde grup 1 ve grup 4 örnekleri PC1 ekseninde -0,32 ile -0,28 aralığında sıkı bir küme oluşturmuş olup, grup 5 ve grup 6 örnekleri PC1 ekseninde -0,30 ile -0,20 aralığında konumlanmıştır. Bu verilerin sonucunda Weighted UniFrac analizinin, Bray-Curtis analizine kıyasla patotip grupları arasında daha az farklılık gösterdiği görülmektedir.



**Şekil 9.** Örneklerin Weighted Unifrac 2 boyutlu Temel Koordinat Analiz (PCoA) grafiği.

◆ : Sağlıklı sütler; ● : *E. coli* mastitisli sütler

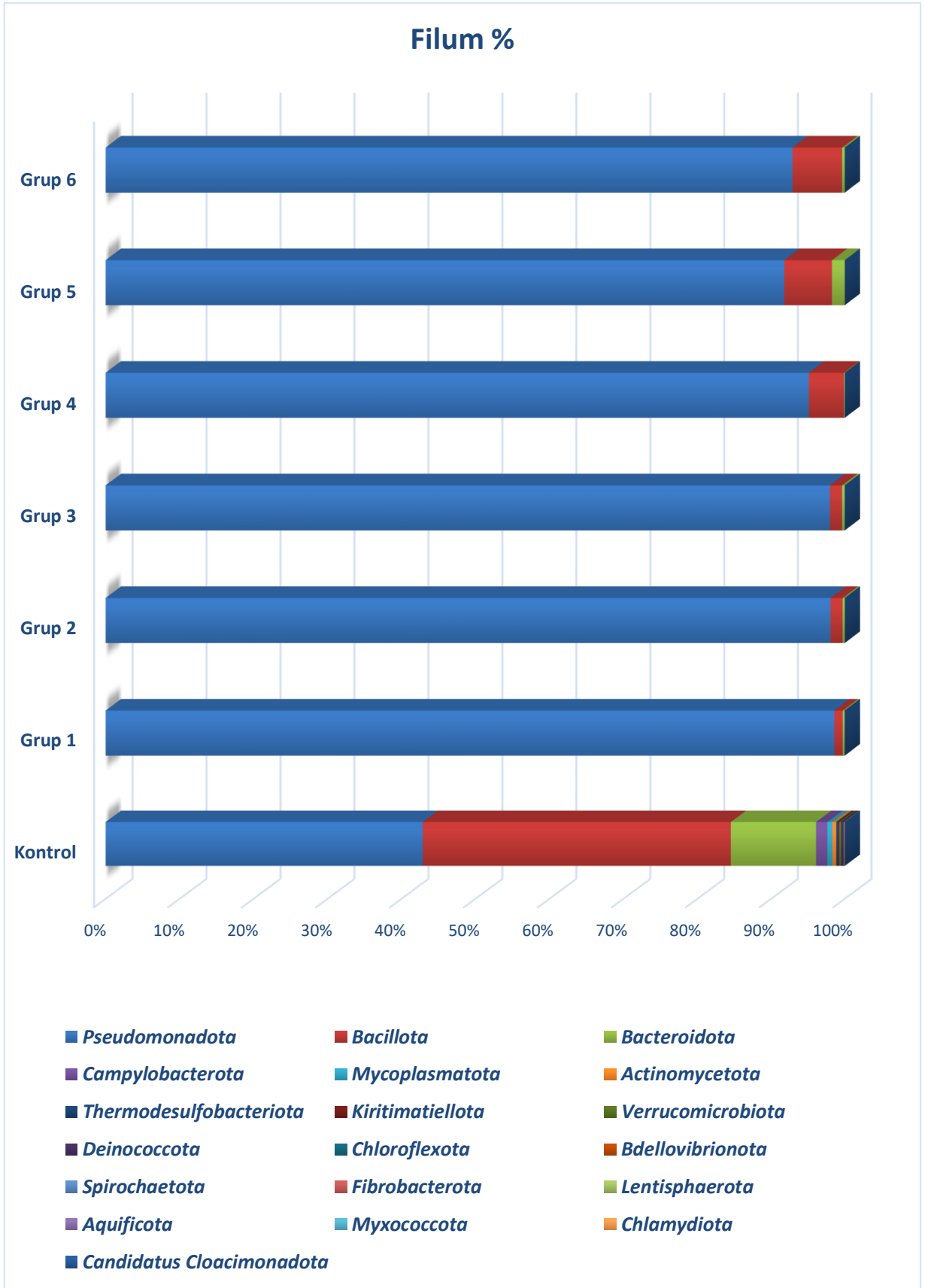
#### 4.3.5. Filum Düzeyinde Taksonomik Dağılım Bulguları

Kontrol grubu örneklerinin filum düzeyinde mikrobiyom analizi sonucunda, sağlıklı sütün mikrobiyom yapısı belirlenmiştir. Kontrol grubunda baskın filumlar *Bacillota* (%41,65), *Pseudomonadota* (%42,86) ve *Bacteroidota* (%11,58) olarak saptanmıştır. Bu üç filum, kontrol grubu örneklerinin toplam mikrobiyomunun %96,10'unu oluşturmaktadır. Kontrol grubu

örneklerinde *Bacillota* ve *Pseudomonadota* filumlarının neredeyse eşit oranlarda bulunması, sağlıklı sütün mikrobiyomunun dengeli bir filum yapısına sahip olduğunu göstermektedir.

*E. coli* mastitis enfeksiyonu ile ilişkili 6 patotip grubu örneklerinin filum düzeyinde analizi sonucunda, enfeksiyonun sütün mikrobiyom yapısında belirgin değişiklikleri meydana getirdiği belirlenmiştir. Mastitis grubu örneklerinde baskın filumlar *Pseudomonadota* (%94,94), *Bacillota* (%4,33) ve *Bacteroidota* (%0,72) olarak saptanmıştır. Bu üç filum, mastitis grubu örneklerinin toplam mikrobiyomunun %99,99'unu oluşturmaktadır. Mastitis grubu örneklerinde *Pseudomonadota* filumunun baskın hale gelmesi, *E. coli* mastitis enfeksiyonunun sütün filum düzeyinde mikrobiyom yapısında ciddi değişikliğe neden olduğunu göstermektedir.

Grup 1 örneklerinin filum düzeyinde analizi sonucunda, %98,58 *Pseudomonadota*, %1,15 *Bacillota* ve %0,24 *Bacteroidota* olarak saptanmıştır. *Pseudomonadota* oranı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında %55,71 puan artarken *Bacillota* oranı ise %40,51 puan azalmıştır. Grup 2 örneklerinin filum düzeyinde analizi sonucunda, %98,06 *Pseudomonadota*, %1,64 *Bacillota* ve %0,29 *Bacteroidota* olarak saptanmıştır. *Pseudomonadota* oranı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında %55,20 puan artmıştır. Grup 3 örneklerinin filum düzeyinde analizi sonucunda, Grup 1 ve Grup 2'ye benzer filum profili gözlenmiştir. Grup 3 örneklerinde %97,99 *Pseudomonadota*, %1,64 *Bacillota* ve %0,34 *Bacteroidota* olarak saptanmıştır. *Pseudomonadota* oranı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında %55,13 puan artmıştır. Grup 4 örneklerinin filum düzeyinde analizi sonucunda, %95,13 *Pseudomonadota*, %4,76 *Bacillota* ve %0,11 *Bacteroidota* olarak saptanmıştır. *Pseudomonadota* oranı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında %52,27 puan artmıştır. Grup 5 örneklerinin filum düzeyinde analizi sonucunda, %91,77 *Pseudomonadota*, %6,49 *Bacillota* ve %1,74 *Bacteroidota* olarak saptanmıştır. *Pseudomonadota* oranı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında %48,91 puan artmıştır. Grup 5, *Bacillota* ve *Bacteroidota* oranları açısından diğer mastitis gruplarından daha yüksek değerlere sahip olduğu görülmektedir. Grup 6 örneklerinin filum düzeyinde analizi sonucunda, %92,89 *Pseudomonadota*, %6,74 *Bacillota* ve %0,36 *Bacteroidota* olarak saptanmıştır. *Pseudomonadota* oranı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında %50,03 puan artmıştır. Bu verilere göre filum bazında en belirgin fark olarak, grup 5 ve grup 6'da *Pseudomonadota* filumundaki artış diğer 4 gruba göre %5-6 daha düşük olarak saptanmıştır. Diğer baskın filumlardaki düşme oranları incelendiğinde ise *Bacillota* filum yoğunluğu grup 5 ve grup 6'da %6, grup 4'de %4 seviyelerinde seyrederken diğer 3 grupta %1 seviyelerinde tespit edilmiştir (Şekil 10).



Şekil 10. Patotip ve kontrol gruplarının filumlarının yüzde olarak dağılımı.

Bu çalışmada gruplar arasında en yüksek yüzde oranlarına sahip filumlar Tablo 10'da gösterilmektedir.

**Tablo 10.** Kontrol grubu ve *E. coli* mastitis gruplarında en yüksek tespit edilen filumların karşılaştırma tablosu.

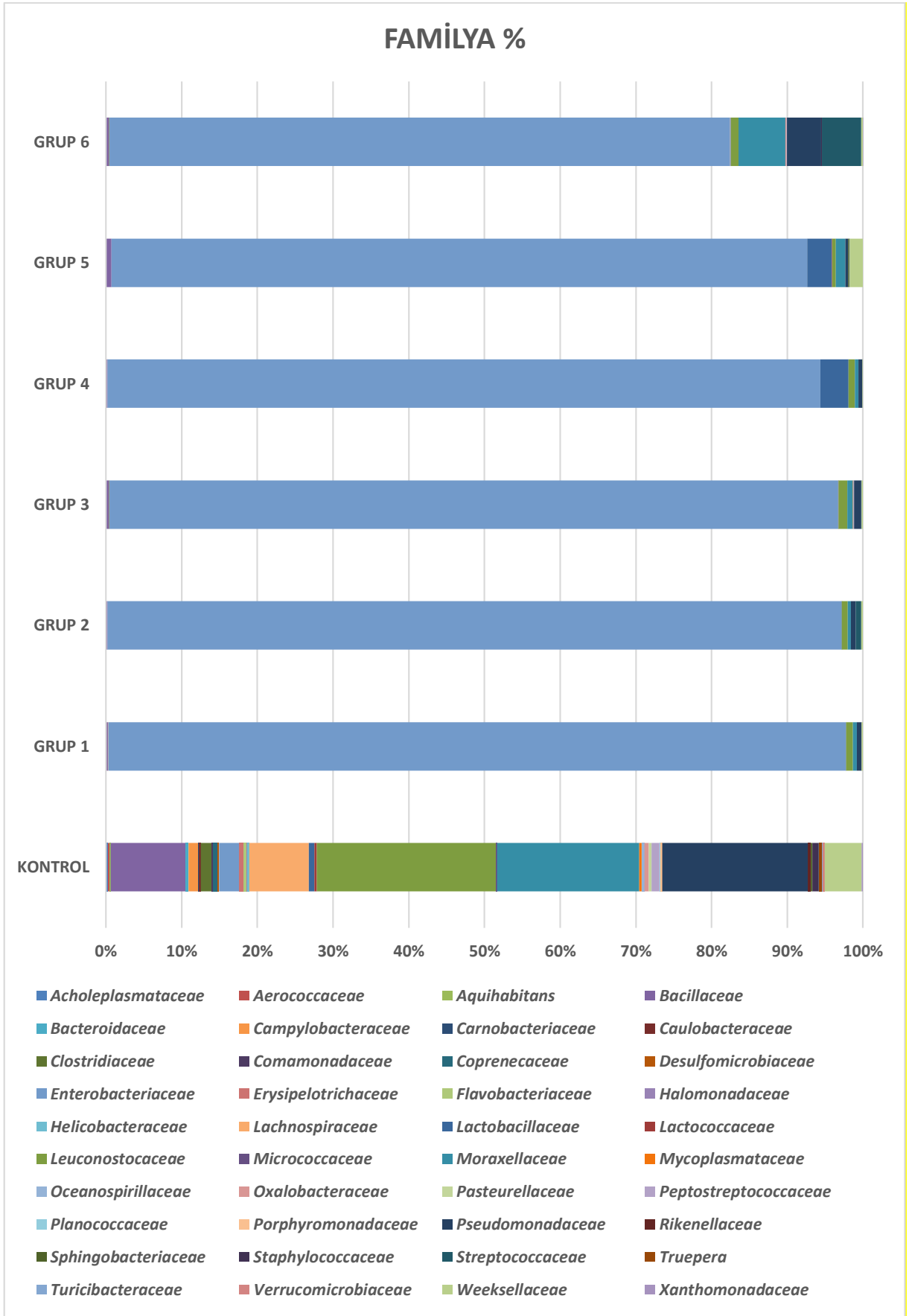
<b>Filum</b>	<b>Kontrol %</b>	<b>Grup 1 %</b>	<b>Grup 2 %</b>	<b>Grup 3 %</b>	<b>Grup 4 %</b>	<b>Grup 5 %</b>	<b>Grup 6 %</b>
<i>Pseudomonadota</i>	42,86	98,57	98,06	97,98	95,13	91,77	92,89
<i>Bacillota</i>	41,65	1,14	1,643	1,64	4,75	6,48	6,74
<i>Bacteroidota</i>	11,58	0,24	0,29	0,34	0,11	1,73	0,36
<i>Campylobacterota</i>	1,53	0,03	-	-	-	-	-
<i>Mycoplasmata</i>	0,68	-	-	0,03	-	-	-
<i>Actinomycetota</i>	0,51	-	-	-	-	-	-
<i>Thermodesulfobacteriota</i>	0,26	-	-	-	-	-	-

Sağlıklı süt örneklerinde (kontrol grubu) mikrobiyom %42,86 *Pseudomonadota*, %41,65 *Bacillota* ve %11,58 *Bacteroidota* filumlarından oluşmaktadır. Bununla birlikte, *Escherichia coli* mastitisli inek sütlerinde mikrobiyom profili keskin bir şekilde değişmiştir. Mastitis gruplarında *Pseudomonadota* filumunun oranı %91,77 ile %98,57 arasında değişerek kontrol grubuna kıyasla 2,1 ile 2,3 kat artmıştır. Özellikle grup 1 ve grup 2'de bu oran sırasıyla %98,57 ve %98,06 olarak tespit edilmiştir. Buna karşılık, sağlıklı süt florasının önemli bileşeni olan *Bacillota* filumunun oranı mastitis gruplarında %1,14 ile %6,74 arasında değişerek kontrol grubunun %41,65'ine kıyasla 6 ile 36 kat azalmıştır. *Bacteroidota* filumu da benzer şekilde %0,24 ile %1,73 arasında değişerek kontrol grubunun %11,58'ine kıyasla 6,7 ile 48 kat azalmıştır. *Campylobacterota*, *Mycoplasmata* ve *Actinomycetota* filumları ise kontrol grubunda sırasıyla %1,53, %0,68 ve %0,51 oranında bulunmasına rağmen, mastitis gruplarında neredeyse tamamen ortadan kaybolmuştur. Bu bulgular, *E. coli* enfeksiyonunun patojenin ait olduğu *Pseudomonadota* filumunun dominasyonunu sağlarken, sağlıklı meme florasının temel bileşenlerini baskıladığını açıkça göstermektedir. Mastitis grupları arasında da filum düzeyinde değişkenlik gözlenmiştir; Grup 5'te *Pseudomonadota* oranı %91,77 olup diğer gruplara kıyasla

biraz daha düşükken, *Bacillota* (%6,48) ve *Bacteroidota* (%1,73) oranları daha yüksek bulunmuştur. Bu farklılıklar, enfeksiyonun şiddeti, hastalığın süresi ve hayvan bireysel faktörleri gibi değişkenlerin mikrobiyom kompozisyonunu etkileyebileceğini göstermektedir.

#### 4.3.6. Familya Bazında Taksonomik Dağılım Bulguları

Sağlıklı sütün mikrobiyomu (kontrol) grubunda *Leuconostocaceae* (%22,89) en yüksek orana sahiptir. Bu grupta *Pseudomonadaceae* (%18,70) ve *Moraxellaceae* (%18,18) de önemli yer tutarken, *Enterobacteriaceae* ailesi minimal düzeyde (%2,59) bulunmaktadır. *E. coli* mastitis gruplarında ise *Enterobacteriaceae* ailesinin baskınlığı tüm gruplarda belirgindir. Monomikrobiyel enfeksiyonlar olarak sınıflandırılan grup 1 (%97,36), grup 2 (%96,93) ve grup 3 (%96,14) yüksek *Enterobacteriaceae* oranları ile karakterize edilmektedir. Grup 6 en heterojen profili göstermektedir. Grup 6'da *Enterobacteriaceae* (%81,91)'nin yanında *Moraxellaceae* (%6,14), *Streptococcaceae* (%5,15) ve *Pseudomonadaceae* (%4,51) gibi önemli sekonder patojenlerin bulunduğu familyalar yer almaktadır. Süt mikrobiyomunda familyaların, kontrol grubu ve *E. coli* mastitis grupları arasında önemli farklılıkları Şekil 11'de gösterilmektedir.



Şekil 11. Patotip ve kontrol gruplarının familiyelerinin yüzde olarak dağılımı.

