

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ
DOKTORA PROGRAMI
DR-2026-0019

MASTİTİS AŞISI YAPILAN İNEKLERİN SÜT
MİKROBİYOMU ÜZERİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ

EVİRİM BEYDİLİ
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Şükrü KIRKAN

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-23025 proje numarası ile desteklenmiştir.

EvrİM BEYDİLİ bu doktora tezini 100/2000 YÖK Doktora Bursiyeri olarak tamamlamıştır.

AYDIN-2026

KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Evrim BEYDİLİ tarafından hazırlanan “Mastitis Aşısı Yapılan İneklerin Süt Mikrobiyomu Üzerindeki Değişikliklerinin Belirlenmesi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 15 /06/2026

Üye (T.D.) : (ünvan, adı soyadı) (üniversite) (imza) ...
Üye : (ünvan, adı soyadı) (üniversite) (imza) ...
Üye : (ünvan, adı soyadı) (üniversite) (imza) ...
Üye : (ünvan, adı soyadı) (üniversite) (imza) ...
Üye : (ünvan, adı soyadı) (üniversite) (imza) ...

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

Tez çalışmam süresince bilgi, deneyim ve yol göstericiliğiyle bana destek olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Şükrü KIRKAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Akademik gelişimime sağladığı değerli katkılar için kendisine teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitim sürecim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı'nın değerli hocaları Prof. Dr. Kadir Serdar DİKER, Prof. Dr. Serap SAVAŞAN'a, Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ'a, Prof. Dr. Göksel ERBAŞ'a, Prof. Dr. Uğur PARIN'a, Doç. Dr. Hafize Tuğba YÜKSEL DOLGUN ve Arş. Gör. Yiğit SEFEROĞLU'na teşekkür ederim. Doç. Dr. Hafize Tuğba YÜKSEL DOLGUN'un yalnızca akademik süreçte değil, hayatımın her döneminde desteğini ve yakınlığını hissetmiş olmak benim için çok kıymetlidir. Bu yolculukta her zaman yanımda olduğunu bilmek bana güç vermiştir. Kendisine ayrıca en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca verdikleri emek, fedakârlık ve manevi destek sayesinde bugün bu noktaya ulaşmamı sağlayan annem Fisun Yeşim DÖNMEZ, babam Tuncay DÖNMEZ ve kardeşim Ege DÖNMEZ'e sonsuz teşekkür ederim. Onların desteği olmasaydı bu akademik yolculuğa adım atma cesaretini bulmam mümkün olmayabilirdi.

Sevgisi, anlayışı ve desteğiyle yanımda olan sevgili eşim Burak Cem BEYDİLİ'ye teşekkür ederim. Varlığı ve desteğiyle bana her zaman güç vermiş, hayatımın en önemli dayanaklarından biri olmuştur.

Doktora yolculuğumun en özel anlamı ise canım oğlum Sarp BEYDİLİ olmuştur. Bu süreçte onun hayatıma katılması, tüm yoğunluk ve yorgunluk içinde bana tarifsiz bir mutluluk ve motivasyon kaynağı olmuştur. Çalışırken bir yandan "annen doktor olacak" düşüncesiyle ilerlemek, bu süreci benim için çok daha anlamlı hale getirmiştir. Varlığıyla bana güç veren en güzel motivasyon kaynağım olmuştur.

Tez çalışmamın ortaya çıkmasında yalnızca akademik bilgi ve emek değil, aynı zamanda büyük bir destek, sabır ve fedakârlık bulunmaktadır. Bu uzun ve yoğun yolculuk boyunca yanımda olan, bana inanan ve destek veren herkese içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Mastitis ve Meme Sağlığı.....	5
2.2. Mastitis ve Süt Mikrobiyomu Disbiyozu.....	7
2.3. Mastitis Aşıları.....	9
2.4. Mastitis Aşılarının Sınıflandırılması.....	10
2.4.1. Ticari Aşılar.....	11
2.4.2. Sürüye Özgü Otovaksinler	12
2.4.3. Deneysel ve Yeni Nesil Aşılar.....	12
2.5. Aşıların Süt Mikrobiyomu Üzerine Etkileri.....	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Gereç	19
3.1.1. Örnekler.....	19
3.1.2. Cihazlar	20
3.1.3. DNA Ekstraksiyonu	21

3.1.4. Mikrobiyom Analizi.....	23
3.1.4.1. PCR Amplifikasyonu	23
3.1.4.2. Biyoinformatik Analiz.....	25
4. BULGULAR	27
4.1. Mikrobiyom Bulguları	27
4.1.1. OTU Temelli Benzerlik Analizi Bulguları	29
4.1.2. PCA (Principal Component Analysis) Bulguları	31
4.1.3. Alfa Çeşitlilik Analizi Bulguları	33
4.1.4. Beta Çeşitlilik (Weighted UniFrac PCoA) Bulguları	35
4.1.5. Bray–Curtis PCoA Bulguları	38
4.1.6. Filum Düzeyinde Taksonomik Dağılım Bulguları.....	39
4.1.7. Genus Bazında Taksonomik Dağılım Bulguları.....	40
4.1.8. Krona Analiz Bulguları.....	45
4.1.9. LEfSe Analizi Bulguları.....	56
5. TARTIŞMA.....	59
SONUÇ VE ÖNERİLER	69
KAYNAKLAR	71
BİLİMSEL ETİK BEYANI	82
ÖZ GEÇMİŞ	83