Sığır sütü örneklerinde tespit edilen mikrobiyom profili, kontrol grubu ile mastitis grupları arasında belirgin farklılıklar göstermektedir. Kontrol grubunda *Leuconostocaceae* (%22,89), *Pseudomonadaceae* (%18,70) ve *Moraxellaceae* (%18,18) en baskın familyalar olarak tespit edilirken, *Enterobacteriaceae* oranı %2,59 düzeyinde tespit edilmiştir. Buna karşılık, *E. coli* mastitis gruplarında *Enterobacteriaceae* en baskın familya olarak tespit edilmiş olup, bu oran %81,91 ile %97,36 arasında değişmektedir. *E. coli* mastitis gruplarında en yüksek oranda *Enterobacteriaceae* familyası %97,36 ile grup 1’de; en düşük oranda ise %81,91 ile grup 6’da tespit edildi (Tablo 11).

**Tablo 11.** Kontrol grubu ve *E. coli* mastitis gruplarında en yüksek tespit edilen familyaların karşılaştırma tablosu.

Familiya	Kontrol %	Grup 1 %	Grup 2 %	Grup 3 %	Grup 4 %	Grup 5 %	Grup 6 %
<i>Bacillaceae</i>	9,57	0,26	0,20	0,43	0,19	0,73	0,38
<i>Enterobacteriaceae</i>	2,59	97,36	96,93	96,14	94,13	91,84	81,91
<i>Lachnospiraceae</i>	7,61	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillaceae</i>	0,7	-	-	-	3,69	3,25	-
<i>Leuconostocaceae</i>	22,89	0,92	0,76	1,16	0,88	0,45	1,03
<i>Moraxellaceae</i>	18,18	0,51	0,45	0,73	0,43	1,29	6,14
<i>Peptostreptococcaceae</i>	1,02	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	18,70	0,64	0,63	0,97	0,56	0,38	4,51
<i>Streptococcaceae</i>	0,1	-	0,73	-	-	-	5,15
<i>Weeksellaceae</i>	4,74	0,17	0,21	0,18	-	1,74	0,23

Grup 1: ETEC+EPEC/EHEC+EHEC; Grup 2: ETEC+EPEC/EHEC+EHEC+EHEC; Grup 3: ETEC+EPEC/EHEC; Grup 4: ETEC+EPEC/EHEC+EHEC; Grup 5: ETEC; Grup 6: ETEC+EHEC

#### 4.3.7. Genus Bazında Taksonomik Dağılım Bulguları

Sağlıklı sütün mikrobiyom profili, çeşitli bakteriyel türlerin dengeli bir şekilde bulunması ile karakterize edilmektedir. Kontrol grubunda en baskın genuslar sırasıyla *Leuconostoc* (%22,89), *Pseudomonas* (%18,70) ve *Acinetobacter* (%16,59) olarak tespit edilmiştir. *Escherichia coli*, sağlıklı sütün mikrobiyomunda minimal düzeyde bulunmakta (%2,47), bu da doğal süt mikrobiyomunda *E. coli*'nin belirli seviyede bulunmasına karşın bir enfeksiyona sebep olmadığını göstermektedir. Kontrol grubunun homojen ve dengeli mikrobiyom yapısı, sütün doğal bağışıklık mekanizmalarının etkin bir şekilde çalıştığını ve mikrobiyal dengenin kontrol altında tutulduğunu göstermektedir (Şekil 12).

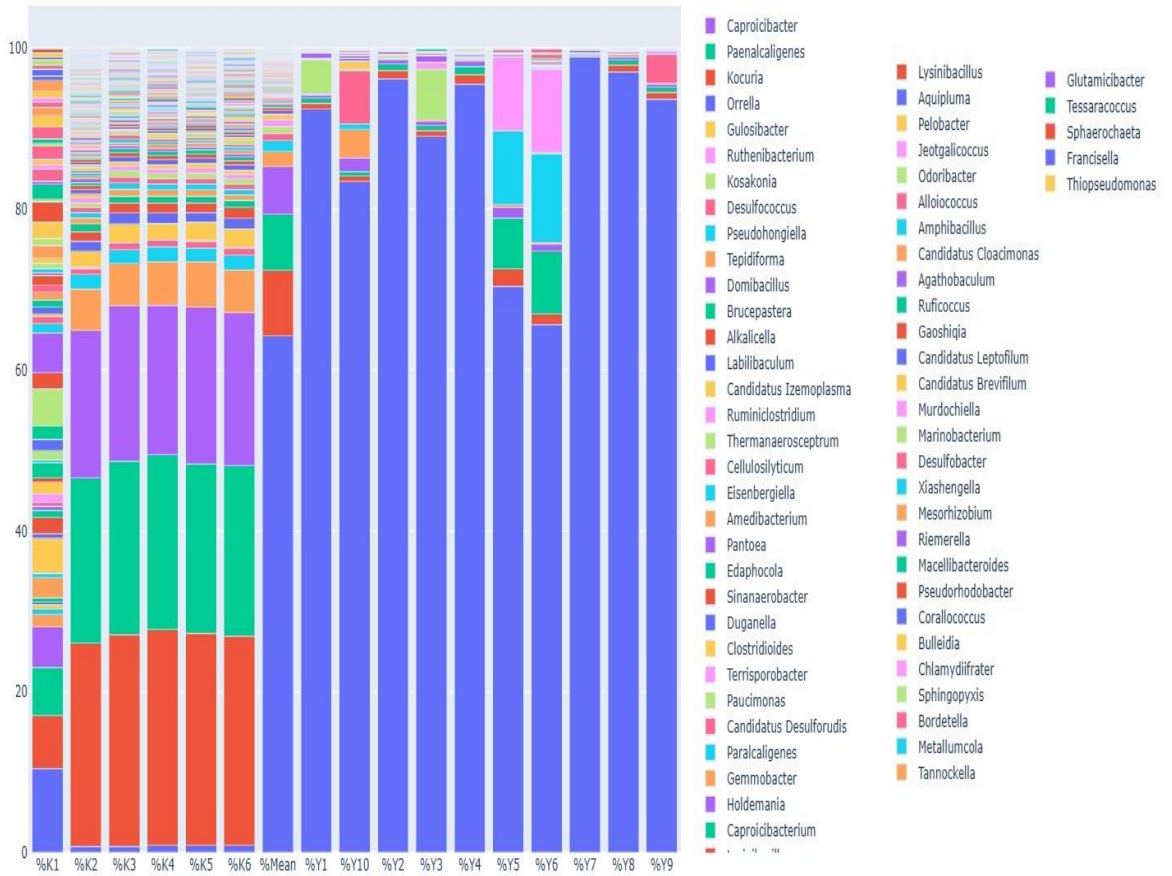
*E. coli* mastitis enfeksiyonlu numunelerde sütün bakteriyel dengesinde keskin bir değişim gözlenmiştir. Mastitis gruplarında *Escherichia coli*, %88,24 oranında baskın hale gelerek, sütün mikrobiyom yapısını tamamen değiştirmiştir. Bu bulgu, *E. coli* enfeksiyonunun sütün bakteriyel dengesini bozarak, baskın bir disbiyozis tablosuna ve kommensal bakterilerin baskılanmasına yol açtığını göstermektedir.

*E. coli* mastitisli sütlerde kontrol grubuna göre en fazla artış gösteren genuslar sırasıyla; *Escherichia* (*E. coli*), *Streptococcus*, *Klebsiella* ve *Shigella* olarak tespit edildi. *E. coli* kontrol grubunda %2,47 iken yaklaşık 33 katlık artışla mastitis gruplarında %88,24'e yükselmiştir. *Streptococcus* kontrol grubunda %0,1 iken, mastitis gruplarında %2,91'e çıkmıştır. *Klebsiella* kontrol grubunda tespit edilmezken, mastitis gruplarında %1,60 oranında bulunmuştur. *Shigella* kontrol grubunda tespit edilmezken, mastitis gruplarında %0,36 oranında tespit edildi.

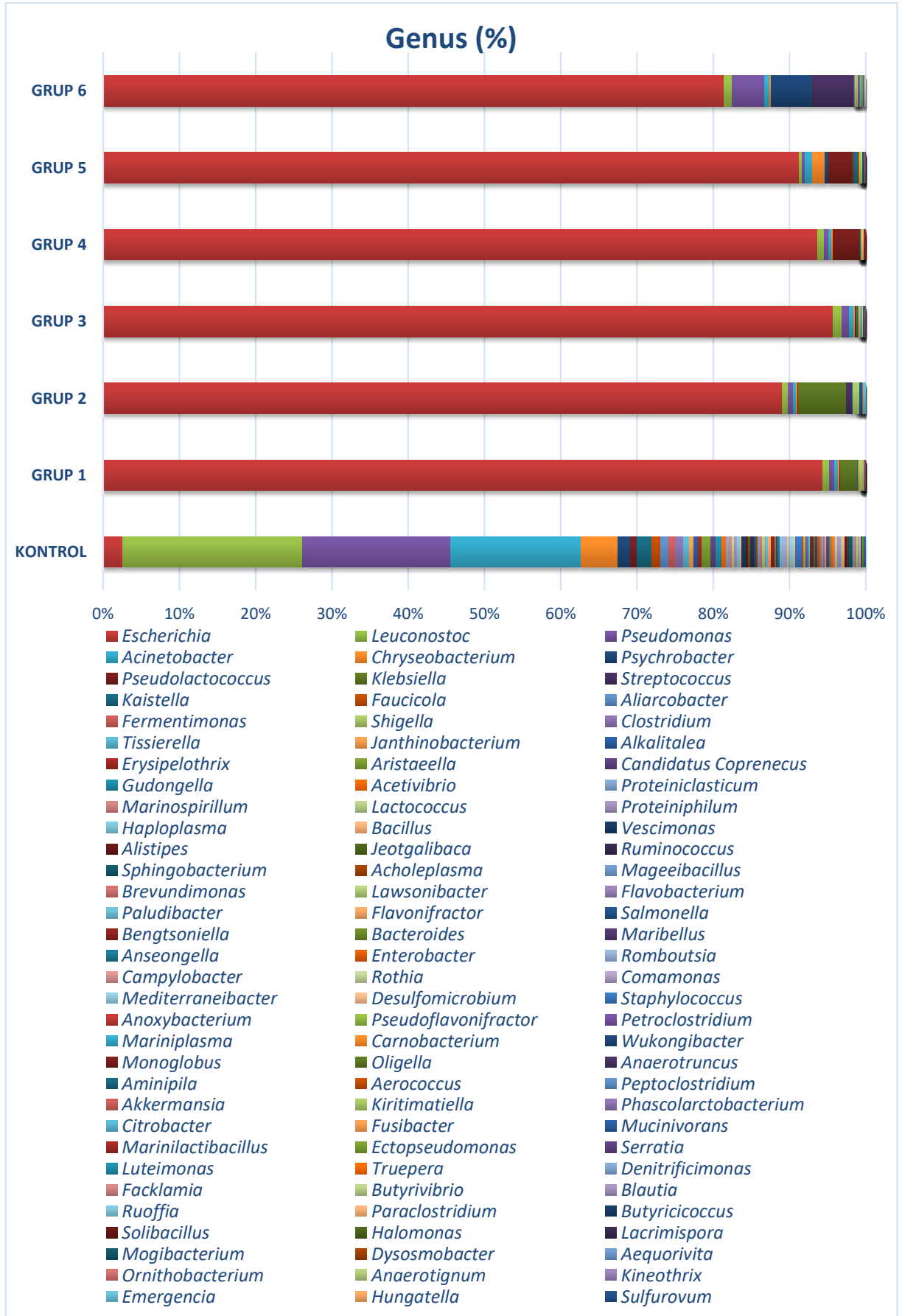
Kontrol grubu ve 6 adet *E. coli* mastitis gruplarında tespit edilen genusların Şekil 13'de yüzde grafiği verilmiştir. Grafiğe göre, kontrol grubu tarafından baskın olan *Leuconostoc*, mastitis gruplarında önemli ölçüde azalmıştır. *Leuconostoc* yüzdesi kontrol grubunda %22,88 iken, mastitis gruplarında ortalama % 0,86 olarak bulunarak %22 oranındaki azalma mastitis enfeksiyonunun sütün doğal laktik asit bakteri florasını baskıladığını net bir şekilde göstermektedir. Benzer şekilde, *Pseudomonas* kontrol grubunda %18,69 iken mastitis gruplarında ortalama %1,24 ve *Acinetobacter* kontrol grubunda %16,59 iken mastitis gruplarında ortalama %0,59'a düştüğü görülmektedir. Mastitis grupları arasında genus bileşimleri açısından bazı farklılıklar görülmüştür. Grup 2 %6,33, grup 1 %2,26 *Klebsiella* yüzdelere sahip olduğu tespit edilirken; diğer mastitis gruplarında *Klebsiella* genusu tespit edilmemiştir. Grup 6, diğer mastitis gruplarından farklı olarak, *Psychrobacter* (%5,51),

*Streptococcus* (%5,14) ve *Pseudomonas* (%4,24) gibi ek Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin daha yüksek yüzde oranlarda içerdiği belirlendi. Patotipler arasındaki farklılıklar, *E. coli*'nin farklı virülens faktörleri taşıyan suşlarının sütün mikrobiyom yapısında yarattığı disbiyozis ile farklı sekonder enfeksiyonlara neden olabileceği şeklinde de yorumlanabilir.

*E. coli* mastitis gruplarında tespit edilen en yüksek 5 genus laktik asit bakterileri (*Leuconostoc*, *Pseudolactococcus*) yönünden incelendiğinde en düşük oranda içeren gruplar %0,75 ile grup 2 ve %0,92 ile grup 1 olmuştur.



**Şekil 12.** Mastitis ve kontrol grubu örneklerinin genus düzeyinde mikrobiyom profili.



Şekil 13. Patotip ve kontrol gruplarının genüslerinin yüzde olarak dağılımı.

*E. coli* mastitis gruplarında *Escherichia* genusu en yüksek grup 3 (%95,59)'de bulunurken; en düşük grup 6 (%81,38)'da tespit edildi.

Gruplar arasında Tablo 12'de belirtilen en yüksek 5 genus gruplarda tüm mikrobiyom yapısının; grup 1'de %98,6; grup 2'de %97,6; grup 3'de %98,5; grup 4'de %99,2; grup 5'de %97,5, grup 6'da %97,3'ünü oluşturduğu saptandı. Kontrol grubunda ise belirtilen en yüksek 5 genus kontrol grubunun tüm mikrobiyomunun %65,3'ünü oluşturduğu tespit edildi. En yüksek tespit edilen genusların *E. coli* mastitis gruplarında ve sağlıklı kontrol örneklerinde tüm mikrobiyomu kapsadığı oranlar arasındaki bu yüksek fark infeksiyonun süt mikrobiyotasındaki çeşitliliği çok yüksek oranda düşürdüğünü göstermektedir.

**Tablo 12.** Kontrol grubu ve *E. coli* mastitis gruplarında en yüksek tespit edilen genusların karşılaştırma tablosu.

Genus	Kontrol	Grup 1 %	Grup 2 %	Grup 3 %	Grup 4 %	Grup 5 %	Grup 6 %
<i>Leuconostoc</i>	22,89	0,92	0,76	1,16	0,88	1,00	1,03
<i>Pseudomonas</i>	18,70	0,64	0,63	0,97	0,56	2,38	4,25
<i>Acinetobacter</i>	16,59	0,50	0,45	0,66	0,43	1,01	0,63
<i>Chryseobacterium</i>	4,74	0,17	0,21	0,18	-	1,27	0,23
<i>Escherichia</i>	2,47	94,30	89,03	95,59	93,68	84,26	81,38
<i>Kaistella</i>	1,92	-	-	0,1	-	0,37	-
<i>Psychrobacter</i>	1,58	-	-	-	-	3,32	5,51
<i>Klebsiella</i>	-	2,26	6,34	-	-	-	-
<i>Shigella</i>	-	0,56	0,82	0,21	0,21	0,19	0,16
<i>Streptococcus</i>	0,1	-	0,73	-	-	3,11	5,15
<i>Serratia</i>	0,11	-	-	0,15	-	-	-
<i>Pseudolactococcus</i>	0,70	-	-	-	3,69	2,19	-
<i>Clostridium</i>	1,04	-	-	-	-	-	-
<i>Ectopseudomonas</i>	-	-	-	-	-	0,10	0,26

Grup 1: ETEC+EPEC/EHEC+EHEC; Grup 2: ETEC+EPEC/EHEC+EHEC+EHEC; Grup 3: ETEC+EPEC/EHEC; Grup 4: ETEC+EPEC/EHEC+EHEC; Grup 5: ETEC; Grup 6: ETEC+EHEC