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CDT	: DNA çözündürme tamponu
CMT	: California Mastitis Testi
CoNS	: Koagülaz-Negatif Stafilokoklar
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EC	: Elektriksel iletkenlik
IMI	: Meme İçi Enfeksiyon
LDA	: Doğrusal diskriminant analizi
LEfSe	: Doğrusal Diskriminant Analizi Etki Büyüklüğü
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
ng	: Nanogram
NGS	: Yeni nesil dizileme
ONT	: Oxford Nanopore Technologies
OTU	: Operasyonel Taksonomik Unite
PCoA	: Temel Koordinatlar Analizi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PERMANOVA	: Permütasyonel çok değişkenli varyans analizi
RDP	: Ribosomal Database Project
RNA	: Ribonükleik Asit
rRNA	: Ribozomal RNA
SCC	: Somatik Hücre Sayısı
WDT	: DNA yıkama tamponu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	OTU temelli heatmap ve dendrogram analizi.....	29
Şekil 2.	Tüm taksonomik verilere dayalı PCA dağılım grafiği	31
Şekil 3.	Örneklerin 3 boyutlu PCA analiz grafiği.....	32
Şekil 4.	Shannon entropy indeksine ait scatter plot analizi.....	33
Şekil 5.	Örneklerin Faith_PD alfa çeşitlilik indeksine göre dağılımı.....	34
Şekil 6.	Chao1 alfa çeşitlilik indeksinin örnek bazlı scatter plot gösterimi.....	34
Şekil 7.	Gruplara ait Chao1 alfa çeşitlilik indekslerinin boxplot gösterimi.....	35
Şekil 8.	Weighted UniFrac tabanlı PCoA beta çeşitlilik analizi.....	36
Şekil 9.	GE ve GK gruplarına ait Weighted UniFrac PCoA analizi.....	37
Şekil 10.	Beta çeşitliliğin Bray–Curtis tabanlı PCoA Analizi.....	38
Şekil 11.	Aşılı grup örnekleri ile kontrol grubu ortalamasının filum düzeyinde karşılaştırılması.....	39
Şekil 12.	Mikrobiyal toplulukların genus düzeyinde taksonomik kompozisyonu.....	41
Şekil 13.	Örneklerin genus düzeyinde relatif bolluk dağılımlarının pasta grafikler ile gösterimi.....	42
Şekil 14.	Kontrol grubu ortalaması ve aşılı örneklerin genus bazlı taksonomik kompozisyonu.....	43
Şekil 15.	K1 kontrol ve E13-E14 aşılı örneklerine ait Krona grafikleri.....	50
Şekil 16.	K2 kontrol ve E15-E16 aşılı örneklerine ait Krona grafikleri.....	51
Şekil 17.	K3 kontrol ve E17-E18 aşılı örneklerine ait Krona grafikleri.....	52
Şekil 18.	K4 kontrol ve E19-E20 aşılı örneklerine ait Krona grafikleri.....	53
Şekil 19.	K5 kontrol ve E21-E22 aşılı örneklerine ait Krona grafikleri.....	54
Şekil 20.	K6 kontrol ve E23-E24 aşılı örneklerine ait Krona grafikleri.....	55

Şekil 21.	Genus düzeyinde LEfSe (LDA Effect Size) analiz grafiği.....	56
Şekil 22.	Genus düzeyinde LEfSe kladogramı.....	57

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.	Aşı uygulanan hayvanlara ait genel bilgiler ve örnekleme takvimi.....	20
Tablo 2.	Seçilen örneklerin DNA ölçümleri.....	22
Tablo 3.	PCR karışımı oranları.....	24
Tablo 4.	Barkod PCR ısıl döngü ve süre diyagramı.....	24
Tablo 5.	Örneklerin havuzlama yöntemine göre dağılımları.....	27
Tablo 6.	Mikrobiyom analiz grupları.....	28
Tablo 7.	Kontrol ve E13–E18 örneklerinde baskın familyaların karşılaştırılması.....	45
Tablo 8.	Kontrol ve E19–E24 örneklerinde baskın familyaların karşılaştırılması.....	45

ÖZET

MASTITİS AŞISI YAPILAN İNEKLERİN SÜT MİKROBIYOMU ÜZERİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Beydili E. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Mikrobiyolojisi Programı, Doktora Tezi, Aydın, 2026.

Amaç: Bu çalışma, kontrol ve aşılı gruplardan elde edilen süt örneklerinde mikrobiyal topluluk yapılarının karşılaştırılması ve aşılama uygulamasının süt mikrobiyotasına etkisinin değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirildi.

Gereç ve Yöntem: Araştırmada mastitis aşısı uygulanmamış hayvanlardan elde edilen 6 süt örneği ve mastitis aşısı uygulanmış hayvanlardan elde edilen 12 süt örneği süt örneği kullanıldı. Örneklerden elde edilen bakteriyel DNA'lar üzerinde 16S rRNA gen dizileme yöntemi ile mikrobiyom analizleri gerçekleştirildi. OTU temelli analizler, alfa ve beta çeşitlilik analizleri ile filum, familya ve genus düzeyinde taksonomik dağılımlar değerlendirildi.

Bulgular: OTU analizleri sonucunda Kontrol grubunda 6 havuzlanmış örnekten toplam 1.520.384, aşılı grupta ise 12 örnekten toplam 5.759.632 sekans okuması elde edilmiştir. Tüm örneklerde baskın filumların *Pseudomonadota*, *Bacillota* ve *Bacteroidota* olduğu belirlendi. Genus düzeyinde ise *Leuconostoc*, *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* baskın olarak tespit edildi. Aşılı grup örneklerinde mikrobiyal dağılımın daha homojen olduğu ve özellikle bazı örneklerde *Leuconostoc* relatif bolluğunun arttığı gözlemlendi. Alfa çeşitlilik analizlerinde aşılı grupta tür zenginliği ve filogenetik çeşitliliğin genel olarak daha yüksek olduğu belirlendi. Chao1 analizinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p < 0,05$). Beta çeşitlilik analizlerinde ise aşılı grup örneklerinin daha homojen kümelenme gösterdiği tespit edildi.

Sonuç: Çalışma sonuçları, aşılama uygulamasının süt mikrobiyotasını tamamen değiştirmekten ziyade daha homojen bir mikrobiyal dağılım eğilimi ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca süt mikrobiyotasının çevresel koşullar, klinik geçmiş ve bireysel farklılıklardan etkilenebilen dinamik bir yapıya sahip olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: 16S rRNA, Aşılama, Mastitis, Mikrobiyal çeşitlilik, Mikrobiyom, Sığır sütü.