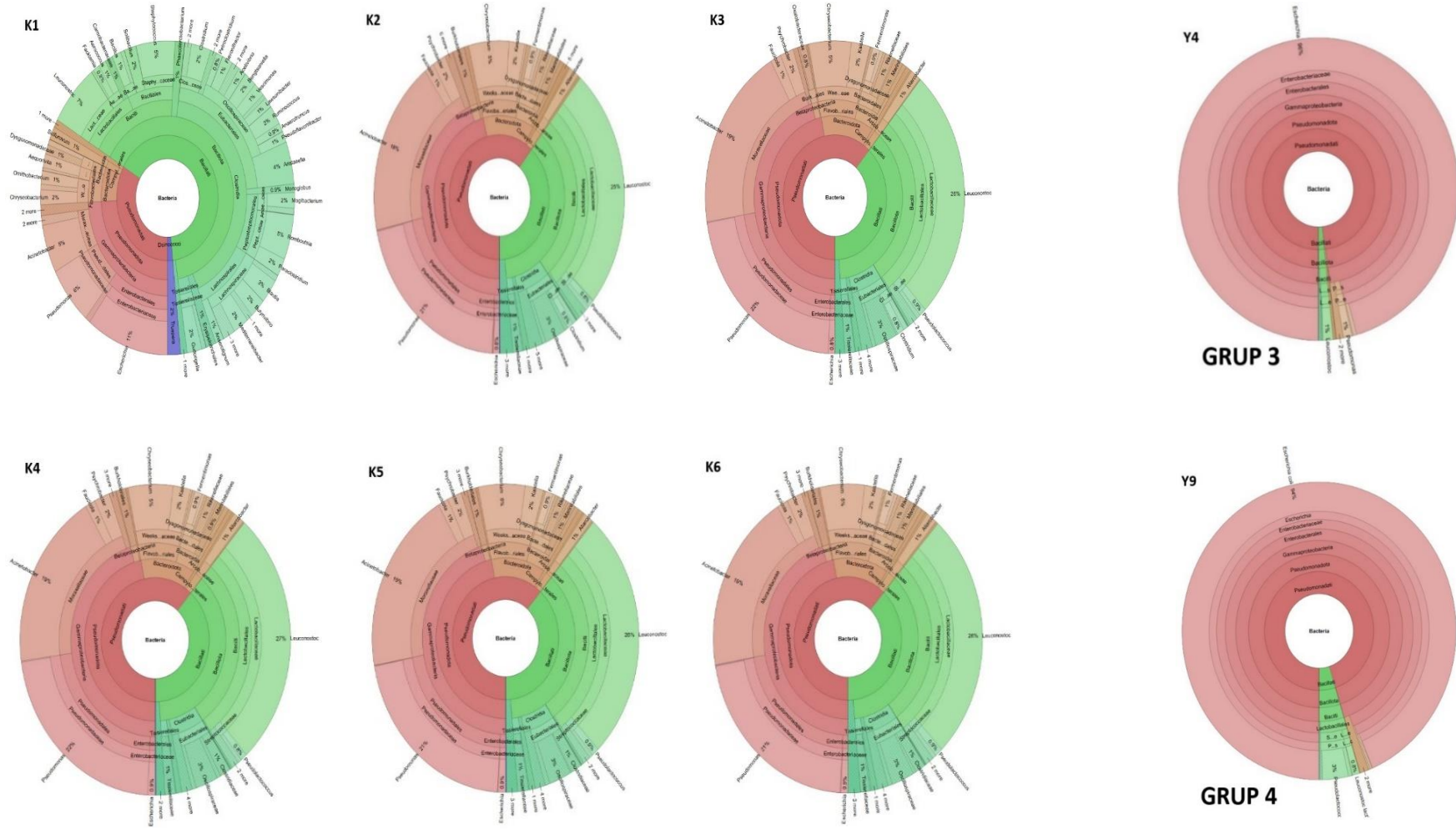
#### 4.3.8. Krona Analiz Bulguları

Krona analizlerinde kontrol grubu sağlıklı süt örnekleri (K1-K6) ve *E. coli* mastitis süt örneklerinin patotip grupları grup 1 (Y1,Y2), grup 2 (Y3) taksonomik bileşimi Şekil 14'de krona analizleri ile gösterilmiştir. Kontrol grubu örnekleri *Leuconostoc* (%22,88), *Pseudomonas* (%18,69) ve *Acinetobacter* (%16,59) gibi çeşitli laktik asit bakterileri ve gram negatif bakterileri içermekte olup geniş ve heterojen bir mikrobiyom profili göstermektedir. Buna karşın, kontrol grubunda *Escherichia coli* ortalama oranı %2,47 iken; grup 1 örneklerinde %94,29 oranında baskın olduğu dar ve homojen bir süt mikrobiyom profili görülürken, grup 2'de %89,02 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu içinde K1 örneği, diğer kontrol örneklerinden farklı bir mikrobiyom profili sergilemektedir. Bu bulgular, mastitis enfeksiyonunun sütün mikrobiyom yapısını net şekilde değiştirerek, mikrobiyal dengenin bozulması sonucu sütteki biyoçeşitliliği azalttığını göstermektedir.

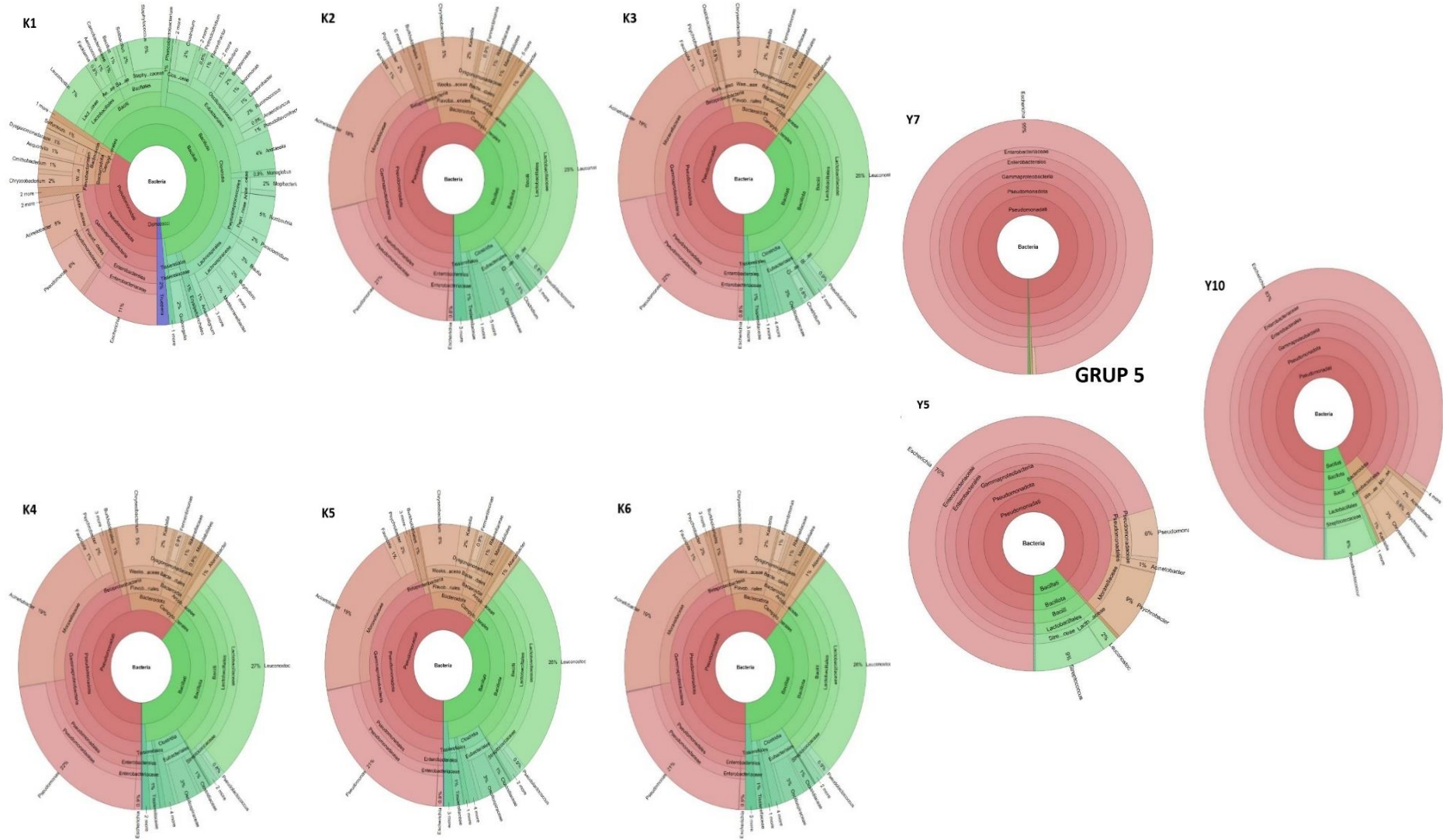
Sağlıklı süt örnekleri (K1-K6) ve *E. coli* mastitis süt örneklerinin patotip grupları grup 3 (Y4) ve grup 4 (Y9) taksonomik bileşimi Şekil 15'de krona analizleri ile gösterilmiştir. Kontrol grubu örneklerinde; *Leuconostoc*, *Pseudomonas* ve *Acinetobacter*'in yoğun miktarda bulunduğu çeşitli bir mikrobiyom profili göstermektedir. Kontrol grubunda *Escherichia coli* ortalama oranı %2,47 iken; grup 3'de %95,59, grup 4'de %93,68 olarak tespit edilmiştir. Grup 4 %3,68 seviyesinde *Pseudolactococcus* tespit edilirken kontrol grubunda bu oranın %0,7 olması dikkat çekmektedir.

Sağlıklı süt örnekleri (K1-K6) ve *E. coli* mastitis süt örneklerinin patotip grupları grup 5 (Y5, Y7,Y10) ve grup 6 (Y6,Y8) taksonomik bileşimi Şekil 16 ve Şekil 17'de krona analizleri ile gösterilmiştir. Grup 5' de *Escherichia coli* ortalama oranı %84,25 grup 6 örneklerinde ise %81,37 olarak belirlenirken diğer mastitis gruplarından farklı olarak, *Psychrobacter* (%11) ve *Streptococcus* (%5,14) gibi sekonder patojenlerin yüksek oranlarında bulunduğu tespit edilmiştir. Grup 6'nın heterojen mikrobiyom profili, bu patotip grubunun polimikrobiyal enfeksiyonlar ile ilişkili olabileceğini ve farklı virülens mekanizmaları taşıyabileceğini göstermektedir.

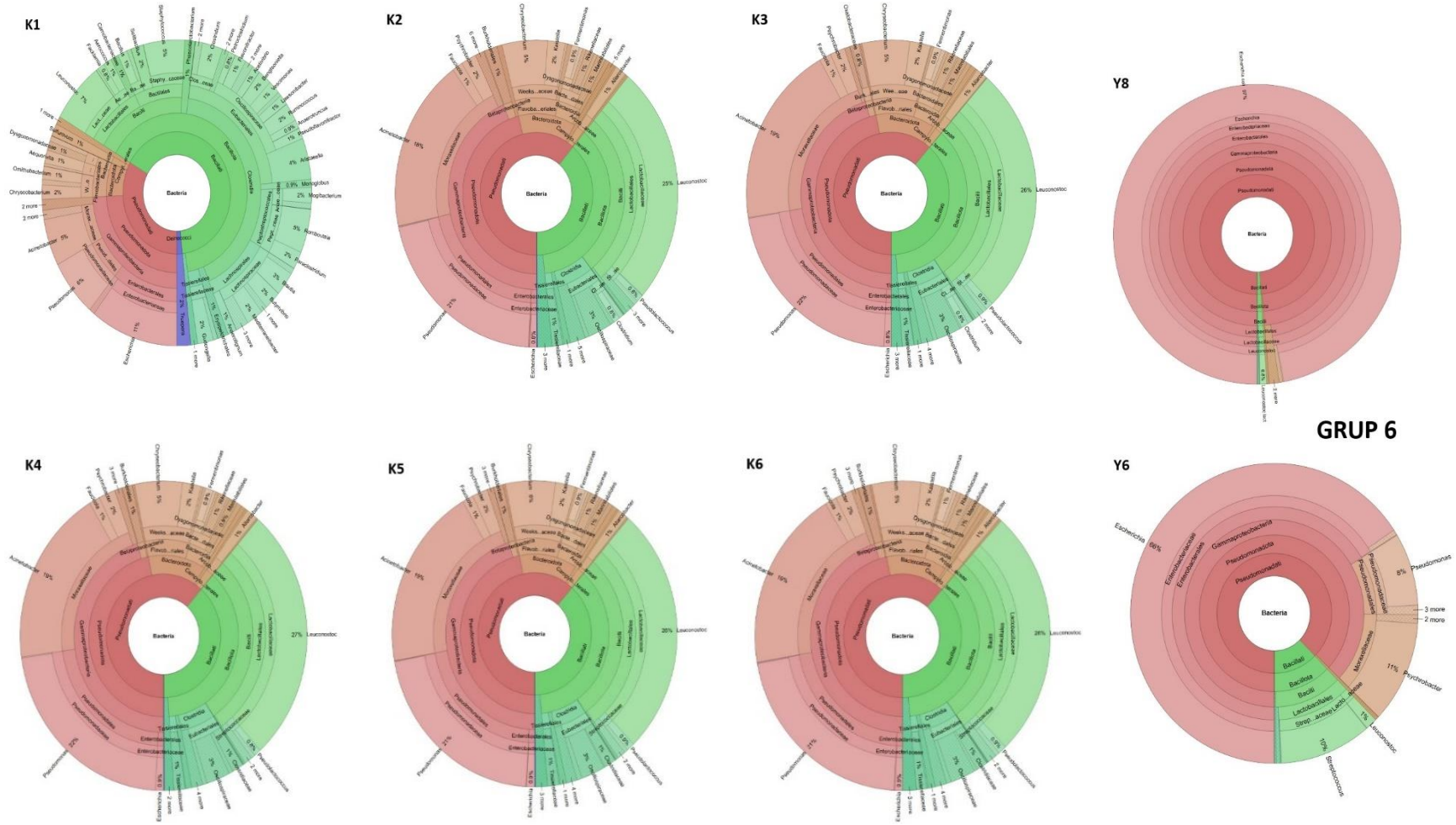




Şekil 15. Kontrol grubu ile *E. coli* mastitis grup 3 ve grup 4'ün Krona analizleri.



Şekil 16. Kontrol grubu ile *E. coli* mastitis grup 5'in Krona analizleri.

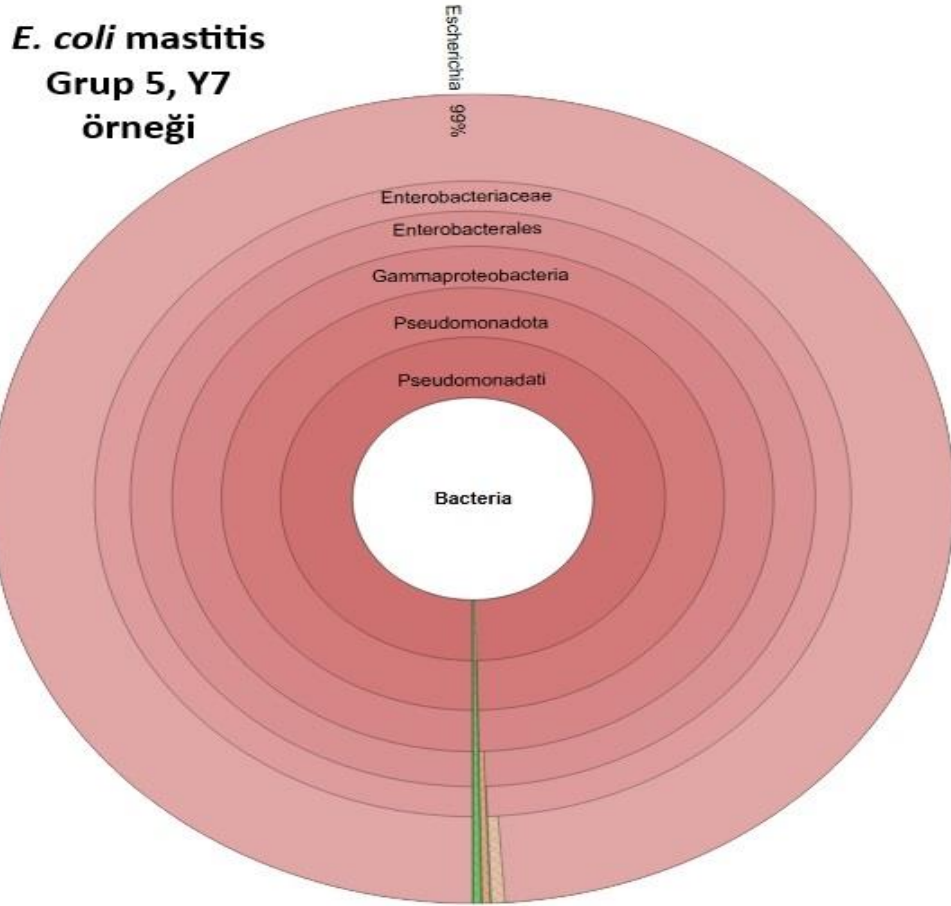


Şekil 17. Kontrol grubu ile *E. coli* mastitis grup 6'nın Krona analizleri.