ABSTRACT

DETERMINATION OF CHANGES ON MILK MICROBIOME OF MASTITIS VACCINATED COWS

Beydili E. Aydın Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Veterinary Microbiology Program, Doctorate Thesis, Aydın, 2026.

Objective: This study was conducted to compare the microbial community structures in milk samples obtained from control and vaccinated groups and to evaluate the effect of vaccination on the milk microbiota.

Material and Methods: In this study, 6 milk samples obtained from animals that had not been vaccinated against mastitis and 12 milk samples obtained from mastitis-vaccinated animals were used. Microbiome analyses were performed on bacterial DNA extracted from the samples using 16S rRNA gene sequencing. OTU-based analyses, alpha and beta diversity analyses, and taxonomic distributions at the phylum, family, and genus levels were evaluated.

Results: OTU analysis revealed a total of 1,520,384 sequence reads from six pooled samples in the control group and 5,759,632 sequence reads from twelve samples in the vaccinated group. The dominant phyla detected in all samples were *Pseudomonadota*, *Bacillota*, and *Bacteroidota*. At the genus level, *Leuconostoc*, *Pseudomonas*, and *Acinetobacter* were identified as the dominant genera. The vaccinated group showed a more homogeneous microbial distribution and a higher relative abundance of *Leuconostoc* in some samples. Alpha diversity was generally higher in the vaccinated group, with a significant difference observed in the Chao1 index ($p < 0.05$). Beta diversity analysis also indicated more homogeneous clustering among vaccinated samples.

Conclusion: The results suggest that vaccination may be associated with a more homogeneous microbial distribution rather than a complete alteration of the milk microbiota. Additionally, the milk microbiota was found to be influenced by environmental factors, clinical history, and individual variability.

Keywords: 16S rRNA, Bovine milk, Mastitis, Microbial diversity, Microbiome, Vaccination.

1. GİRİŞ

Çevrede bulunan mikroorganizmaların yaklaşık %99'unun, geleneksel kültür temelli yöntemlerle tanımlanamadığı tahmin edilmektedir. Moleküler tekniklerin ve DNA dizileme yöntemlerinin gelişimi, süt de dahil olmak üzere çevremizdeki mikrobiyomun daha derinlemesine, hızlı ve maliyet etkin bir şekilde incelenmesine olanak sağlamıştır (Bhatt ve diğerleri, 2012). Bu gelişmelerle birlikte, süt mikrobiyotasına yönelik ilk metagenomik çalışmalar 2012 yılında gerçekleştirilmiş olup, o tarihten bu yana giderek artan sayıda araştırmacı süt mikrobiyomunu incelemeye yönelmiştir (Bhatt ve diğerleri, 2012).

Süt mikrobiyomu; hayvanın fizyolojik durumu, çevresel koşullar, sağım hijyeni, beslenme, mevsimsellik ve üretim koşulları gibi birçok faktörden etkilenmekte olup, meme sağlığı ile doğrudan ilişkilidir (Guo ve diğerleri, 2021; Metzger ve diğerleri, 2018; Moscone ve diğerleri, 2025; Nikoloudaki ve diğerleri, 2021). Bu bağlamda, mikrobiyal dengenin bozulması mastitis gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (Bhatt ve diğerleri, 2012). Mastitis, süt sığırlarında en yaygın ve ekonomik kayıplara yol açan hastalıklardan biri olup, genellikle patojen mikroorganizmaların meme dokusunu invaze etmesi sonucu ortaya çıkmaktadır (Velázquez-Ordoñez ve diğerleri, 2019).

Süt, yüksek su aktivitesi, protein, karbonhidrat, yağ, vitamin ve mineral içeriği sayesinde hem patojen hem de insan sağlığı açısından faydalı mikroorganizmaların gelişimi için uygun bir ortam oluşturmaktadır (Velázquez-Ordoñez ve diğerleri, 2019). 1 mL sütün, oldukça yüksek tür çeşitliliği gösterecek şekilde yaklaşık 10^3 ile 10^5 CFU arasında bakteri içerebileceği tahmin edilmektedir (Nikoloudaki ve diğerleri, 2021). Bu nedenle süt mikrobiyomu ve süt ürünlerinin mikrobiyotası üzerine yapılan araştırmalar hızla gelişen bir alan olup, modern moleküler biyoloji tekniklerinin giderek artan kullanımı bu ekosisteme dair bilgilerimizi sürekli genişletmektedir (Li ve diğerleri, 2016; Metzger ve diğerleri, 2018).

Bununla birlikte, süt mikrobiyomunun yapısı oldukça değişken olup; coğrafi farklılıklar, mevsimsel değişimler, çiftlik koşulları, örnekleme yöntemi ve üretim süreçleri gibi pek çok değişkene bağlı olarak farklılık göstermektedir (Guo ve diğerleri, 2021; Metzger ve diğerleri, 2018; Moscone ve diğerleri, 2025; Nikoloudaki ve diğerleri, 2021; Rodrigues ve diğerleri, 2017). Ayrıca, süt ve süt ürünlerinde mikrobiyal kontaminasyon hem ürün kalitesi hem de halk sağlığı açısından önemli riskler oluşturmaktadır (Velázquez-Ordoñez ve diğerleri, 2019).

Başlangıçta, meme sisterninde biriken sütün doğal olarak steril olduğu düşünölmekteydi ve bu göröş, geleneksel költüre dayalı yöntemlere dayanmaktaydı (Rainard, 2017). Ancak költürden bağımsız moleküler analizler bu varsayımı kesin olarak çürütecek yeterli kanıt sunmamıştır. Rainard (2017) süt sarnıcı (meme sisterni) ortamının tamamen steril olmadığını ve belirli mikroorganizma grupları tarafından kolonize edilebileceğini belirtmiştir. Metzger ve diğlerleri (2018), bireysel meme loblarından ve doğrudan meme sisterninden alınan süt örnekleri üzerinde genetik analizler gerçekleştirmiş ve en yüksek DNA verimi ile amplifikasyon başarısının sisternal örneklerde elde edildiğini bildirmiştir. Bununla birlikte, bu örneklerden bakteriyel üreme sağlanamamış olup, tespit edilen DNA'nın bağışıklık hücreleri tarafından parçalanmış bakteriyel kalıntılardan veya düşük düzeyde çevresel kontaminasyondan kaynaklanabileceği öne sürölmüştür.

Sütün çekirdek mikrobiyomunun tanımlanması hâlâ zorluklar içermektedir; çünkü uygun örnekleme aşamasının belirlenmesi güçtür. Çalışmalar, mikrobiyal kompozisyonun; örneklerin doğrudan memeden, meme kanalından, taşıma sonrası toplama tanklarından veya depolama ve işleme tesislerine ulaşım sürecinde alınmasına bağılı olarak değışiklik gösterdiğini ortaya koymaktadır (Li ve diğlerleri, 2016; Metzger ve diğlerleri, 2018). Ayrıca süt mikrobiyomu veri setlerinde bazı bakterilerin varlığının yorumlanması tartışmalıdır. *Pseudomonas*, *Halomonas* ve *Shewanella* gibi mikroorganizmaların tespiti, özellikle DNA polimerazlar ve ekstraksiyon kitleri gibi laboratuvar reaktiflerinden kaynaklanan kontaminasyon sonucu ortaya çıkabilmektedir. Sütün doğası gereği düşük mikrobiyal biyokütleye sahip olması nedeniyle, çok küçük kontaminasyonlar dahi dizileme sonuçlarını önemli ölçüde etkileyebilmekte ve analizlerde yanlışlığa neden olabilmektedir (Ganda ve diğlerleri, 2021; Metzger ve diğlerleri, 2018).

Önceki çalışmalarda, sağlıklı düvelerden elde edilen sütlerde en sık rastlanan bakteriyel cinsler arasında *Faecalibacterium*, *Lachnospiraceae*, *Propionibacterium* ve *Aeribacillus* (Oikonomou ve diğlerleri, 2014), *Pseudomonas* ve *Ralstonia* (Kuehn ve diğlerleri, 2013), ayrıca *Psychrobacter*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Halomonas*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Lysinibacillus*, *Streptococcus*, *Marinilactibacillus*, *Lactobacillus*, *Vagococcus*, *Alkaliphilus* ve *Macroccoccus* yer almaktadır (Frazilio ve diğlerleri, 2020). Sağlıklı ineklerden elde edilen çiğ sütlerin metagenomik analizleri ise *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* ve *Actinobacteria* filumlarına ait bakterilerin varlığını ortaya koymuştur (Derakhshani ve diğlerleri, 2018; Hornik ve diğlerleri, 2021; Li ve diğlerleri, 2017).

Laktasyon dönemi, süt mikrobiyomu kompozisyonunu etkileyen önemli bir endojen faktördür. Özellikle erken laktasyon dönemi, mikrobiyomun oldukça dinamik olduğu ve meme sağlığı açısından kritik bir süreç olarak değerlendirilmektedir (Lima ve diğerleri, 2017; Zhu ve diğerleri, 2023). Kolostrum döneminde süt mikrobiyotasının hem kompozisyonunun hem de çeşitliliğinin farklılık gösterdiği ve bu durumun meme sağlığı ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Lima ve diğerleri, 2017). Bu nedenle, süt mikrobiyomunun laktasyon dönemine bağlı değişkenliği, mikrobiyom analizlerinin yorumlanmasında dikkate alınması gereken önemli bir faktördür.

Mastitis, süt sığırlarını etkileyen en önemli hastalıklardan biri olup süt endüstrisi için önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Halasa ve diğerleri, 2007; Rollin ve diğerleri, 2015). Uzun yıllar boyunca, *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus agalactiae* gibi gram pozitif bulaşıcı patojenler, süt sığırı sürülerinde intramammary enfeksiyonların başlıca nedeni olmuştur. Ancak, sürdürülen kontrol programlarının bir sonucu olarak, bulaşıcı bakterilerin neden olduğu mastitis insidansı son 20 yıl içerisinde belirgin şekilde azalmıştır. Buna karşılık, günümüzde süt endüstrisi özellikle koliform bakteriler olmak üzere çevresel patojenlerin neden olduğu mastitisi kontrol etme zorluğu ile karşı karşıyadır (Ruegg, 2017).

Geleneksel olarak mastitisin kontrolünde antibiyotik kullanımı yaygın olmakla birlikte, antibiyotik direnci ve süt ürünlerinde kalıntı riski gibi nedenlerle alternatif yaklaşımlara olan ihtiyaç artmıştır. Bu noktada, mastitis aşılı hem hastalığın önlenmesi hem de sürü sağlığının korunması açısından önemli bir seçenek olarak öne çıkmaktadır. Aşılama yoluyla oluşturulan bağışıklık yanıtının yalnızca patojenlere karşı koruma sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda meme bezindeki mikrobiyal kompozisyonu da etkileyebileceği düşünülmektedir (Velázquez-Ordoñez ve diğerleri, 2019).

Bu doğrultuda, süt mikrobiyomunun yapısı ve bu yapıyı etkileyen faktörlerin anlaşılması, mastitisin patogenezi ve kontrol stratejilerinin geliştirilmesi açısından kritik öneme sahiptir. Özellikle aşı uygulamalarının süt mikrobiyomu üzerindeki etkilerinin ortaya konulması, hem hayvan sağlığı hem de süt kalitesi açısından yeni yaklaşımların geliştirilmesine katkı sağlayacaktır (Bhatt ve diğerleri, 2012; Guo ve diğerleri, 2021).