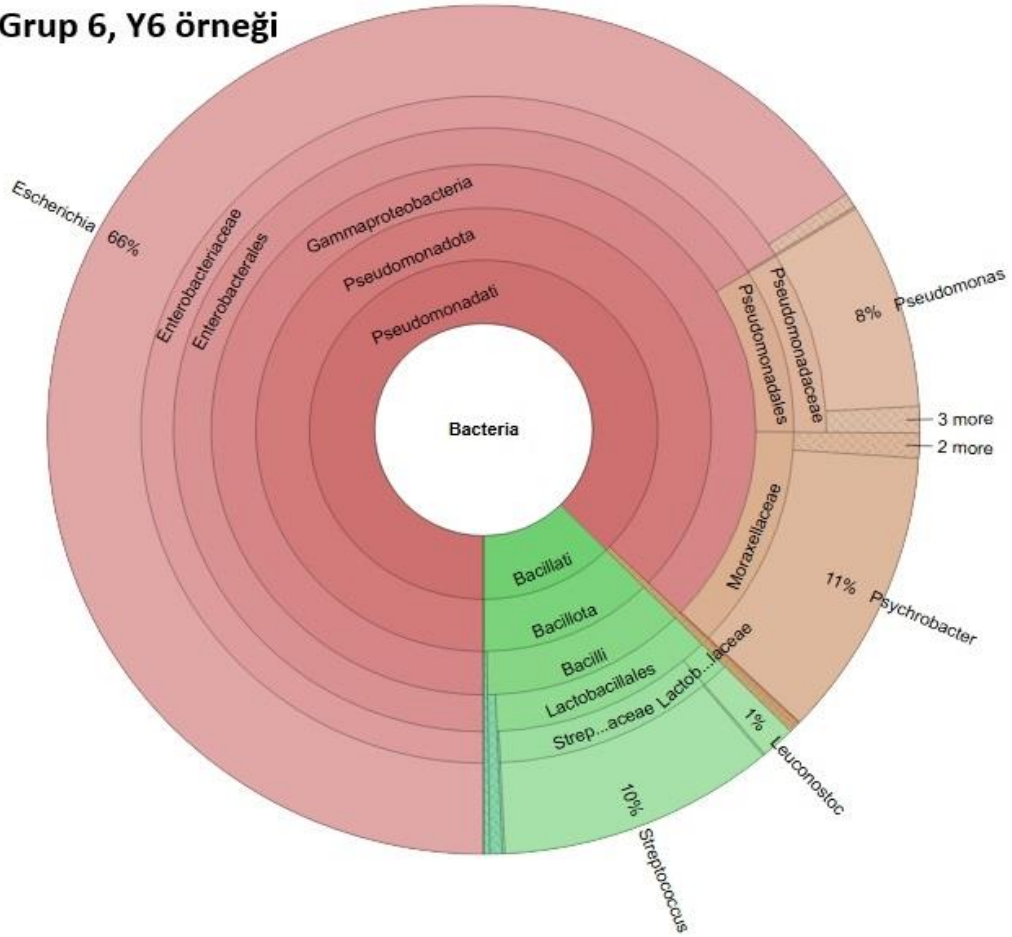
Grup 5, Y7 örneği, *E. coli* mastitis enfeksiyonunun belirgin mikrobiyom profilini yansıtmakta olup, *Escherichia coli*'nin %98,9 oranı ile diğer tüm örneklere kıyasla en yüksek bulunduğu örnek olmuştur. Krona grafiğinde görüldüğü üzere, *Enterobacteriaceae* familyası neredeyse tüm süt mikrobiyomunu oluşturmakta diğer bakteri türleri ise minimal düzeylerde bulunmaktadır. Kontrol grubu örneklerinde *Leuconostoc* (%22,88), *Pseudomonas* (%18,69) ve *Acinetobacter* (%16,59) gibi çeşitli bakteri türleri bulunurken, özellikle *Leuconostoc* gibi laktik asit bakterileri çalışma içerisinde grup 1 örneklerinde olduğu gibi Y5'de oran olarak en düşük seviyelerde bulunurken grup 5'deki diğer örneklerde değişkenlik göstermiştir (Şekil 20).



Şekil 20. *E. coli* mastitis grup 5, Y7 örneği Krona analiz grafiği.

Grup 6'da bulunan Y6 örneği, *E. coli* mastitis örnekleri içinde en heterojen mikrobiyom profiline sahip olup, *Escherichia coli*'nin %81,37 oranında baskın olduğu görülmektedir. Ancak, diğer mastitis örneklerinden farklı olarak, *Psychrobacter* (%11), *Streptococcus* (%10,3) ve *Pseudomonas* (%7,8) gibi patojenlerin daha yüksek oranlarda bulunduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular, Grup 6 patotipinin farklı mikrobiyom yapısı diğer patotiplerden farklı şiddetle infeksiyon oluşturabilme veya sekonder infeksiyonlara daha yatkın olabileceği şeklinde yorumlanabilir. Krona grafiğinde görüldüğü üzere, *Enterobacteriaceae* familyası hala baskın olsa da, gram pozitif ve gram negatif diğer bakteri türlerinin varlığı bu örneği mastitis grubu içinde en farklı örnek olduğunu göstermektedir (Şekil 21).

### *E. coli* mastitis Grup 6, Y6 örneği

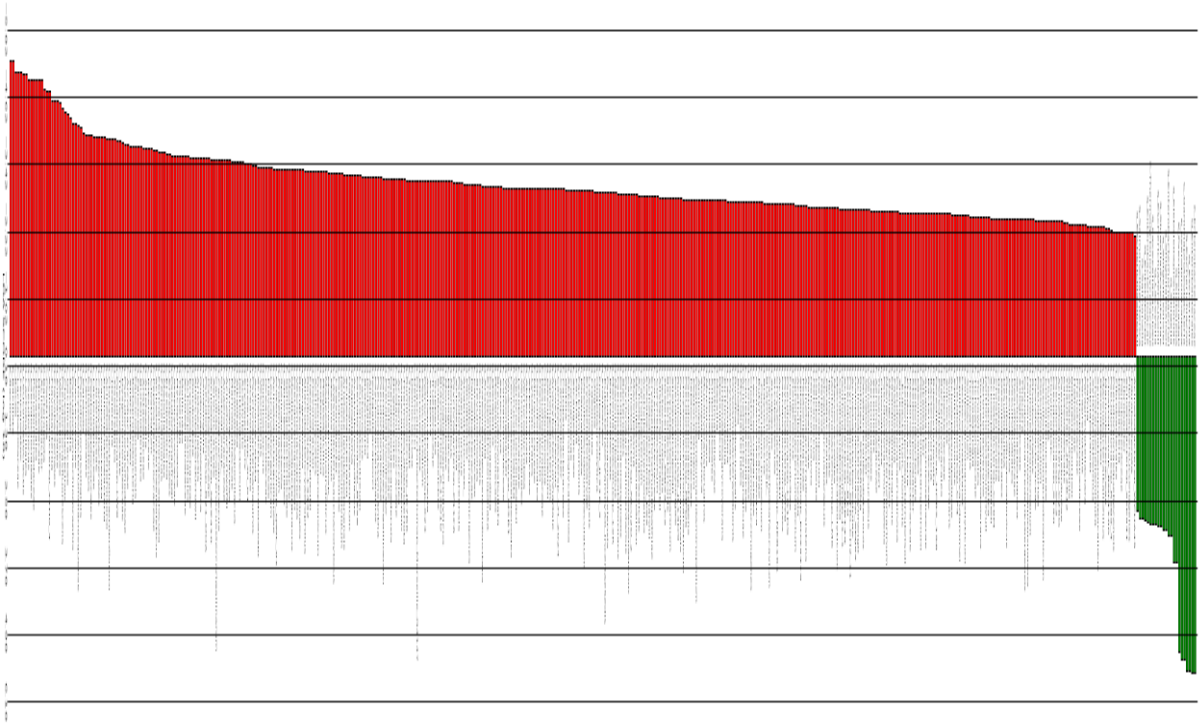


Şekil 21. *E. coli* mastitis grup 6, Y6 örneği Krona analiz grafiği.

#### 4.3.9. Lineer Diskriminant Etki Analizi (Lefse) Bulguları

Lineer Diskriminant Etki Analizi (Lefse) sağlıklı süt (kontrol) ve *E. coli* mastitis enfeksiyonlu örnekler arasında istatistiksel olarak anlamlı ve etki büyüklüğü yüksek olan taksonomik biyobelirteçleri tanımlamak için kullanılmıştır (Şekil 22).

Kontrol grubu (kırmızı barlar) tarafından baskın olan taksonomik birimlerin, sağlıklı süt mikrobiyomunun doğal florasını oluşturan laktik asit bakterileri ve diğer Gram negatif proteobakterileri içerdiği gözlenmiştir. Bu taksonomik birimlerin yüksek Lefse skorları, sağlıklı süt mikrobiyomunun karakteristik belirteçleri olduğunu göstermektedir. Kontrol grubunun geniş taksonomik profili, sağlıklı süt ortamında mikrobiyom çeşitliliğinin yüksek olduğunu ve birçok farklı bakteri türünün koeksistans içinde bulunduğunu göstermektedir. *E. coli* mastitis grubu (yeşil barlar) tarafından baskın olan taksonomik birimlerin, enfeksiyonun etiyolojik ajanı olan *E. coli* ve sekonder enfeksiyonlara neden olabilecek diğer patojenik bakterileri daha yüksek oranda içerdiği gözlenmiştir. Yeşil barların kontrol grubuna kıyasla çok daha dar bir aralıkta yoğunlaşması, mastitis enfeksiyonunun sütün mikrobiyotasında mikrobiyal çeşitliliği belirgin şekilde değiştirdiğini göstermektedir. *E. coli* mastitis grubunun Lefse skorları, bu taksonomik birimlerin enfeksiyonlu süt ortamında ayırt edici biyobelirteçler olduğunu ve sağlıklı süt mikrobiyomundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı olduğunu göstermektedir (Şekil 22).



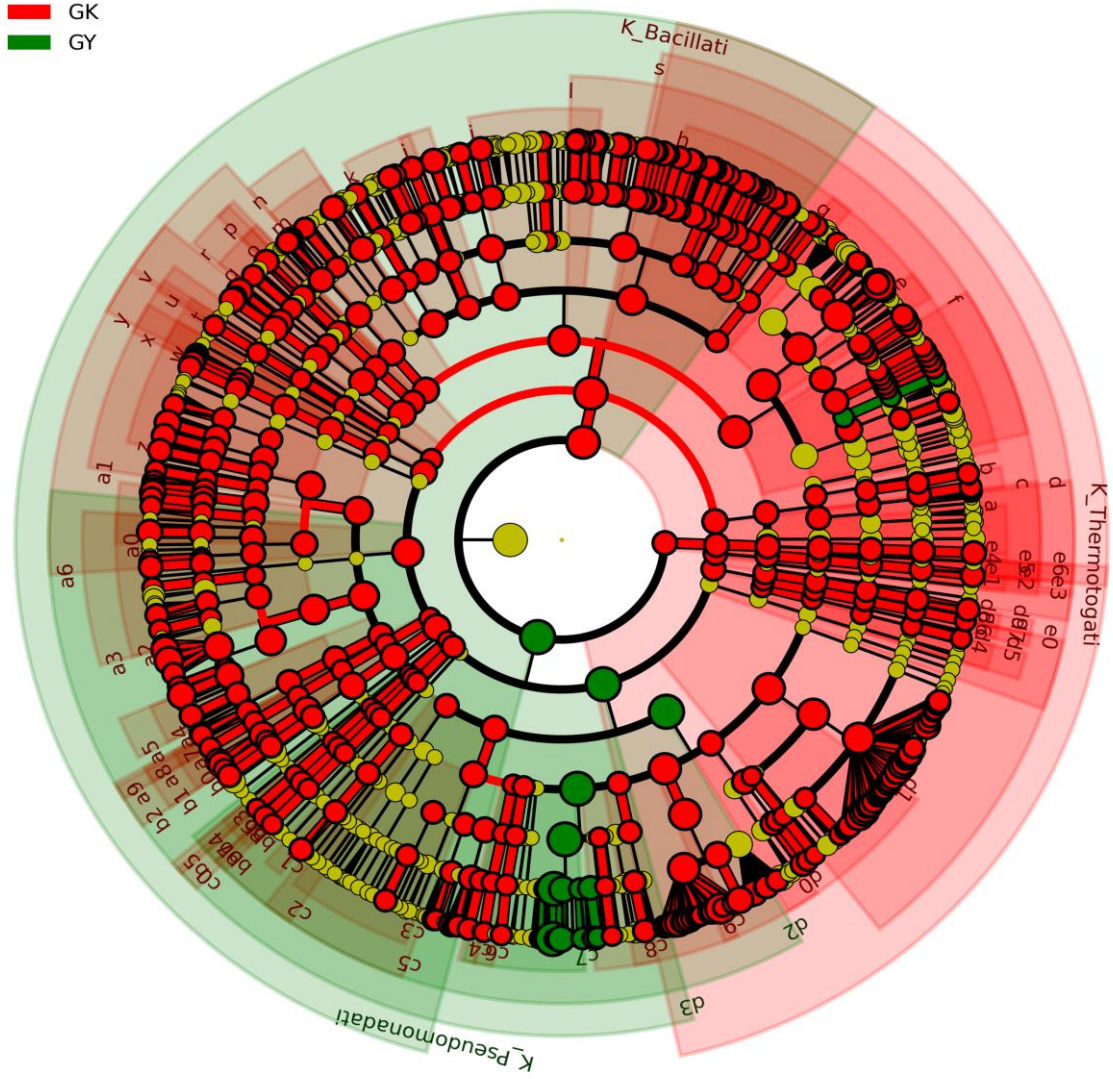
**Şekil 22.** Kontrol ve *E. coli* mastitis enfeksiyonlu süt örnek genularının Lefse (Linear Diskriminant Etki) analiz grafiği.

■ Kontrol örnekleri; ■ : *E. coli* mastitis örnekleri

Kontrol grubu süt örnekleri ve *E. coli* mastitis süt örneklerinin Şekil 23'deki kladogramda merkezden dışarıya doğru uzanan dallar ile farklı taksonomik seviyeleri (Filum, Sınıf, Takım, Aile, Cins) gösterilmektedir. Kladogramın iç halkaları, kontrol grubu ve mastitis grubu örnekleri arasında belirgin bir ayrılma göstermektedir. Kontrol grubu örnekleri kladogramın geniş bir bölgesine yayılmış olup, çeşitli filogenetik dallara dağılmıştır. Bu dağılım, sağlıklı süt mikrobiyomunun filogenetik açıdan çeşitli ve heterojen bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Kontrol grubu tarafından baskın olan taksonomik birimlerin, *Bacillota* ve *Pseudomonata* gibi farklı filogenetik köklerden gelen bakterileri içerdiği görülmektedir.

Mastitis grubu örnekleri ise kladogramın belirli bölgelerine yoğunlaşmış olup, sınırlı sayıda filogenetik dallara ait olduğu gözlenmiştir. Kladogramın sağ tarafında, mastitis grubu tarafından baskın olan *Enterobacteriaceae* familyası belirgin şekilde vurgulanmıştır. Mastitis grubu örneklerinin bu belirli filogenetik alan içerisinde yoğunlaşması, *E. coli* mastitis

enfeksiyonunun sütün mikrobiyom yapısını keskin bir şekilde değiştirdiğini ve mikrobiyal çeşitliliğini azalttığını göstermektedir.



**Şekil 23.** Lefse (Lineer Diskriminant Etki) kladogramları: Genus düzeyinde taksonomik hiyerarşi grafiği.

■ Kontrol örnekleri; ■ : *E. coli* mastitis örnekleri

## 5. TARTIŞMA

Çalışmada, 115 mastitisli süt örneğinin 23'ünde (%20) *E. coli* saptanmıştır. Bu prevalans oranı, Dahesa ve diğerleri (2025) tarafından Etiyopya'da mastitis örneklerinde bildirilen %22,6, Xu ve diğerleri (2022) tarafından Çin'de rapor edilen %26,9 ve Orsi ve diğerleri (2023) tarafından Brezilya'da rapor edilen %26,9'luk oranla yüksek düzeyde uyumluluk göstermektedir. Guner ve diğerleri (2024) tarafından Türkiye'de bildirilen %36,3 oran ise önemli oranda yüksek olarak öne çıkmaktadır. Mastitis vakalarında *E. coli* prevalansı ile ilgili diğer güncel çalışmalar incelendiğinde ise; Tekkal ve Tel (2022) tarafından Türkiye'de mastitis örneklerinde bildirilen %7,7, Pereira ve diğerleri (2024) tarafından Brezilya'da bildirilen %6 ve Bechtold ve diğerleri (2024) tarafından Almanya'da 2014-2023 yılları arasında mastitisli örneklerde bildirilen %3 oranı ile uyuşmadığı görülmüştür.

İzolatların patotiplerinin belirlenmesi sonucunda ortaya çıkan çeşitlilik, çalışmadaki en dikkat çekici bulgu olarak ön plana çıkmaktadır. Özellikle ETEC (%39,1) ve izolatlarda tespit edilen hibrit patotipler sığır meme dokusunun farklı patojenik özelliklere sahip *E. coli* suşları için bir rezervuar görevi görebileceğini göstermektedir. Ayrıca, çalışmamızda patotip tespitinde kullanılan 3 virülens geninin pozitif olarak tespit edildiği karmaşık hibrit profiller toplam izolatların %21,7'sini oluşturmaktadır. Yapılan *E. coli* kaynaklı sığır mastitis çalışmalarında ETEC prevalansını Liu ve diğerleri (2021) %6, Stella ve diğerleri (2012) %12, Momtaz ve diğerleri (2012) %3,2 olarak tespit etmişlerdir. Genel *E. coli* kaynaklı mastitis çalışmaları incelendiğinde bu çalışmada ETEC prevalansının önemli ölçüde yüksek olduğu görülmektedir.

Çalışmada izole edilen 23 *E. coli* izolatının %60,9'unun hibrit patotip özelliği sergilemesi diğer benzer çalışmalar ile karşılaştırıldığında oldukça yüksek bir prevalansı temsil etmektedir. Örnek olarak Momtaz ve diğerleri (2012) tarafından yapılan çalışmada, mastitisli sütlerden izole edilen EHEC izolatlarının prevalansını %31; ETEC+EHEC hibrit izolatlarının oranını %4,1 olarak bildirilirken, bizim bulgularımızda sadece ETEC+EHEC hibrit izolatların oranı %34,8 olarak saptanmıştır. Mastitis dışındaki sığır kaynaklı diğer çalışmalar incelendiğinde STEC+ETEC hibrit patotipinin prevalansını Amerika'da Shridhar ve diğerleri (2024) %12,6, Nyholm ve diğerleri (2015) ise %10 olarak tespit etmişlerdir.

Benzer şekilde, Liu ve diğerleri (2021) süt örneklerinde shiga toksin üreten izolat prevalansını %9 olarak raporlamış olup hibrit izolatların STEC+ETEC ve STEC+EPEC'den

oluşturduğunu ve oranının %4,5 olduğunu raporlamışlardır. Bizim çalışmamızda *eae* ile *stx1* veya *stx2* genlerinin bir arada bulunma oranı %17,4 olarak saptanmış olup, bu veri Stella ve diğerleri (2012) tarafından sığır sütünde bildirilen %4'lük hibrit patotip prevalansının oldukça üzerinde olduğu görülmektedir.