Bu araştırmada, mastitis aşısı uygulanan süt sığırlarından aşılama öncesi ve sonrası elde edilen süt örneklerinin 16S rRNA gen dizileme yöntemiyle mikrobiyom profillerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda, mikrobiyal topluluk yapısı; taksonomik kompozisyon, alfa çeşitlilik, beta çeşitlilik ve filogenetik dağılım parametreleri üzerinden

değerlendirilmiştir. Elde edilen bulguların, mastitis aşılmasının süt mikrobiyal ekosistemi üzerindeki olası etkilerinin anlaşılmasına ve mastitis kontrol stratejilerinin mikrobiyom temelli yaklaşımlarla desteklenmesine katkı sağlaması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mastitis ve Meme Sağlığı

Mastitis, klinik seyrine göre klinik ve subklinik; epidemiyolojik özelliklerine göre ise kontagiyöz ve çevresel mastitis olarak sınıflandırılmaktadır. (De Vlieghe ve diğerleri, 2012). Kontagiyöz mastitis olgularında başlıca *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* ve *Mycoplasma spp.* rol oynarken; çevresel mastitis olguları çoğunlukla *Escherichia coli*, çevresel streptokoklar ve diğer çevresel kaynaklı bakterilerle ilişkilendirilmektedir (Abdi ve diğerleri, 2021). Çevresel mastitis ise genellikle koagülaz negatif *Staphylococcus* türleri, *Escherichia coli* ve çevresel *Streptococcus* türleri ile ilişkilendirilmekte olup enfeksiyon kaynağını çoğunlukla dışkı, toprak ve nemli barınak ortamı oluşturmaktadır (Fox, 2009).

Mastitis, klinik bulguların varlığına göre klinik ve subklinik olmak üzere iki temel formda değerlendirilmektedir (De Vlieghe ve diğerleri, 2012). Klinik mastitis olgularında ateş, iştahsızlık ve halsizlik gibi sistemik belirtilerin yanı sıra meme dokusunda şişlik, sıcaklık artışı ve hiperemi görülebilmektedir. Bununla birlikte süt yapısında sulanma, pıhtılı görünüm ve renk değişiklikleri gibi fiziksel bozukluklar ortaya çıkmakta ve somatik hücre sayısında belirgin artış meydana gelmektedir (Gruet ve diğerleri, 2001). Subklinik mastitis vakalarında ise çoğu zaman gözle fark edilebilen meme veya süt değişiklikleri bulunmamakta, hastalık genellikle laboratuvar analizleri ile tespit edilmektedir. Buna rağmen süt verimindeki azalma ile somatik hücre sayısındaki yükseliş, subklinik mastitisin en önemli göstergeleri arasında kabul edilmektedir (Ruegg, 2017).

Mastitis, yalnızca meme sağlığını etkileyen bir hastalık olmayıp süt sığırlarının refahı, süt kalitesi ve işletmelerin ekonomik sürdürülebilirliği üzerinde de önemli sonuçlar oluşturmaktadır. Klinik mastitisli (CM) ineklerde belirgin düzeyde stres ve fizyolojik yük oluştuğu, bunun da üreme performansını olumsuz etkilediği bildirilmektedir. Düşük gebelik oranları, artan suni tohumlama ihtiyacı, doğum ile ilk tohumlama arasındaki sürenin uzaması, abort oranlarındaki artış ve açık gün sayısındaki yükselme bu etkiler arasında yer almaktadır (Dalanezi ve diğerleri, 2020). Ayrıca mastitisin laktasyon performansı üzerinde de olumsuz etkiler oluşturduğu; süt veriminde azalma ve süt yağı oranında düşüşe neden olduğu bildirilmektedir (Razooqi ve diğerleri, 2021).

Halk sağlığı açısından değerlendirildiğinde mastitis iki y6nl6 risk oluşturmaktadır. İlk olarak, enfekte hayvanlardan elde edilen s6t ve s6t 6r6nleri zoonotik patojenler taşıyabilmekte ve bu durum insan sağlığını tehdit etmektedir (Rahman ve diğerleri, 2020). İkinci olarak, temel kontrol y6ntemlerinden biri olan antibiyotiklerin uygunsuz kullanımı, antibiyotik dirençli suşların ortaya çıkmasına neden olarak k6resel 6lekte bir sağlık riski oluşturmaktadır (Kovaević ve diğerleri, 2022; Pascu ve diğerleri, 2022).

Ekonomik açıdan bakıldığında mastitisin mali y6k6 olduğa b6y6kt6r ve hem doğrudan hem de dolaylı maliyetleri kapsamaktadır. Doğrudan maliyetler; klinik vakalarda uygulanan ilaç tedavileri, d6k6len s6t ve s6r6den çıkarılan hayvanlardan kaynaklanmakta olup toplam kayıpların yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır (Aghamohammadi ve diğerleri, 2018). Dolaylı maliyetlerin b6y6k kısmı ise subklinik enfeksiyonlara bağlı s6t verimindeki azalmadan kaynaklanmakta ve toplam kayıpların yaklaşık %70'ini oluşturmaktadır (Huijps ve diğerleri, 2008). Araştırmalar, Amerika Birleşik Devletleri'nde bir s6t işletmesinde laktasyonun ilk 30 g6n6nde g6r6len klinik mastitis vakalarının ekonomik etkisinin yaklaşık 444 ABD doları olduğunu g6stermektedir (Rollin ve diğerleri, 2015).

Bu bulgular, mastitisin ciddi sonuçlarını ortaya koymakta ve hastalığın zamanında teşhisi ile etkili 6nleme ve kontrol stratejilerinin uygulanmasının gerekliliğini vurgulamaktadır. Mastitisin tanısında optimal yaklaşım; hızlı, doğru ve zamanında sonuç verebilen y6ntemlerin kullanılmasıyla hastalığın erken teşhis edilmesi ve etkin şekilde y6netilmesini sağlamalıdır. Geleneksel erken teşhis y6ntemleri arasında yer alan California Mastitis Testi (CMT) ve elektriksel iletkenlik (EC) 6l6mleri, hızlı sonuç vermeleri, ekonomik olmaları ve sahada uygulanabilirlikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu y6ntemlerin 6zg6ll6kleri nispeten d6ř6kt6r. Buna karşılığ, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), enzim bağlantılı imm6nosorbent analiz (ELISA) ve omik teknolojiler gibi ileri tanı y6ntemleri; karmaşık laboratuvar altyapısına ihtiyaç duymakta ve y6ksek maliyetli olmaktadır. Bununla birlikte, bu y6ntemler y6ksek doğruluk ve 6zg6ll6k avantajı sunmaktadır (Chakraborty ve diğerleri, 2019; Hussein ve diğerleri, 2018).