Çalışmadaki *eae* pozitif izolat oranı %26,1 olarak tespit edilmiş olup diğer güncel çalışmalar ile karşılaştırıldığında Hindistan'da sığır mastitislerinde yapılan bir çalışmada neredeyse 2 katı oranda %43,2 bulunduğu görülmektedir (Nalband ve diğerleri, 2020). Diğer güncel mastitis çalışmaları *eae* prevalans oranları açısından incelendiğinde, Liu ve diğerleri (2021) Çin'de %4,5; Ismail ve Abutarbush (2020) Ürdün'de %64; My ve diğerleri (2023) Vietnam'da %4; Nüesch-Inderbilen ve diğerleri (2019) ise İsviçre'de bu geni tespit etmediklerini raporlamışlardır. Nalband ve diğerleri (2020)'nin haricinde diğer yapılan çalışmalarda *eae* prevalansının oldukça düşük olduğu görülmektedir. İzolatlarda bulunan hibrit patotipler incelendiğinde *eae* ile *stx1* veya *stx2* genlerinin birlikte bulunduğu izolat oranı bu çalışmada yine %26,1 olarak bulunurken diğer güncel sığır mastitis çalışmalarında bu oran %2-%5 arasında değişmektedir

Bu çalışmada *bfpA* geni testi yapılmamış olup bu genin *E. coli* mastitis izolatlarında literatürde doğrudan izolatan atipik EPEC (aEPEC) olarak tanımlanmasını sağlamaktadır. Sığır mastitisi ile alakalı genel olarak yapılan çalışmalarda saptanan EPEC'lerin %95'inden fazlasının atipik olduğu bildirilmektedir (Liu ve diğerleri, 2021; Stella ve diğerleri, 2012).

Çalışmada izolatların önemli bir kısmında *stx1* ve *stx2* genlerinin tespit edilmesi, sığır mastitisinin sadece hayvan sağlığı ile sınırlı kalmayarak halk sağlığı açısından da ciddi bir tehdit oluşturduğunu göstermektedir. Murinda ve diğerleri (2019), sığırların STEC için ana rezervuar olduğunu ve mastitisli sütün bu suşların insanlara bulaşmasında önemli bir araç olabileceğini vurgulamış ve yaptığı *E. coli* kaynaklı sığır mastitis çalışmasında STEC oranını %10 olarak tespit etmiştir. Chowdhury ve diğerleri (2025), mastitisli sütlerde STEC ile ilişkili *stx1* veya *stx2* genlerinin prevalansını %17,20 olarak saptamışlardır. Aynı çalışmada *stx1* ve *stx2* genlerinin ikisinin de bulunduğu izolat sayısı bu çalışmada olduğu gibi 1 adet olarak raporlanmıştır. Litt ve diğerleri (2025) farklı sığır kaynaklarından izole ettikleri *E. coli* izolatlarında STEC oranını %50 olarak tespit ederek bu çalışmadaki %56,5 oran ile uyumlu bir veri elde etmişlerdir. Aynı çalışmada *stx1* ve *stx2* genlerinin *eae* geni ile birlikte tespit oranı %4 iken bu çalışmada %21,7 olarak tespit edilmiştir. Güncel yapılan çalışmalar incelendiğinde *stx1* ve *stx2* genlerinin *eae* geni ile birlikte tespit edildiği en yüksek oran %11,1 ile Mısır'da yapılan bir mastitis çalışmasında kaydedilmiştir (El-Khabaz ve diğerleri (2022)).

Tespit edilen özellikle ETEC+EPEC/EHEC gibi hibrit patotipler, bakteriyel genomdaki horizontal gen transferinin bir sonucu olup bu tür hibrit izolatların sığır mastitisindeki prevalansı literatür üzerinde az rapor edilmiştir. Örneğin, Chowdhury ve diğerleri (2025), çoklu antibiyotik dirençli ve shiga toksin üreten hibrit suşların sublinik mastitisli sütlerde artış gösterdiğini bildirmektedir. Bu hibrit patotip tablosu, patojenin hem meme dokusundaki kolonizasyon kapasitesini artırmakta ve konakçı immun sisteminden kaçış mekanizmalarını güçlendirme potansiyel açısından önemli bir nokta olarak ön plana çıkmaktadır.

Sığır sütü mikrobiyomunda filum düzeyinde yapılan analiz, sağlıklı sütlerin karakteristik filum bileşimini ortaya koymaktadır. Bu çalışmada kontrol grubu *Pseudomonadota* (eski adıyla *Proteobacteria*) ve *Bacillota* (eski adıyla *Firmicutes*) filumları tarafından baskınlaştırılmıştır. *Pseudomonadota* filumu %42,86 oranında tespit edilmiş olup, *Bacillota* filumu %41,65 oranında bulunmakta, bu iki filumun yaklaşık eşit oranlarda bulunması bölgedeki sütün mikrobiyal dengesini göstermektedir. Bu bulgular, literatürde rapor edilen sağlıklı sığır sütü mikrobiyomu verilerine kısmen uyumludur. Cremonesi ve diğerleri (2018), sağlıklı sütlerde *Bacillota* filumunun %22,9 oranında bulunduğunu rapor etmiştir. Guo ve diğerleri (2024) ise sağlıklı sütlerde *Pseudomonadota* ve *Bacillota* filumlarının baskın olduğunu, ancak oranlarının çalışmadan çalışmaya değiştiğini belirtmiştir. Mevcut çalışmada tespit edilen *Bacillota* oranı (%41,65), Cremonesi ve diğerleri (2018)'nin bulgularından daha yüksektir. *Bacteroidota* filumu bu çalışmada %11,58 oranında tespit edilmiş olup, diğer filumlar (*Campylobacterota* %1,54, *Mycoplasmata* %0,69, *Actinomycetota* %0,52 vb.) minimal düzeylerde bulunmaktadır. Bu filum profili, sütün doğal mikrobiyal savunma mekanizmalarından biri olarak belirtilen mikrobiyal dengeyi yansıtmaktadır. Cremonesi ve diğerleri (2018) ve Falentin ve diğerleri (2016), sağlıklı sütlerde *Pseudomonadota*, *Bacillota*, *Actinobacteria* ve *Bacteroidota* filumlarının baskın olduğunu, ancak oranlarının coğrafya ve işletme yönetimine bağlı olarak değiştiğini belirtmişlerdir.

Sağlıklı süt mikrobiyomunun bileşimi, yapılan çalışmalara göre önemli ölçüde değişkenlik göstermektedir. Porcellato ve diğerleri (2020) sağlıklı inek sütünde *Corynebacteriaceae* ailesinin %34,2 oranında baskın olduğunu ve *Staphylococcaceae* ailesinin %18,5 oranında bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu bulgular, geleneksel olarak sağlıklı süt mikrobiyomunun *Corynebacterium* ve *Staphylococcus* türleri tarafından baskın olduğu görüşünü desteklemektedir. Ancak, bu çalışmada elde edilen bulgular, sağlıklı süt örneklerinin (kontrol grubu) mikrobiyom bileşiminin bu geleneksel görüşten önemli ölçüde farklı olduğunu göstermektedir. Kontrol grubu örneklerinde, *Leuconostoc* %22,88 oranında, *Pseudomonas*

%18,69 oranında ve *Acinetobacter* %16,59 oranında tespit edilmiş olup, bu üç genus toplam mikrobiyomun %58,17'ini oluşturmaktadır. *Corynebacterium* hiçbir kontrol grubu örneğinde tespit edilmezken; *Staphylococcus* türleri ise kontrol grubu örneklerinde ortalama % 0,83 oranında bulunmuştur.

Li ve diğerleri (2018) Çin'de sağlıklı sığır sütlerinde yaptıkları çalışmada sütün çekirdek mikrobiyotasını *Pseudomonas* (%19,6), *Bacillus* (%13,8), *Lactococcus* (%11,7) *Acinetobacter* (%10,2)'ini oluşturduğunu raporlamışlardır. Bu çalışmadaki kontrol grubu ortalamaları ile kıyasladığımızda *Bacillus* ve *Lactococcus* tespit edilmezken, diğer genuslar oranlar değişiklik gösterse de benzer olarak bulunmuştur. Ayrıca süt mikrobiyom analizlerinde mevsimin önemini mikrobiyal çeşitlilik ile alakalı yaptıkları analizlerle ortaya koymuşlardır.

Luo ve diğerleri (2024) Çin'de sağlıklı sığır sütlerinde yaptıkları çalışmada *Leuconostoc*'u bu çalışmada olduğu gibi baskın genus olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca bu çalışmadaki diğer kontrol grup ortalamasında en yüksek 2 genus olan *Pseudomonas* ve *Acinetobacter*'i yüksek oranda her mevsimde tespit ettiklerini raporlamışlardır. Yap ve diğerleri (2024) ise sağlıklı sığır sütlerinde yaptıkları çalışmada bu çalışma ile paralellik göstererek *Leuconostoc*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Lactococcus* genuslarını tüm mevsimlerde aldıkları örneklerde anlamlı olarak tespit ederek çekirdek mikrobiyotayı oluşturduğunu raporlamışlardır.

Lima ve diğerleri (2018)'nin sağlıklı sütlerde yaptıkları mikrobiyom analizleri sonucunda bu çalışmadaki süt DNA ekstraksiyonunda benzer süt fraksiyonlarını kullanarak yaptıkları çalışmada en yüksek tespit ettikleri familyalar; *Ruminococcaceae* (%22,4), *Staphylococcaceae* (%18,3), *Bacillaceae* (%11,3), *Enterobacteriaceae* (%6,4), *Peptostreptococcaceae* (%6,3), *Pseudomonadaceae* (%5,3), *Moraxellaceae* (%4,6) olmuştur. Yüksek tespit edilen familya oranlarında bu çalışmadaki *Leuconostocaceae* yer almazken; ortak olarak bulunan *Pseudomonadaceae* ve *Moraxellaceae* familyalarının oranı bu çalışmada sırasıyla %18,70 ve 18,18 bulunmuş önemli farklılık göstermiştir. *Enterobacteriaceae* oran ortalaması ise bu çalışmada %2,59 ile daha düşük bir oranda belirlenmiştir.

Ganda ve diğerleri (2017) deneysel çalışma öncesi laktasyon dönemindeki 20 Holstein inekten alınan süt örneklerinde mikrobiyom analizi gerçekleştirmişlerdir. Ortalama olarak en yüksek tespit ettikleri familyalar; *Ruminococcaceae* (%16,8), *Lachnospiraceae* (%7,0), *Aerococcaceae* (%6,8), *Enterobacteriaceae* (%6,3), *Planococcaceae* (%5,7), *Bacteroidaceae* (%5,4), *Corynebacteriaceae* (%5,1), *Clostridiaceae* (%4,2), *Bacillaceae* (%3,5) ve *Staphylococcaceae* (%2,8) olmuştur. Vasquez ve diğerleri (2019) ise sağlıklı ineklerden

aldıkları kültür negatif süt örneklerinde en yüksek oranda tespit ettikleri 5 familya; *Ruminococcaceae* (%31,4), *Streptococcaceae* (%11,7), *Lachnospiraceae* (%6,9), *Corynebacteriaceae* (%6,6), *Bacteroidaceae* (%3,6) olmuştur. Bu çalışmada kontrol grubu sütlerinde yüksek oranda tespit edilen familyalar; *Leuconostocaceae* %22,88, *Pseudomonadaceae* %18,69, *Moraxellaceae* %18,17, *Weeksellaceae* %4,73, *Bacillaceae* %3,57, *Enterobacteriaceae* %2,47 olarak tespit edilmiştir. Familya bazında iki çalışma ile kıyaslandığında ortak familyalar olsa da (*Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae* gibi) bu çalışmadaki kontrol grubu sonuçlarından oldukça farklı bir süt mikrobiyom profillerinin tespit edildiği görülmektedir.

Tarrah ve diğerleri (2022), sağlıklı sütlerde *Lactococcus*, *Lactobacillus* ve *Leuconostoc* gibi laktik asit bakterilerinin bol miktarda bulunduğunu bildirmişlerdir.

Sokolov diğerleri (2021) Rusya'da gerçekleştirdikleri çalışmada sağlıklı hayvanlardan alınan süt örneklerinde en yüksek buldukları genus ortalama %44 ile *Aerococcus* olarak raporlamışlardır. Bu çalışmada sağlıklı sütlerde ortalama olarak tespit edilen *Aerococcus* genusu %0,23 olarak belirlenmiştir.

Steinberg ve diğerleri (2022) Brezilya'da yaptıkları çalışmada sağlıklı sütlerde yapılan mikrobiyom analizleri sonucu tespit edilen en baskın genusları *Staphylococcus* (%29,8), *Acinetobacter* (%22,5), ve *Pseudomonas* (%14,2) olarak raporlamışlardır. Bu çalışmadaki kontrol grubu sütleriyle *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* sonuçları yakın olsa da *Staphylococcus* hiçbir kontrol grubu örneğinde baskın genus olarak tespit edilmedi.

Rainard ve diğerleri (2022), sağlıklı inek sütünde düşük somatik hücre sayısı ve bağışıklık fonksiyonunun önemli olduğunu bildirmişlerdir. Sağlıklı sütün bağışıklık fonksiyonu, mikrobiyom bileşimi ile yakından ilişkili olup laktik asit bakterilerinin sütün doğal bakteriyel çeşitliliğini kontrol altında tutarak patojenik bakterilerin büyümesini engellediğini belirtmişlerdir. Pellegrino ve diğerleri (2019), laktik asit bakterilerinin mastitis enfeksiyonunun gelişimini önlemede potansiyel probiyotik suşlar olduğunu bildirmişlerdir. Yaptıkları deneysel çalışmalarda sağlıklı sütlerden izole ettikleri bir *Lactococcus* ve bir *Lactobacillus* izolatlarını meme içi uygulamalar ile mastitis enfeksiyonlarını önlediklerini raporlamışlardır. Laktik asit bakterilerinin ürettikleri laktik asit, ko-agregasyon yetenekleri ve antimikrobiyal aktivite gibi özellikleri sayesinde sütün mikrobiyal dengesinin kontrol altında olduğunu çalışma sonuçları ile vurgulamışlardır. Paiva ve diğerleri (2024) ise organik sütlerde *Lactococcus* genusunun %36 oranında baskın olduğunu ve çoğu süt örneğinde dominant genus olduğunu bildirmişlerdir.

Ayrıca laktik asit bakterilerinin sütün pH'sını düşürerek, antimikrobiyal bileşikler üreterek ve patojenik bakterilerin büyümesini engelleyerek sütün mikrobiyal dengesi ve kalitesini kalitesini koruduğunu belirtmişlerdir.

Kontrol grubu sütlerinde Shannon indeks değeri ortalama 5,49 olarak tespit edilmiştir. Sağlıklı sütlerde yapılan mikrobiyom çalışmaları ile kıyaslandığında; Falentin ve diğerleri (2016) 5,18; Ganda ve diğerleri (2016) 5,32; Oikonomou ve diğerleri (2012) 5,41; Bonsaglia ve diğerleri (2017), 5,24; Salman ve diğerleri (2023), 5,67 olarak tespit edilmiş ve bu çalışmadaki sonuç ile birbirine yakın değerlerde olduğu görülmektedir. Farklı bir değer olarak Sokolov ve diğerleri (2021) yine sağlıklı sütlerde yaptıkları mikrobiyom çalışmasında Shannon indeks değerini 4,82 olarak tespit ederek bu çalışmaya göre bölgelerindeki süt örneklerindeki bakteriyel çeşitliliği daha düşük olarak tespit etmişlerdir. Bu fark, coğrafik koşullar, çiftlik yönetimi uygulamaları, beslenme ve mevsimsel faktörlerin sütün mikrobiyom çeşitliliğini etkileyebileceğini göstermektedir.

*E. coli* mastitis enfeksiyonlarında filum düzeyinde yapılan analiz, mastitis gruplarının sağlıklı sütlerden belirgin şekilde farklı filum bileşimine sahip olduğunu göstermektedir. Mastitis örneklerinde *Pseudomonadota* filumu baskınlığı gözlenmiş olup, bu filumun oranı %91,77 ile %98,58 arasında değişmektedir. Bu yüksek oranlar, *E. coli* mastitis enfeksiyonlarında *Pseudomonadota* filumuna ait *E. coli*'nin de bulunduğu *Enterobacteriaceae* ailesi ve diğer gram negatif patojenlerin baskınlığını göstermektedir (Dahlberg ve diğerleri, 2023).

Vasquez ve diğerleri, (2019) *Pseudomonadota* filumunun sağlıklı sütlerle göre yüzde olarak artışını %29,4 olarak tespit ederlerken; bu çalışmada en yüksek artış %56 ile grup 1 ve grup 2 ve grup 3'de en yüksek oranda, %49 ile grup 5'de en düşük oranda tespit edilerek arada büyük bir fark olduğu görülmektedir. Mastitis gruplarında *Bacillota* filumu ikinci sırada yer almakta olup, oranı %1,15 ile %6,74 arasında değişmektedir. Bu filumun oranı, kontrol grubundaki %41,65 oranına kıyasla önemli ölçüde düşük olarak tespit edilmiştir. En yüksek düşüş grup 1 ve grup 2'de %40 ile belirlenirken; Vasquez ve diğerleri, (2019) sağlıklı sütlerde yüzde değer olarak bu çalışmaya yakın bir değer bulmuşlar fakat düşüş miktarını %20 olarak tespit etmişlerdir. *Bacillota* filumundaki düşme seviyesi bu çalışmada Vasquez ve diğerleri, (2019)'nin verilerine göre 2 kat fazla olduğu görülmektedir. Çalışmada kontrol grubunda tespit edilen diğer filumlar mastitis gruplarının tamamında neredeyse tamamen ortadan kalkmıştır.