Bu nedenle mevcut ve gelişmekte olan tanı y6ntemlerinin avantajları ve dezavantajları, uygulanabilirlik alanları ve gelişim eğilimlerinin sistematik olarak değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu yaklaşım, s6t sığırı işletmelerinin mevcut koşullara g6re en uygun veya kombine tanı stratejilerini seçmelerine yardımcı olacak ve daha ideal tanı araçlarının geliştirilmesini destekleyecektir. Mastitisin y6netiminde; antibiyotikler, aşılama, bitkisel tedavi, bakteriyosinler ve nanopartik6l temelli tedaviler dâhil olmak 6zere hem geleneksel hem

de yeni yaklaşımlar tedavi ve önleme amacıyla kullanılmaktadır (Gomes ve Henriques, 2016). Ayrıca yapılan çalışmalar, kimyasal dezenfektanların kullanımının özellikle mastitis olmak üzere sığırlarda meme enfeksiyonlarının azaltılmasında ve süt kalitesinin iyileştirilmesinde etkili olduğunu göstermektedir (Skowron ve diğerleri, 2019). Günümüzde antibiyotik tedavisi hâlâ temel yaklaşım olarak kabul edilmekte; ancak yaygın kullanımını, etkinliğini giderek azaltan antibiyotik direnci sorununa yol açmaktadır (Babra ve diğerleri, 2013; Park ve diğerleri, 2012).

Önemli bir koruyucu strateji olan aşılama ise uygulamada çeşitli zorluklarla karşılaşmaktadır. Bir yandan, mastitise neden olan patojenlerin çeşitliliği nedeniyle aşı hedefleri belirlenmiş olsa da genel başarı oranı düşüktür (Ashraf ve Imran, 2020; Bradley ve diğerleri, 2015; Collado ve diğerleri, 2016). Diğer yandan, mevcut aşuların koruyucu etkinliğinin sınırlı olduğu ve maliyetlerinin yüksek olduğu bildirilmektedir (Côté-Gravel ve Malouin, 2019). Konvansiyonel antibiyotik ve aşı uygulamalarının sınırlılıkları göz önüne alındığında, bakteriyosinler ve nanopartikül temelli tedaviler gibi alternatif terapötik yaklaşımlar, özgün tedavi potansiyelleri nedeniyle giderek daha fazla ilgi görmektedir (Castelani ve diğerleri, 2019; Pinheiro Machado ve diğerleri, 2019).

2.2. Mastitis ve Süt Mikrobiyomu Disbiyozu

Mastitis, süt mikrobiyomunu önemli ölçüde etkileyen ve mikrobiyal dengeyi bozan patolojik bir durumdur. Süt sığırlarında en yaygın, ekonomik açıdan en önemli ve maliyetli hastalıklardan biri olan mastitis; meme bezinin inflamasyonu ile karakterize olup, sütte somatik hücre sayısında artış, pıhtılaşma ve istenmeyen renk değişimleri gibi fiziksel ve kimyasal değişikliklere yol açmaktadır (Izquierdo ve diğerleri, 2017).

Mastitis tek tip bir hastalık olarak değerlendirilmemeli; aksine etken mikroorganizmalara, enfeksiyonun şiddetine ve süresine bağlı olarak değişkenlik gösteren, çok etkenli ve çok mikroorganizmalı bir enfeksiyon olarak ele alınmalıdır. Hastalık en yaygın olarak *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, diğer streptokoklar, enterokoklar ve koliform bakteriler ile ilişkilendirilmekte olup, daha nadir olarak *Corynebacterium bovis*'de etkenler arasında yer almaktadır (Izquierdo ve diğerleri, 2017). Bununla birlikte, enfeksiyonlar tek bir baskın patojenle sınırlı olabileceği gibi polimikrobiyal topluluklar şeklinde de gelişebilmekte ve bu durum süt mikrobiyomunun farklı kompozisyonlarda şekillenmesine neden olmaktadır (Pang ve diğerleri, 2018; Urrutia-Angulo ve diğerleri, 2024). Mastitis ile

ilişkili mikrobiyom değişimlerinin yorumlanmasını daha da karmaşık hale getirmektedir. Mastitis sonrası iyileşme sürecinde dahi mikrobiyal dengesizlik (disbiyoz) uzun süre devam edebilmektedir. Bazı süt örneklerinde klinik iyileşmeden sonra belirli bakteriyel taksonların baskınlığını sürdürdüğü gözlenirken, bazı durumlarda mikrobiyal dengenin kademeli olarak yeniden sağlandığı bildirilmektedir (Kaczorowski ve diğerleri, 2022; Urrutia-Angulo ve diğerleri, 2024). Tüm bu veriler birlikte değerlendirildiğinde, mastitisin süt mikrobiyomunu bağlama bağlı bir şekilde etkilediği ve patojenin türü, enfeksiyonun şiddeti ile hastalığın ilerleme sürecine bağlı olarak şekillenen bir mikrobiyom sürekliliği oluşturduğu anlaşılmaktadır. Bu durum, faydalı mikroorganizmalar üzerindeki etkilerin genellenmesini zorlaştırmakta ve mikrobiyomun direnç ve iyileşme mekanizmalarının daha iyi anlaşılabilmesi için tür düzeyinde ve uzunlamasına analizlerin gerekliliğini ortaya koymaktadır (Urrutia-Angulo ve diğerleri, 2024).

Yüksek verimli dizileme teknikleri kullanılarak gerçekleştirilen güncel çalışmalar, mastitisin tüm sistemlerde aynı tip bir disbiyoz oluşturmadığını; bunun yerine süt mikrobiyal topluluklarında bağlama bağlı ve önemli değişikliklere yol açtığını göstermektedir. Çiftlik düzeyinde yapılan karşılaştırmalar, mastitis ile ilişkili baskın mikroorganizma gruplarının yönetim koşullarına ve hastalık insidansına bağlı olarak değiştini ortaya koymuştur (Pang ve diğerleri, 2018). Bu patojen ilişkilerine, mikrobiyal topluluk düzeyinde daha geniş değişimler de eşlik etmektedir. Bunlar arasında filum düzeyinde kompozisyon farklılıkları ve birlikte bulunan bağırsak kökenli takson kümeleri yer almakta olup, bu durum süt mikrobiyotasında çevresel veya fekal kontaminasyonun etkili olabileceğini düşündürmektedir (Pang ve diğerleri, 2018; Yang ve diğerleri, 2025).

Tekrarlayan *Klebsiella* kaynaklı mastitis vakalarında yapılan çalışmalarda, *Faecalibacterium* ve *Ruminococcaceae* gibi sığır bağırsak mikrobiyotası ile ilişkili taksonların etkilenen hayvanlarda artış gösterdiği belirlenmiştir (Yang ve diğerleri, 2025).

Önemli olarak, bazı mastitis durumlarında alfa çeşitliliğin azalması ve belirli patojenlerin baskın hale gelmesi gözlenirse de, bu durum tüm vakalar için geçerli değildir (Secchi ve diğerleri, 2025). Bu nedenle mevcut çalışmalar büyük ölçüde mastitis ile ilişkili süt mikrobiyomu değişimlerine odaklanmakta olup, diğer hastalık ve sağlık durumlarının süt mikrobiyomu üzerindeki etkileri konusunda önemli bir bilgi boşluğu bulunmaktadır (Derakhshani ve diğerleri, 2018; Ruegg, 2022).

2.3. Mastitis Aşıları

Mastitis, süt sığırlarının davranışı ve refahı üzerinde önemli etkilere sahiptir. Hastalığın neden olduğu ağrı ve rahatsızlığa bağlı olarak; aktivite düzeyi, yürüme şekli, beslenme ve kendini temizleme davranışlarında değişiklikler gibi davranışsal tepkiler ortaya çıkmaktadır (Petersson-Wolfe ve diğerleri, 2018). Mastitis aynı zamanda inekler üzerinde olumsuz duygusal etkilere de yol açmaktadır. Hastalık sonucunda hayvanlar daha az aktif, daha az canlı, daha az mutlu ve daha az enerjik hale gelebilmektedir (des Roches ve diğerleri, 2018). Bu durum, mastitisin süt sığırlarında refah açısından en önemli sorunlardan biri olduğunu göstermektedir (Silva ve diğerleri, 2021). Ayrıca mastitis, süt hayvancılığında hastalıklara bağlı ekonomik kayıpların başlıca nedenidir (Rainard ve diğerleri, 2021). Bu maliyetler; süt verimi ve kalitesindeki düşüş, erken sürüden çıkarma nedeniyle düve ihtiyacı, tanı ve tedavi giderlerini kapsamaktadır (Hogeveen ve diğerleri, 2019).

Mastitis, bakterilerin memenin bir veya birden fazla çeyreğinde enfeksiyon oluşturması sonucu gelişmektedir. Enfeksiyonu takiben ineğin bağışıklık sistemi yanıt verir ve sütteki somatik hücre sayısı (SCC) artar. Bu değer 200.000 hücre/ml seviyesine ulaştığında, hayvanda klinik mastitis (KM) geliştiği kabul edilmektedir (International Dairy Federation, 1997). Bu değer altındaysa hayvan subklinik mastitis (SKM) durumundadır; yani hastalık gelişmekte olup henüz klinik belirtiler göstermemektedir (Geary ve diğerleri, 2012).

Hastalığın etiyolojisinde farklı bakteri türleri rol oynamakta olup bunlar bulaşıcı (kontagiyöz) ve çevresel olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Bulaşıcı etkenler arasında *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus agalactiae* yer alırken; çevresel etkenler arasında koliform bakterilerden *Escherichia coli* ve *Klebsiella* türleri bulunmaktadır (Ruegg, 2017). Daha yaygın olarak inekler bulaşıcı etkenlerle enfekte olmakta olup, *S. aureus* prevalansı %7 ile %40 arasında değişmektedir. Koliform bakterilerle oluşan enfeksiyonların prevalansı ise daha düşüktür (Tashakkori ve diğerleri, 2019).

Mastitisin neden olduğu bu yaygınlık, ekonomik kayıplar ve refah problemleri, hastalığın kontrolüne yönelik alternatif yaklaşımların geliştirilmesini gerekli kılmıştır. Bu kapsamda, 1980'li yıllarda mastitisin çevresel patojenlerine karşı mücadele amacıyla aşı geliştirme çalışmaları yürütülmüştür. Bu çalışmalar, *Escherichia coli* J5 mutantına dayandırılmış olup, RE-17 mutanını da kullanılmıştır (Wilson ve González, 2003). Bu kapsamda geliştirilen ticari aşılara; Pfizer Animal Health'e ait Upjohn J-5 Bacterin®, Bayer'in Mastiguard™, Biogenesis-

Bago'nun Rotatec®-J5, Merial'in Imocolibov® ve J-Vac®, IMMVAC'ın Endovac-Dairy® ve Novartis Animal Health'in J-5 Shield™ aşıları örnek verilebilir (Mata ve diğerleri, 2023).

Bunun yanı sıra, *Staphylococcus aureus*'a karşı aşı geliştirme çalışmaları 1990'lı yılların başında başlamıştır (Michie, 2002). Denis ve diğerleri (2009), deneysel DNA rekombinant protein aşıları ile yalnızca rekombinant protein içeren aşıları test etmiştir. Daha yakın dönemde ise Boehringer Ingelheim tarafından geliştirilen Lysigin® SomatoStaph® aşısı da piyasaya sunulmuştur (Mata ve diğerleri, 2023).