Maslennikova ve diğeri (2025) ve Szala ve diğeri (2026) Gram negatif mastitis enfeksiyonlarında *Bacillota* filumunun azalmasını, önemli bir veri olarak belirtmişlerdir.

Yang ve diğeri (2026) tarafından yapılan çalışmada, *E. coli* mastitis enfeksiyonunun sütün mikrobiyomunda *Pseudomonadota* filumunun baskın hale geldiği ve mastitis ile ilişkili patojenik *E. coli* enfeksiyonunun sütün mikrobiyom yapısını önemli ölçüde değiştirdiği belirtilmiştir. Mevcut çalışmamızda elde edilen *Pseudomonadota* yüksek oranları (%91,77-98,58), güncel çalışmalarda bildirilen *E. coli* mastitis ile ilişkili *Pseudomonadota* artışı ile uyumludur. Bu bulgular, *E. coli* enfeksiyonunun sütün mikrobiyom yapısında *Pseudomonadota* filumunun oranını belirgin şekilde artırdığını göstermektedir.

Ganda ve diğeri (2016), *E. coli* mastitis ile ilgili yaptıkları çalışmada bu çalışmadaki sonuçlara uyumlu olarak *Pseudomonata* filumunun ortalama yoğunluğu, sağlıklı süte kıyasla *E. coli*, *Klebsiella spp.* ve *Pseudomonas spp.* kaynaklı mastitisli sütlerde daha fazla olduğu görülmüştür. *Bacillota*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Tenericutes*, *Chlorobi*'nin ortalama yoğunlukları ve kalan tüm filumların kombinasyonunun sağlıklılarda *E. coli* kaynaklı mastitisli sütlere kıyasla daha çok olduğu tespit edilmiştir.

Lima ve diğeri (2018)'nin yaptıkları çalışma sonucunda üç farklı etken kaynaklı klinik mastitis vakalarında temel fark olarak *Enterobacteriaceae* familyasında yer alan *E. coli* ve *Klebsiella spp.* kaynaklı mastitis numunelerinde sekans sonucunda toplam tespit edilen familya sayıları sırasıyla 28 ve 30; *Streptococcus spp.* kaynaklı mastitis numunelerinde ise 64 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç *E. coli* kaynaklı mastitis vakalarında süt mikrobiyotasındaki bakteri familyalarındaki çeşitliliğin diğer bir önemli mastitis patojeni olan *Streptococcus* mastitis süt mikrobiyotasına göre yarı yarıya azaldığını göstermektedir. Bu çalışmada *E. coli* mastitis gruplarında ise grup 1 ve grup 2'de 9; grup 3'de 14; grup 5'de 11; grup 6'da 15; grup 4'de 8 familya tespit edildi. Yapılan çalışma ile kıyaslandığında bu çalışmalardaki *E. coli* mastitis süt mikrobiyom gruplarının tamamında çok daha az familyanın tespit edilmesi bakteriyel çeşitliliğin çok daha fazla oranda düştüğünü göstermektedir.

Ganda ve diğeri (2017) yaptıkları farklı gruplarda deneysel enfeksiyon ile yaptıkları *E. coli* mastitis çalışmasında infekte sütlerde *Enterobacteriaceae* oranını en yüksek olarak %77,9; Ganda ve diğeri (2016) yaptıkları başka bir çalışmada ise bu oranı enfeksiyon sırasında en yüksek ortalama %85-%90 olarak raporlamışlardır. Bulunan bu değer en yakın olarak bu çalışmadaki %81,91 ile grup 6'da tespit edilirken diğer gruplarda *Enterobacteriaceae* oranı %91 ve %97 aralığında belirlenmiştir. Farklı olarak Lima ve diğeri (2018) *E. coli* mastitis

çalışmasında infekte sütlerde bu çalışmadaki süt DNA ekstraksiyonunda benzer süt fraksiyonlarını kullanarak yaptıkları analizlerde *Enterobacteriaceae* oranını diğer süt fraksiyonlarına (tüm süt, pelet) kıyasla en yüksek olarak (ortalama %95) tespit etmişlerdir. Vasquez ve diğerleri (2019) *E. coli* mastitisli sığır sütlerinde sağlıklı sütlerle kıyasla *Enterobacteriaceae* familyasının oranında %29,4'lük artış tespit ederlerken, en yüksek düşüş tespit ettikleri familyalar %8,1 ile *Staphylococcaceae* ve %8,2 ile *Bacillaceae* olmuştur. Bu çalışmada ise sağlıklı sütlerle kıyasla *E. coli* mastitisli sütlerde 3 grupta yaklaşık 3 kat fazla bir artış tespit edilmiştir. Sağlıklı sütlerle kıyasla *Enterobacteriaceae* familyasında en yüksek artış %94-95 ile grup 1, grup 2 ve grup 3'de tespit edilmiştir. *Enterobacteriaceae* familyasında en düşük artış oranı ise %79 ile grup 6'da belirlenmiştir. Bu çalışmada en yüksek düşüş tespit edilen familyalar grup 6'da %12, diğer gruplarda %18 düşme oranı ile *Moraxellaceae*, ve tüm mastitis gruplarında %21-22 oranında düşüş ile *Leuconostocaceae* olmuştur.

Vasquez ve diğerleri (2019) *E. coli* mastitisli sığır sütlerinde yaptıkları süt mikrobiyom çalışmasında *Escherichia* genusunun sağlıklı sütlerle kıyasla 30,1 kat arttığını tespit ederlerken, bu çalışmada en yüksek olarak grup 3'de 38,8 kat artış tespit edilmiştir. Çalışmadaki en düşük artış ise 33 kat artış ile grup 6'da belirlenmiştir. Vasquez ve diğerleri (2019) sağlıklılara göre *Pseudomonas* genusunda mastitis gruplarında %6 oranında artış tespit ederlerken, bu çalışmada oldukça farklı olarak grup 5'de %16, grup 6'da %14 diğer tüm gruplarda %18 oranında bir düşüş tespit edilmiştir. Grup 1, grup 2, grup 3 ve grup 4'de ortalama *Pseudomonas* genus oranı %0,69'ya düşmüştür.

Jiang ve diğerleri (2023), *E. coli* mastitis sütünde Shannon indeks değerinin mastitis olmayan sütlerle kıyasla önemli ölçüde düşük olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada, *E. coli* mastitis grubunda Shannon indeks değeri ortalama 2,15 olarak tespit edilirken bu çalışmada grup 3'de 0,47 ve grup 1'de 0,50 gibi çok düşük değerler görülmüş en yüksek Shannon indeks değeri 1,25 ile grup 6'da tespit edilmiştir. Ganda ve diğerleri (2016) ise deneysel *E. coli* enfeksiyonu sonrası en düşük tespit ettikleri Shannon indeks değeri ortalamalarını 2 olarak raporlamışlardır. Bu çalışmadaki grup 6'daki 1,25 değeri bu çalışmaya yakın olup, diğer grupların değerlerinin oldukça düşük olduğu görülmektedir. Vasquez ve diğerleri (2019) ise *E. coli* mastitis sütlerinde Shannon indeks değerini ortalama 3,80 olarak tespit etmişlerdir.

*E. coli* mastitisli sığırlarda süt mikrobiyomu ile alakalı çalışmalarda Chao1 indeks değerleri ile ilgili sayısal veriler oldukça sınırlıdır. Jung ve diğerleri (2024) *E. coli* kaynaklı klinik mastitisli sığır sütlerinde alfa çeşitlilik analizlerinde Shannon indeks değerlerin anlamlı farklılıklar tespit edilirken, Chao1 indekslerinde önemli farklar tespit etmediklerini

raporlamışlardır. Ganda ve diğerleri (2016) *Klebsiella spp.* kaynaklı klinik mastitislerde kısa bir süre sonra Shannon indeks değerlerinde düşüşler görülmesine rağmen Chao1 indeksi üzerinde herhangi bir etki tespit etmediklerini raporlamışlardır. Khasapane ve diğerleri (2023) ise farklı etken kaynaklı subklinik mastitisli sütlerde Chao1 indeks değerlerinin sağlıklı sütlerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği ancak Shannon çeşitlilik indeksinin daha duyarlı bir ölçüt olduğunu belirtmişlerdir.

Diğer mastitis etkenlerinden kaynaklı süt mikrobiyomu çalışmaları incelendiğinde; Lima ve diğerleri (2018) yaptıkları çalışma sonucunda *Streptococcus spp.* kaynaklı mastitis örneklerinde ise filumların çoğunun *Bacillota* (%69,6) ve *Pseudomonata* (%30,1) oluştuğunu tespit etmişlerdir. *Streptococcus* türlerini içeren *Bacillota* filum değeri bu çalışmadaki ve diğer *E. coli* mastitis süt mikrobiyomu çalışmaları ile kıyaslandığında enfeksiyon etkeni genusun bulunduğu filumun oranının düşük olduğu görülmektedir. Ganda ve diğerleri (2016) *Pseudomonas* kaynaklı mastitis vakasında en yüksek değer olarak *Pseudomonaceae* familyasının oranını %44,3 olarak tespit etmiştir. Bu çalışmadaki ve diğer *E. coli* mastitis süt mikrobiyomu çalışmaları ile kıyaslandığında enfeksiyon etkeni genusun bulunduğu familyanın oranının düşük olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar, koliform, gram negatif bir bakteri tarafından oluşan meme bezi enfeksiyonunda sütteki disbiyozis tablosunun, gram pozitif bir bakteri (örneğin *Streptococcus spp.*) tarafından neden olunan enfeksiyondan farklı seyrettiğiyle açıklanabilir. Wellnitz ve Bruckmaier (2012) de sığırlarda yaptıkları meme dokusunda immunité ile alakalı çalışmada koliform kaynaklı mastitislerde bazı gram pozitif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlara kıyasla, meme bezinde daha şiddetli ve agresif bir enfeksiyona ve yüksek bakteriyel çoğalmaya yol açtığını belirtmiştir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada Aydın bölgesinde mastitisli süt örneklerinin %20'sinde *E. coli* tespit edilmesi *E. coli*'nin Aydın bölgesinde sığır mastitisinde önemli bir etken olduğunu göstermektedir. İzole edilen 23 *E. coli* suşunun %100'ünün ETEC genlerini ve %56,52'sinin shiga toksin genlerini taşıdığı belirlenmiş olup veteriner sağlık ve halk sağlığı açısından önemli bir sonuç elde edilmiştir. Hibrit patotiplerin yapılan benzer çalışmalara göre yüksek oranda tespiti daha patojenik potansiyele sahip suşların varlığını ortaya koymuştur.

Mikrobiyom analizleri sonucunda bölgedeki sağlıklı sığır sütlerinin mikrobiyomunun yapılan birçok çalışmadan farklı bir profilde tespit edilmiştir. Bu durum çalışmalarda da belirtilen süt mikrobiyomunun çevresel faktörler, iklim, sürü yetiştiriciliği gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebildiğini göstermektedir. *E. coli* kaynaklı mastitis sütlerindeki süt mikrobiyomunun belirgin disbiyozise bağlı olarak değişimi sütün mikrobiyal dengesinin net bir şekilde ortaya koymaktadır. Çalışmada *E. coli* kaynaklı mastitis sütlerindeki bazı patotip gruplarında farklılıklar gözlemlenmiştir. Süt mikrobiyomu konusunda farklı patotip kaynaklı *E. coli* mastitis infeksiyonları ile ilgili spesifik bir çalışma bulunmadığından elde edilen sonuçlar gelecek çalışmalar için önemli bir veri kaynağı oluşturmuştur.

Bu çalışmanın sonucunda dünyada majör mastitis etkenlerinden biri olarak tanımlanan *E. coli*'nin sığır mastitis vakalarındaki patotip bazlı süt mikrobiyomu çalışmalarının artmasının gerekliliği ile beraber süt mikrobiyomunu etkileyebilecek farklı virülens faktörlerinin tespitinin önemli olacağı öngörülmektedir. Aynı zamanda tüm genom dizilemenin ortaya konabilmesini sağlayan yeni nesil dizileme yöntemleri ile dünyada artan antibiyotik direnci de göz önünde bulundurulduğunda gelecekte sağlıklı süt mikrobiyomunun daha iyi irdelenerek mastitis vakalarında kontrolsüz antibiyotik kullanımının engellenmesinde önemli katkı sağlayabileceği sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Addis, M.F., Tanca, A., Uzzau, S., Oikonomou, G., Bicalho, R.C., Moroni, P. (2016). The bovine milk microbiota: insights and perspectives from-omics studies. *Molecular Biosystems*, 12(8), 2359-2372. <https://doi.org/10.1039/C6MB00217J>
- Ballas, P., Rückert, C., Wagener, K., Drillich, M., Kämpfer, P., Busse, H.J., Ehling-Schulz, M. (2020). *Corynebacterium endometrii* sp. nov., isolated from the uterus of a cow with endometritis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(1), 146-152. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003728>
- Bechtold, V., Petzl, W., Huber-Schlenstedt, R., Sorge, U.S. (2024). Distribution of bovine mastitis pathogens in quarter milk samples from Bavaria, Southern Germany, between 2014 and 2023—A retrospective study. *Animals*, 14(17), 2504. <https://doi.org/10.3390/ani14172504>
- Belay, N., Mohammed, N., Seyoum, W. (2022). Bovine mastitis: prevalence, risk factors, and bacterial pathogens isolated in lactating cows in Gamo zone, southern Ethiopia. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 9-19. <https://doi.org/10.2147/VMRR.S344024>
- Blum, S.E., Heller, E.D., Sela, S., Elad, D., Edery, N., Leitner, G. (2015). Genomic and phenomic study of mammary pathogenic *Escherichia coli*. *PLoS One*, 10(9), e0136387. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136387>
- Blum, S.E., Goldstone, R.J., Connolly, J.P., Répérant-Ferter, M., Germon, P., Inglis, N.F., Smith, D.G. (2018). Postgenomics characterization of an essential genetic determinant of mammary pathogenic *Escherichia coli*. *MBio*, 9(2), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/mbio.00423-18>
- Boix-Amorós, A., Collado, M.C., Mira, A. (2016). Relationship between milk microbiota, bacterial load, macronutrients, and human cells during lactation. *Frontiers in Microbiology*, 7, 492. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00492>
- Bomar, L., Brugger, S.D., Yost, B.H., Davies, S.S. (2016). *Corynebacterium accolens* Releases Antipneumococcal Free Fatty Acids from Human Nostril and Skin Surface Triacylglycerols. *Mbio*, 7, e01725-e11715. <https://doi.org/10.1128/mBio.01725-15>

- Bonsaglia, E.C., Gomes, M.S., Canisso, I.F., Zhou, Z., Lima, S.F., Rall, V.L., Lima, F.S. (2017). Milk microbiome and bacterial load following dry cow therapy without antibiotics in dairy cows with healthy mammary gland. *Scientific Reports*, 7(1), 8067. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08790-5>
- Braem, G., De Vliegher, S., Verbist, B., Heyndrickx, M., Leroy, F., De Vuyst, L. (2012). Culture-independent exploration of the teat apex microbiota of dairy cows reveals a wide bacterial species diversity. *Veterinary Microbiology*, 157(3-4), 383-390. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.12.031>
- Burvenich, C., Van Merris, V., Mehrzad, J., Diez-Fraile, A., Duchateau, L. (2003). Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Veterinary Research*, 34(5), 521-564. <https://doi.org/10.1051/vetres:2003023>
- Callewaert, C., Kerckhof, F.M., Granitsiotis, M.S., Van Gele, M., Van de Wiele, T., Boon, N. (2013). Characterization of *Staphylococcus* and *Corynebacterium* clusters in the human axillary region. *PLoS One*, 8(8), e70538. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070538>
- Campos, F.C., Castilho, I.G., Rossi, B.F., Bonsaglia, É.C., Dantas, S.T., Dias, R.C., Rall, V.L. (2022). Genetic and antimicrobial resistance profiles of mammary pathogenic *E. coli* (MPEC) isolates from bovine clinical mastitis. *Pathogens*, 11(12), 1435. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121435>
- Catozzi, C., Sanchez Bonastre, A., Francino, O., Lecchi, C., De Carlo, E., Vecchio, D., Cecilian, F. (2017). The microbiota of water buffalo milk during mastitis. *PLoS One*, 12(9), e0184710. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184710>
- Chandra, M., Cheng, P., Rondeau, G., Porwollik, S., McClelland, M. (2013). A single step multiplex PCR for identification of six diarrheagenic *E. coli* pathotypes and *Salmonella*. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(4), 210-216. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.013>
- Cheng, W.N., Han, S.G. (2020). Bovine mastitis: Risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments—A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 33(11), 1699. <https://doi.org/10.5713/ajas.20.0156>

- Chowdhury, T., Roy, M.C., Hossain, F.M.A. (2025). Prevalence and zoonotic risk of multidrug-resistant *Escherichia coli* in bovine subclinical mastitis milk: Insights into the virulence and antimicrobial resistance. *Food Science & Nutrition*, 13(1), e4761. <https://doi.org/10.1002/fsn3.4761>
- Cobirka, M., Tancin, V., Slama, P. (2020). Epidemiology and classification of mastitis. *Animals*, 10(12), 2212. <https://doi.org/10.3390/ani10122212>
- Cremonesi, P., Ceccarani, C., Curone, G., Severgnini, M., Pollera, C., Bronzo, V., Castiglioni, B. (2018). Milk microbiome diversity and bacterial group prevalence in a comparison between healthy Holstein Friesian and Rendena cows. *PLoS One*, 13(10), e0205054. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205054>
- Dahesa, G.D., Oche, T.W., Kebede, I.A. (2025). Prevalence of mastitis and isolation of *Escherichia coli* from mastitic cows in Maya City, Eastern Hararghe Zone, Oromia, Ethiopia. *Discover Bacteria*, 2(1), 12. <https://doi.org/10.1007/s44351-025-00022-w>
- Dahlberg, J., Johnzon, C.F., Sun, L., Pejler, G., Östensson, K., Dicksved, J. (2023). Absence of changes in the milk microbiota during *Escherichia coli* endotoxin induced experimental bovine mastitis. *Veterinary Research*, 54(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s13567-023-01179-5>
- Dalgleish, D.G., Corredig, M. (2012). The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 449-467. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101214>
- Dashti, A.A., Jadaon, M.M., Abdulsamad, A.M., Dashti, H.M. (2009). Heat treatment of bacteria: a simple method of DNA extraction for molecular techniques. *The Journal of the Kuwait Medical Association*, 41(2), 117-122.
- Dego, O.K., Oliver, S.P., Almeida, R.A. (2012). Host–pathogen gene expression profiles during infection of primary bovine mammary epithelial cells with *Escherichia coli* strains associated with acute or persistent bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 155(2-4), 291-297. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.08.016>
- Derakhshani, H., Fehr, K.B., Sepehri, S., Francoz, D., De Buck, J., Barkema, H.W., Khafipour, E. (2018a). Invited review: Microbiota of the bovine udder: Contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. *Journal of Dairy Science*, 101(12), 10605-10625. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14860>

- Derakhshani, H., Plaizier, J.C., De Buck, J., Barkema, H.W., Khafipour, E. (2018b). Association of bovine major histocompatibility complex (BoLA) gene polymorphism with colostrum and milk microbiota of dairy cows during the first week of lactation. *Microbiome*, 6(1), 203. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0586-1>
- Derakhshani, H., Plaizier, J.C., De Buck, J., Barkema, H.W., Khafipour, E. (2018c). Composition of the teat canal and intramammary microbiota of dairy cows subjected to antimicrobial dry cow therapy and internal teat sealant. *Journal of Dairy Science*, 101(11), 10191-10205. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14858>
- Dimitriu, P.A., Iker, B., Malik, K., Leung, H., Mohn, W.W., Hillebrand, G.G. (2019). New insights into the intrinsic and extrinsic factors that shape the human skin microbiome. *MBio*, 10(4), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/mbio.00839-19>
- Doyle, C.J., Gleeson, D., O'Toole, P.W., Cotter, P.D. (2017). Impacts of seasonal housing and teat preparation on raw milk microbiota: a high-throughput sequencing study. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(2), e02694-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02694-16>
- El-Khabaz, K.A., Elshrief, L.M., Elmeligy, E. (2022). Genetic assessment of Shiga toxin and antibiotic resistance of *E. coli* isolated from milk of cows infected with sub-clinical mastitis. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 12(3), 278-282.
- Falentin, H., Rault, L., Nicolas, A., Bouchard, D.S., Lassalas, J., Lambertson, P., Even, S. (2016). Bovine teat microbiome analysis revealed reduced alpha diversity and significant changes in taxonomic profiles in quarters with a history of mastitis. *Frontiers in Microbiology*, 7, 480. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00480>
- Fitzstevens, J.L., Smith, K.C., Hagadorn, J. I., Caimano, M.J., Matson, A.P., Brownell, E.A. (2017). Systematic review of the human milk microbiota. *Nutrition in Clinical Practice*, 32(3), 354-364. <https://doi.org/10.1177/0884533616670150>
- Frétin, M., Martin, B., Rifa, E., Isabelle, V.M., Pomiès, D., Ferlay, A., Delbès, C. (2018). Bacterial community assembly from cow teat skin to ripened cheeses is influenced by grazing systems. *Scientific Reports*, 8(1), 200. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18447-y>

- Ganda, E.K., Bisinotto, R.S., Lima, S.F., Kronauer, K., Decter, D.H., Oikonomou, G., Bicalho, R.C. (2016). Longitudinal metagenomic profiling of bovine milk to assess the impact of intramammary treatment using a third-generation cephalosporin. *Scientific Reports*, 6(1), 37565. <https://doi.org/10.1038/srep37565>
- Ganda, E.K., Gaeta, N., Sipka, A., Pomeroy, B., Oikonomou, G., Schukken, Y.H., Bicalho, R.C. (2017). Normal milk microbiome is reestablished following experimental infection with *Escherichia coli* independent of intramammary antibiotic treatment with a third-generation cephalosporin in bovines. *Microbiome*, 5(1), 74. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0291-5>
- Gao, A., Mutharia, L., Raymond, M., Odumeru, J. (2007). Improved template DNA preparation procedure for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 69(2), 417-420. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.10.019>
- Germon, P., Foucras, G., Smith, D.G., Rainard, P. (2025). INVITED REVIEW: Mastitis *Escherichia coli* strains: Mastitis-Associated or Mammo-Pathogenic?. *Journal of Dairy Science*. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-25558>
- Gonal, B.N., Dalbanjan, N.P., Kadapure, A.J., Kumar, S.P., Arakera, S.B. (2025). Epidemiology, antimicrobial resistance, economic burden, and management approaches for staphylococcus aureus-associated bovine mastitis: a systematic review. *Animals and Zoonoses*. <https://doi.org/10.1016/j.azn.2025.12.001>
- Goulart, D.B., Mellata, M. (2022). *Escherichia coli* Mastitis in Dairy Cattle: Etiology, Diagnosis, and Treatment Challenges. *Frontiers in Microbiology*, 13, 928346. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.928346>
- Guner, B., Ozturk, B., Erkan, A.A., Erturk, M., Uçan, N., Keskin, A. (2024). Distribution of bacterial pathogens and antimicrobial resistance in cows with clinical mastitis in a dairy farm, Türkiye. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 75(3), 7675-7684. <https://doi.org/10.12681/jhvms.33819>
- Guo, W., Bai, T., Zhai, Q., Cui, H., Pan, Y., Shen, N., Shen, B. (2024). Unveiling the Diurnal Patterns of Microbiome and Metabolome in Breast Milk. *Lancet*. <https://dx.doi.org/10.2139/ssrn.5040682>

- Hardy, B.L., Dickey, S.W., Plaut, R.D., Riggins, D.P., Stibitz, S., Otto, M., Merrell, D.S. (2019). *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* exploits *Staphylococcus aureus* virulence components in a novel polymicrobial defense strategy. *MBio*, 10(1), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/mbio.02491-18>
- Haxhijaj, K., Wishart, D.S., Ametaj, B.N. (2022). Mastitis: What it is, current diagnostics, and the potential of metabolomics to identify new predictive biomarkers. *Dairy*, 3(4), 722-746. <https://doi.org/10.3390/dairy3040050>
- Hogan, J.S., Gonzalez, R.N., Harmon, R.J., Nickerson, S.C., Oliver, S.P., Pankey, J.W., Smith, K.L. (1999). Laboratory handbook on bovine mastitis. *National Mastitis Council, Madison, WI*, 78(7), 485-488.
- Hoque, M.N., Istiaq, A., Clement, R.A., Sultana, M., Crandall, K.A., Siddiki, A.Z., Hossain, M.A. (2019). Association of milk microbiome in bovine clinical mastitis and their functional implications in cows in Bangladesh. *bioRxiv*, 591982. <https://doi.org/10.1101/591982>
- Hunt, K.M., Foster, J.A., Forney, L.J., Schütte, U.M., Beck, D.L., Abdo, Z., McGuire, M.A. (2011). Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS One*, 6(6), e21313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021313>
- Ismail, Z.B., Abutarbush, S.M. (2020). Molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from bovine mastitis. *Veterinary World*, 13(8), 1588-1593. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1588-1593>
- Jeršek, A.K. (2014). Evaluation of different methods for DNA extraction from milk. *Journal of Food and Nutrition Research*, 53, 97-104.
- Jiang, C., Hou, X., Gao, X., Liu, P., Guo, X., Hu, G., Liu, P. (2023). The 16S rDNA high-throughput sequencing correlation analysis of milk and gut microbial communities in mastitis Holstein cows. *BMC Microbiology*, 23(1), 180. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02925-7>
- Jiménez, E., de Andrés, J., Manrique, M., Pareja-Tobes, P., Tobes, R., Martínez-Blanch, J.F., Rodríguez, J.M. (2015). Metagenomic analysis of milk of healthy and mastitis-suffering women. *Journal of Human Lactation*, 31(3), 406-415. <https://doi.org/10.1177/0890334415585078>

- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C., Chassard, C. (2013). Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *British Journal of Nutrition*, 110(7), 1253-1262. <https://doi.org/10.1017/S0007114513000597>
- Jung, D., Park, S., Kurban, D., Dufour, S., Ronholm, J. (2024). The occurrence of *Aerococcus urinaeequi* and non-aureus staphylococci in raw milk negatively correlates with *Escherichia coli* clinical mastitis. *Msystems*, 9(10), e00362-24. <https://doi.org/10.1128/msystems.00362-24>
- Jung, D., Park, S., Ruffini, J., Dussault, F., Dufour, S., Ronholm, J. (2025). Comparative genomic analysis of *Escherichia coli* isolated from cases of bovine clinical mastitis and the dairy farm environment. *Microbial Genomics*, 11(6), 001436. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.001436>
- Kaczorowski, Ł., Powierska-Czarny, J., Wolko, Ł., Piotrowska-Cyplik, A., Cyplik, P., Czarny, J. (2022). The influence of bacteria causing subclinical mastitis on the structure of the cow's milk microbiome. *Molecules*, 27(6), 1829. <https://doi.org/10.3390/molecules27061829>
- Khasapane, N.G., Khumalo, Z.T.H., Kwenda, S., Nkhebenyane, S.J., Thekiso, O. (2023). Characterisation of milk microbiota from subclinical mastitis and apparently healthy dairy cattle in Free State Province, South Africa. *Veterinary Sciences*, 10(10), 616. <https://doi.org/10.3390/vetsci10100616>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1), e1-e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Kumar, H., Du Toit, E., Kulkarni, A., Aakko, J., Linderborg, K. M., Zhang, Y., Salminen, S. (2016). Distinct patterns in human milk microbiota and fatty acid profiles across specific geographic locations. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1619. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01619>
- Leimbach, A., Poehlein, A., Vollmers, J., Görlich, D., Daniel, R., Dobrindt, U. (2017). No evidence for a bovine mastitis *Escherichia coli* pathotype. *BMC Genomics*, 18(1), 359. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3739-x>

- Li, Z., Wright, A.D.G., Yang, Y., Si, H., Li, G. (2017). Unique bacteria community composition and co-occurrence in the milk of different ruminants. *Scientific Reports*, 7(1), 40950. <https://doi.org/10.1038/srep40950>
- Li, N., Wang, Y., You, C., Ren, J., Chen, W., Zheng, H., Liu, Z. (2018). Variation in raw milk microbiota throughout 12 months and the impact of weather conditions. *Scientific Reports*, 8(1), 2371. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20862-8>
- Lima, S.F., Teixeira, A.G., Lima, F.S., Ganda, E.K., Higgins, C.H., Oikonomou, G., Bicalho, R.C. (2017). The bovine colostrum microbiome and its association with clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 100(4), 3031-3042. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11604>
- Lima, S.F., Bicalho, M.L.D.S., Bicalho, R.C. (2018). Evaluation of milk sample fractions for characterization of milk microbiota from healthy and clinical mastitis cows. *PLoS One*, 13(3), e0193671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193671>
- Lira, W.M., Macedo, C., Marin, J.M. (2004). The incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle with mastitis in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 97(4), 861-866. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02384.x>
- Litt, P.K., Omar, A.N., Gartley, S., Kelly, A., Ramos, T., Nyarko, E., Kniel, K.E. (2025). Prevalence of Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* in Bovine Manure in the Mid-Atlantic Region of the United States. *Microorganisms*, 13(2), 419. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13020419>
- Liu, H., Meng, L., Dong, L., Zhang, Y., Wang, J., Zheng, N. (2021). Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization of *Escherichia coli* isolated from raw milk in dairy herds in Northern China. *Frontiers in Microbiology*, 12, 730656. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.730656>
- Lopes, T.S., Fussieger, C., Rizzo, F.A., Silveira, S., Lunge, V.R., Streck, A.F. (2022). Species identification and antimicrobial susceptibility profile of bacteria associated with cow mastitis in southern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 42, e06958. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6958>
- Luo, B., Dong, F., Liu, Y., Du, J., Sun, H., Ni, Y., Zhang, Y. (2024). Insights into the microbiota of raw milk from seven breeds animals distributing in Xinjiang China. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1382286. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1382286>

- Maslennikova, I.L., Nechaeva, Y.I., Ilina, L.A., Laptev, G.Y., Ponomareva, E.S., Zhdanova, I.N., Kuznetsova, M.V. (2025). A decline in taxonomic diversity of milk microbiome is linked to clinical mastitis and physiological states of cow. *Gene Reports*, 39, 102169. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2025.102169>
- McInnis, E.A., Kalanetra, K.M., Mills, D.A., Maga, E.A. (2015). Analysis of raw goat milk microbiota: Impact of stage of lactation and lysozyme on microbial diversity. *Food Microbiology*, 46, 121-131. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.021>
- Metzger, S.A., Hernandez, L.L., Suen, G., Ruegg, P.L. (2018). Understanding the milk microbiota. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 34(3), 427-438. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2018.06.003>
- Momtaz, H., Safarpour Dehkordi, F., Taktaz, T., Rezvani, A., Yarali, S. (2012). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from bovine mastitic milk: Serogroups, virulence factors, and antibiotic resistance properties. *The Scientific World Journal*, 2012(1), 618709. <https://doi.org/10.1100/2012/618709>
- Murinda, S.E., Ibekwe, A.M., Rodriguez, N.G., Quiroz, K.L., Mujica, A.P., Osmon, K. (2019). Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* in mastitis: An international perspective. *Foodborne Pathogens and Disease*, 16(4), 229-243. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2491>
- Murphy, K., Curley, D., O'Callaghan, T.F., O'Shea, C.A., Dempsey, E.M., O'Toole, P.W., Stanton, C. (2017). The composition of human milk and infant faecal microbiota over the first three months of life: a pilot study. *Scientific Reports*, 7(1), 40597. <https://doi.org/10.1038/srep40597>
- Müller, D., Greune, L., Heusipp, G., Karch, H., Fruth, A., Tschäpe, H., Schmidt, M.A. (2007). Identification of unconventional intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(10), 3380-3390. <https://doi.org/10.1128/AEM.02855-06>
- My, T.T., Thien, L.V., Manh, V.D., My, B.T.P., Lan, D.T.M., Binh, D.X., Duc, V.M. (2023 ). Antimicrobial resistance and molecular characterization of *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis samples in Nghe An province, Vietnam. *Veterinary World*, 16(4), 743-751. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2023.743-751>

- Nalband, S.M., Kolhe, R.P., Deshpande, P.D., Jadhav, S.N., Gandhale, D.G., Muglikar, D.M., Dhandore, C.V. (2020). Characterization of *Escherichia coli* isolated from bovine subclinical mastitis for virulence genes, phylogenetic groups and ESBL production. *Indian Journal of Animal Research*, 54(10), 1265-1271. <https://doi.org/10.18805/ijar.B-3883>
- National Mastitis Council [NMC]. (2016). Procedures for collecting milk samples. *National Mastitis Council*. Erişim adresi: <https://www.nmconline.org/wp-content/uploads/2016/09/Procedures-for-Collecting-Milk-Samples.pdf>
- Nüesch-Inderbilen, M., Käppeli, N., Morach, M., Eicher, C., Corti, S., Stephan, R. (2019). Molecular types, virulence profiles and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* causing bovine mastitis. *Veterinary Record Open*, 6(1), e000369. <https://doi.org/10.1136/vetreco-2019-000369>
- O'Donnell, M.M., Harris, H.M., Ross, R.P., O'Toole, P.W. (2017). Core fecal microbiota of domesticated herbivorous ruminant, hindgut fermenters, and monogastric animals. *Microbiology Open*, 6(5), e00509. <https://doi.org/10.1002/mbo3.509>
- Oikonomou, G., Machado, V.S., Santisteban, C., Schukken, Y.H., Bicalho, R.C. (2012). Microbial diversity of bovine mastitic milk as described by pyrosequencing of metagenomic 16s rDNA. *PloS One*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047671>
- Oikonomou, G., Bicalho, M.L., Meira, E., Rossi, R.E., Foditsch, C., Machado, V.S., Bicalho, R.C. (2014). Microbiota of cow's milk; distinguishing healthy, sub-clinically and clinically diseased quarters. *PloS One*, 9(1), e85904. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085904>
- Oikonomou, G., Addis, M.F., Chassard, C., Nader-Macias, M.E.F., Grant, I., Delbès, C., Even, S. (2020). Milk microbiota: what are we exactly talking about?. *Frontiers in Microbiology*, 11, 60. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00060>
- Olson, M.A., Siebach, T.W., Griffiths, J.S., Wilson, E., Erickson, D.L. (2018). Genome-wide identification of fitness factors in mastitis-associated *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(2), e02190-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02190-17>

- Orsi, H., Guimarães, F.F., Leite, D.S., Guerra, S.T., Joaquim, S.F., Pantoja, J.C., Rall, V.L. (2023). Characterization of mammary pathogenic *Escherichia coli* reveals the diversity of *Escherichia coli* isolates associated with bovine clinical mastitis in Brazil. *Journal of Dairy Science*, 106(2), 1403-1413. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22126>
- Osman, K.M., Mustafa, A.M., Aly, M.A., Abdelhamed, G.S. (2012). Serotypes, virulence genes, and intimin types of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from mastitic milk relevant to human health in Egypt. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(4), 297-305. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0257>
- Pärnänen, K., Karkman, A., Hultman, J., Lyra, C., Bengtsson-Palme, J., Larsson, D.J., Virta, M. (2018). Maternal gut and breast milk microbiota affect infant gut antibiotic resistome and mobile genetic elements. *Nature Communications*, 9(1), 3891. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06393-w>
- Pellegrino, M.S., Frola, I.D., Natanael, B., Gobelli, D., Bogni, C., Nader-Macías, M.E.F. (2019). In vitro characterization of lactic acid bacteria isolated from bovine milk as potential probiotic strains to prevent bovine mastitis. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(2), 546-556. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9383-6>
- Pereira, E.D.S., Crippa, B.L., Morasi, R.M., Almeida, J.M.D., Gebara, C., Langoni, H., Silva, N.C.C. (2024). Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* as the cause of mastitis in cows from Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 44, e07430. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-7430>
- Petzl, W., Günther, J., Pfister, T., Sauter-Louis, C., Goetze, L., von Aulock, S., Zerbe, H. (2012). Lipopolysaccharide pretreatment of the udder protects against experimental *Escherichia coli* mastitis. *Innate Immunity*, 18(3), 467-477. <https://doi.org/10.1177/1753425911422407>
- Porcellato, D., Meisal, R., Bombelli, A., Narvhus, J.A. (2020). A core microbiota dominates a rich microbial diversity in the bovine udder and may indicate presence of dysbiosis. *Scientific Reports*, 10(1), 1-14. doi: 10.1038/s41598-020-77054-6
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T.P., Paul Ross, R., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D. (2012). A comparison of methods used to extract bacterial DNA from raw milk and raw milk cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 113(1), 96-105. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05294.x>

- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 664-698. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>
- Rahmani, H.K., Tabar, G.H., Badouei, M.A., Khoramian, B. (2021). Towards discrimination of mammary pathogenic *Escherichia coli* (MPEC) in cattle based on possession of different iron acquisition systems. *BioRxiv*, 2021-08. <https://doi.org/10.18502/ijm.v12i4.3930>
- Rainard, P., Gilbert, F.B., Germon, P. (2022). Immune defenses of the mammary gland epithelium of dairy ruminants. *Frontiers in Immunology*, 13, 1031785. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1031785>
- Rangel, P., Marin, J.M. (2009). Analysis of *Escherichia coli* isolated from bovine mastitic milk. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29(5), 363-368. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2009000500001>
- Richards, V.P., Lefébure, T., Pavinski Bitar, P.D., Dogan, B., Simpson, K.W., Schukken, Y. H., Stanhope, M.J. (2015). Genome based phylogeny and comparative genomic analysis of intra-mammary pathogenic *Escherichia coli*. *PloS One*, 10(3), e0119799. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119799>
- Salman, M.M., Nawaz, M., Yaqub, T., Mushtaq, M.H. (2023). Investigation of milk microbiota of healthy and mastitic Sahiwal cattle. *BMC Microbiology*, 23(1), 304. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-03051-0>
- Schwenker, J.A., Friedrichsen, M., Waschina, S., Bang, C., Franke, A., Mayer, R., Hölzel, C. S. (2022). Bovine milk microbiota: Evaluation of different DNA extraction protocols for challenging samples. *MicrobiologyOpen*, 11(2), e1275.
- Shpigel, N.Y., Elazar, S., Rosenshine, I. (2008). Mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Current Opinion in Microbiology*, 11(1), 60-65. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.01.004>
- Sokolov, S., Fursova, K., Shulcheva, I., Nikanova, D., Artyemieva, O., Kolodina, E., Brovko, F. (2021). Comparative analysis of milk microbiomes and their association with bovine mastitis in two farms in Central Russia. *Animals*, 11(5), 1401. <https://doi.org/10.3390/ani11051401>

- Soto Del Rio M.L.D., Dalmasso, A., Civera, T., Bottero, M.T. (2017). Characterization of bacterial communities of donkey milk by high-throughput sequencing. *International Journal of Food Microbiology*, 251, 67-72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.023>
- Steinberg, R.S., Silva e Silva, L.C., De Souza, M.R., Reis, R.B., Da Silva, P.C., Lacorte, G.A., Nunes, Á.C. (2022). Changes in bovine milk bacterial microbiome from healthy and subclinical mastitis affected animals of the Girolando, Gyr, Guzera, and Holstein breeds. *International Microbiology*, 25(4), 803-815. <https://doi.org/10.1007/s10123-022-00267-4>
- Stella, A.E., Maluta, R.P., Rigobelo, E.C., Marin, J.M., De Ávila, F.A. (2012). Virulence genes in isolates of Escherichia coli from samples of milk and feces from dairy cattle. *Journal of Food Protection*, 75(9), 1698-1700. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.JFP-11-468>
- Szala, Ł., Staninska-Pięta, J., Piotrowska-Cyplik, A. (2026). Microbiome of Bovine Milk and Factors Influencing Its Composition. *Animals*, 16(7), 996. <https://doi.org/10.3390/ani16070996>
- Taponen, S., McGuinness, D., Hiitiö, H., Simojoki, H., Zadoks, R., Pyörälä, S. (2019). Bovine milk microbiome: a more complex issue than expected. *Veterinary Research*, 50(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0662-y>
- Tarrah, A., Callegaro, S., Pakroo, S., Finocchiaro, R., Giacomini, A., Corich, V., Cassandro, M. (2022). New insights into the raw milk microbiota diversity from animals with a different genetic predisposition for feed efficiency and resilience to mastitis. *Scientific Reports*, 12(1), 13498. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17418-2>
- Tekkal, H., Tel, O.Y. (2022). Sığırlarda Mastitisin Teşhisinde Çiftlikte Kültür ve Konvansiyonel Kültür Yöntemlerinin Karşılaştırılması. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 11(2), 185. <https://doi.org/10.31196/huvfd.1150847>
- Treven, P., Mrak, V., Matijašić, B.B., Horvat, S., Rogelj, I. (2015). Administration of probiotics Lactobacillus rhamnosus GG and Lactobacillus gasseri K7 during pregnancy and lactation changes mouse mesenteric lymph nodes and mammary gland microbiota. *Journal of Dairy Science*, 98(4), 2114-2128. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8519>

- Urbaniak, C., Angelini, M., Gloor, G.B., Reid, G. (2016). Human milk microbiota profiles in relation to birthing method, gestation and infant gender. *Microbiome*, 4(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0145-y>
- Vasquez, A.K., Ganda, E.K., Capel, M.B., Eicker, S., Virkler, P.D., Bicalho, R.C., Nydam, D.V. (2019). The microbiome of *Escherichia coli* and culture-negative nonsevere clinical mastitis: Characterization and associations with linear score and milk production. *Journal of Dairy Science*, 102(1), 578-594. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15062>
- Wang, Z., Ma, Z., Tian, Z., Jia, H., Zhang, L., Mao, Y., Li, M. (2025). Microbial dysbiosis in the gut–mammary axis as a mechanism for mastitis in dairy cows. *International Journal of Dairy Technology*, 78(1), e13150. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.13150>
- Weiglmeier, P.R., Rösch, P., Berkner, H. (2010). Cure and curse: *E. coli* heat-stable enterotoxin and its receptor guanylyl cyclase C. *Toxins*, 2(9), 2213-2229. <https://doi.org/10.3390/toxins2092213>
- Wellnitz, O., Bruckmaier, R.M. (2012). The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *The Veterinary Journal*, 192(2), 148-152. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.09.013>
- Williams, J.E., Carrothers, J.M., Lackey, K.A., Beatty, N.F., York, M.A., Brooker, S.L., McGuire, M.K. (2017). Human milk microbial community structure is relatively stable and related to variations in macronutrient and micronutrient intakes in healthy lactating women. *The Journal of Nutrition*, 147(9), 1739-1748. <https://doi.org/10.3945/jn.117.248864>
- Xu, T., Cao, W., Huang, Y., Zhao, J., Wu, X., Yang, Z. (2022). The prevalence of *Escherichia coli* derived from bovine clinical mastitis and distribution of resistance to antimicrobials in part of Jiangsu Province, China. *Agriculture*, 13(1), 90. <https://doi.org/10.3390/agriculture13010090>
- Xue, Z., Kable, M.E., Marco, M.L. (2018). Impact of DNA sequencing and analysis methods on 16S rRNA gene bacterial community analysis of dairy products. *Msphere*, 3(5), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/msphere.00410-18>

- Yang, P., Wu, Z., Zhang, S., Yan, L., Yan, Y., Zhou, F., Zhang, Z. (2026). Predicting dairy cattle PL via longitudinal rumen microbiome dynamics using machine learning approaches. *Microbiology Spectrum*, 14(5), e02969-25. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02969-25>
- Yap, M., O'Sullivan, O., O'Toole, P.W., Sheehan, J.J., Fenelon, M.A., Cotter, P.D. (2024). Seasonal and geographical impact on the Irish raw milk microbiota correlates with chemical composition and climatic variables. *Msystems*, 9(4), e01290-23. <https://doi.org/10.1128/msystems.01290-23>
- Yu, W., Zhang, Z., Wang, Z., Lin, X., Dong, X., Hou, Q. (2025). Comprehensive Prevention and Control of Mastitis in Dairy Cows: From Etiology to Prevention. *Veterinary Sciences*, 12(9), 800. <https://doi.org/10.3390/vetsci12090800>
- Yuan, S., Cohen, D.B., Ravel, J., Abdo, Z., Forney, L.J. (2012). Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA from the human microbiome. *PloS One*, 7(3), e33865. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033865>
- Zeng, Y.H., Koblížek, M., Li, Y.X., Liu, Y.P., Feng, F.Y., Ji, J.D., Wu, Z.H. (2013). Long PCR-RFLP of 16S-ITS-23S rRNA genes: a high-resolution molecular tool for bacterial genotyping. *Journal of Applied Microbiology*, 114(2), 433-447. <https://doi.org/10.1111/jam.12057>
- Zhang, R., Huo, W., Zhu, W., Mao, S. (2015). Characterization of bacterial community of raw milk from dairy cows during subacute ruminal acidosis challenge by high-throughput sequencing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(5), 1072-1079. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6800>
- Zigo, F., Farkašová, Z., Rehan, I.F.M., Sayed-Ahmed, A. (2022). Occurrence of mastitis in dairy herds and the detection of virulence factors in Staphylococci. In Staphylococcal infections-recent advances and perspectives. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.108256>

**T.C.**

**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİLİMSEL ETİK BEYANI**

“Escherichia coli Kaynaklı Sığır Mastitislerinin Süt Mikrobiyomunda Meydana Getirdiği Değişikliklerin Araştırılması” başlıklı Doktora tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

.....

Yiğit SEFEROĞLU

15/06/2026

## ÖZ GEÇMİŞ

**Soyadı, Adı** : SEFEROĞLU Yiğit  
**Uyruk** : T.C.  
**Doğum yeri ve tarihi** : İzmir / 07.06.1993  
**Telefon** : 0 506 352 52 68  
**E-posta** : yigit.seferoglu@adu.edu.tr  
**Yabancı dil** : İngilizce

## EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	-
Y. Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı	2020
Lisans	Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2016

## BURSLAR ve ÖDÜLLER

TUBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı 2024 yılı 1. Dönem

## İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2017-2021	Kılıç Deniz Ürünleri A.Ş.	Sorumlu Veteriner Hekim
2021-	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Klinik Öncesi Bilimler Bölümü Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı	Araştırma Görevlisi

## AKADEMİK YAYINLAR

### 1. MAKALELER

- Özavci, V., Kirkan, Ş., Yüksel Dolgun, H.T., Karadaş, E.R.K.A.N., Seferoğlu, Y. (2026). Prevalence of virulent *Escherichia coli* pathotypes in calf diarrhoea: molecular characterisation and antibiotic resistance profiles in Türkiye. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 111-120. <https://doi.org/10.24425/pjvs.2026.158512>
- Aslantaş, Ö., Seferoğlu, Y., Türkyılmaz, S. (2025). Whole Genome Sequencing of Multi-Drug Resistant *Enterococcus faecalis* Isolated from a Camel. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 80, 2.
- Dolgun, O., Dolgun, H.T.Y., Seferoğlu, Y., Kirkan, Ş. (2025). Identification and Antifungal Susceptibility of Candida Species in Canine Oral Flora. *Animal Health Production and Hygiene*, 14(1), 17-22. <https://doi.org/10.53913/aduveterinary.1636617>

- Seferoglu, Y., Turkyilmaz, M.K., Turkyilmaz, S. (2024). Investigation of antibiotic resistance, phylogenetic groups and clonal relationships of colistin resistant *Escherichia coli* isolates obtained from broilers. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 79(1), 27-40.
- Yüksel Dolgun, H.T., Seferoğlu, Y., Türkyılmaz, S. (2024). Phylotypes, Antibiotic Resistance and Biofilm Formation Determined in Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolates in Diarrheic Cats. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 30(5). <https://doi.org/10.9775/kvfd.2024.32343>
- Ozavci, V., Dolgun, H.T.Y., Kirkan, S., Seferoglu, Y., Semen, Z., Parin, U. (2023). Evaluation of Streptococcus species isolated from subclinical sheep mastitis by molecular methods and determination of virulence factors and antimicrobial resistance genes. *Veterinárni Medicina*, 68(9), 359. <https://doi.org/10.17221/42/2023-VETMED>
- Özavci, V., Yüksel–Dolgun, H. T., Seferoğlu, Y., Kirkan, Ş. (2023). Detection of *Brucella canis* infection in Pit Bull breed dogs in Turkey. *Revista Científica de la Facultad de Veterinaria*, 33(2). <https://doi.org/10.52973/rcfcv-e33304>
- Kirkan, S., Erbas, G., Dolgun, H., Parin, U., Turkyilmaz, S., Savasan, S., Seferoglu, Y. (2023). Pathotyping and Antibiotic Resistance Characteristics of *Escherichia coli* Isolates from Calf Diarrhea. *In Proceedings of the Bulgarian Academy of Sciences*, 76, 9, 1421-1429. <https://doi.org/10.7546/CRABS.2023.09.13>
- Kırkan, Ş., Erbaş, G., Dolgun, H.T.Y., Seferoğlu, Y., Parin, U., Savaşan, S. (2023). Detection of Tick Borne Zoonotic Bacteria by PCR in Dogs. *Animal Health Production and Hygiene*, 12(1), 40-44. <https://doi.org/10.53913/aduveterinary.1293940>
- Özavcı, V., Seferoğlu, Y. (2023). İnfeksiyöz Deve (*Camelus dromedarius*) Keratokonjonktivitis Olgularında *Moraxella bovoculi*'nin İdentifikasyonu ve Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Belirlenmesi. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 8(1), 110-116. <https://doi.org/10.35229/jaes.1245621>
- Özavci, V., Dolgun, H.T.Y., Seferoğlu, Y., Kirkan, Ş. (2023). Evaluation of Virulence and Antimicrobial Resistance Genes of Enterococcus Species Isolated from Sheep Milk with Subclinical Mastitis. *Journal of Applied Biological Sciences*, 17(3), 467-479. <https://doi.org/10.71336/jabs.1253>

Seferoğlu, Y., Kırkan, Ő. (2022). Bovine *Escherichia coli* Mastitis and Effects on Milk Microbiota. *Animal Health Production and Hygiene*, 11(2), 56-65. <https://doi.org/10.53913/aduveterinary.1179963>

Seferoğlu, Y., Kırkan, Ő. (2022). Roles of Probiotics in Animal Health. *Animal Health Production and Hygiene*, 11(1), 40-46. <https://doi.org/10.53913/aduveterinary.1060132>

## **2. PROJELER**

İzmir ili ilçelerinde Buzağı İshallerinde Rol Oynayan *Escherichia coli* Patotiplerinin Moleküler Tiplendirilmesi ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Araştırılması. Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi. 03.03.2023 - 03.03.2025

Koyunların Subklinik Mastitislerinden İzole Edilen *Streptococcus* Türlerinin Moleküler İdentifikasyonu Virulens Genlerinin ve Antimikrobiyal Dirençlerinin Belirlenmesi. Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi. 14.06.2022-05.12.2023

## **3. BİLDİRİLER**

### **A) Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler**

Dolgun, H.T.Y., Seferoğlu, Y. Köpek oral florasındaki *Candida* türlerinin identifikasyonu ve antifungal duyarlılıkları. 5th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences. 23.11.2022

## B) Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler

Şükrü KIRKAN, H. Tuğba YÜKSEL DOLGUN, Yiğit SEFEROĞLU, Tansu TANIR. Kanatlı kümeslerindeki mikrobiyal biyoaerosol çeşitliliğinin araştırılması Investigation of microbial bioaerosol diversity in poultry houses. XVI. Ulusal Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi. 28.10.2024

Şükrü KIRKAN, H. Tuğba YÜKSEL DOLGUN, Yiğit SEFEROĞLU, Burak PALALIOĞLU. Endometritisli ineklerden patojenlerin mikroorganizmaların MALDI-TOF MS ile identifikasyonu ve izolatların antibiyotiklerin duyarlılıklarının belirlenmesi Identification of pathogenic microorganisms from cows with endometritis using MALDI-TOFMS and determination of antibiotic susceptibilities. XVI. Ulusal Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi. 28.10.2024

İlker KURT, Uğur PARIN, Yiğit SEFEROĞLU. Mastitisli ineklerden *Staphylococcus aureus*'un moleküler identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi. XVI. Ulusal Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi. 28.10.2024