HIPRA tarafından geliştirilen Startvac® ve Mastivac® ise günümüzde ticari olarak mevcut olan aşılardır. Bu aşılar, inaktive edilmiş *E. coli* J5 ve *S. aureus* (CP8) SP 140 suşlarını içermekte olup hem *E. coli* hem de *S. aureus* kaynaklı enfeksiyonlara karşı etki göstermektedir (Mata ve diğerleri, 2023).

Mastitis aşılarının geliştirilmesine ilişkin zorluklar, farklı araştırmacılar tarafından tanımlanmış ve tartışılmıştır (Mellenberger, 1977; Pyörälä, 2002; Rainard ve diğerleri, 2021). Bu zorlukların başında, hastalığın patogenezinde rol oynayan çok sayıda farklı mikroorganizma ve suşun bulunması gelmektedir. Ayrıca, süt kanalları ve alveollerde subklinik enfeksiyonlar şeklinde varlığını sürdüren patojenler, humoral antikorlar tarafından etkili bir şekilde hedef alınamamaktadır. Mastitis aşılara yönelik birçok deneme gerçekleştirilmiş olmasına rağmen, etkinlikleri konusunda ciddi şüpheler bulunmaktadır (Leitner ve diğerleri, 2003). Bugüne kadar farklı çalışmaların sonuçları çelişkili olup, bazı araştırmalar aşılamaı desteklerken (Gorden ve diğerleri, 2018), bazıları ise desteklememektedir (Tashakkori ve diğerleri, 2019).

Mevcut mastitis aşı çalışmalarının büyük bölümü klinik mastitis insidansı, SCC, süt verimi, enfeksiyon süresi ve antikor yanıtları gibi klasik parametreler üzerine odaklanmıştır. Buna karşın, aşılama uygulamalarının süt mikrobiyal topluluğu üzerindeki olası etkileri sınırlı sayıda çalışma ile değerlendirilmiştir. Bu nedenle, mastitis aşılamaının süt mikrobiyomu üzerindeki etkisinin 16S rRNA gen dizileme temelli yaklaşımlarla incelenmesi, literatürdeki önemli bir boşluğu hedeflemektedir.

2.4. Mastitis Aşılarının Sınıflandırılması

Mastitisin çok etkenli doğası, koruyucu stratejiler arasında aşılama çalışmalarını özellikle önemli kılmaktadır. Bugüne kadar geliştirilen mastitis aşıları çoğunlukla *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* ve *Escherichia coli* gibi başlıca etkenleri

hedeflemiş; tam hücreli, inaktive, rekombinant veya alt birim esaslı formülasyonlar şeklinde tasarlanmıştır (Ashraf ve Imran, 2020; Ismail, 2017). Özellikle *E. coli* için J5 çekirdek antijenine dayalı preparatlar ve *S. aureus* için kapsüler polisakkaritler, yüzey proteinleri ve toksin temelli aşılar öne çıkmaktadır (Ismail, 2017).

Bununla birlikte mastitis aşılarının geliştirilmesi, etkenlerin suş çeşitliliği, patojenlerin meme dokusunda subklinik biçimde kalıcılık gösterebilmesi ve oluşturulan bağışıklık yanıtının her zaman yeterli koruma üretmemesi nedeniyle güçtür. Bu nedenle ticari, herd-spesifik ve deneysel aşılara ilişkin sonuçlar çoğu zaman sınırlı ya da çelişkilidir (Côté-Gravel ve Malouin, 2019; Ismail, 2017).

2.4.1. Ticari Aşılar

Ticari aşılar içinde en fazla incelenen preparatlardan biri olan Startvac, farklı işletme ve deneysel modellerde değişken sonuçlar vermiştir. *E. coli* J5 ile *S. aureus* SP140 içeren bu polivalan aşının aynı sürüde herd-spesifik bir aşı ile karşılaştırıldığı kontrollü saha denemesinde, *S. aureus* mastitis prevalansında azalma bildirilmiş; ancak klinik mastitis insidansı ve süresi üzerinde belirgin bir avantaj gösterilememiştir (Freick ve diğerleri, 2016).

Birleşik Krallık saha koşullarında yapılan başka bir çalışmada, klinik ve subklinik mastitis insidansı ile prevalansında anlamlı farklılık saptanmazken, klinik mastitis şiddetinde azalma ve süt verimi ile süt kuru maddesinde artış bildirilmiştir (Bradley ve diğerleri, 2015). Buna karşılık İsveç'te iki büyük sürüde yürütülen çalışmada, meme sağlığı, süt verimi ve yaşama gücü bakımından aşılama lehine anlamlı bir fark bulunmamıştır (Landin ve diğerleri, 2015).

Schukken ve diğerleri (2014), Startvac® uygulamasıyla *S. aureus* ve koagülaz negatif stafilokoklara bağlı yeni mastitis vakalarının insidansında orta düzeyde azalma ve enfeksiyon süresinde kısalma göstermiştir. Deneysel challenge modelinde ise aşılanan hayvanlarda daha düşük SCC, daha düşük polimorfonükleer hücre sayısı, daha az süt verimi kaybı ve daha yüksek *S. aureus* ile J5'e özgü serum IgG düzeyleri saptanmıştır (Piepers ve diğerleri, 2016).

Diğer ticari yaklaşımlarda da benzer heterojenlik görülmektedir. Middleton ve diğerleri (2009) stafilokokal bakterin aşısında yeni vaka ya da iyileşme oranları bakımından anlamlı fark bildirmemiş; buna karşılık Wilson ve diğerleri (2009), J5 aşılı ineklerde IgG1 ve IgG2

düzeylerinin arttığını ve sürüden çıkarılma olasılığının azaldığını göstermiştir. Ayrıca *S. aureus*'a karşı geliştirilen ticari bir aşının antikor yanıtını sürdürebildiği ve SCC ile süt verimi üzerinde olumlu etkiler sağlayabildiği de bildirilmiştir (Leitner ve diğerleri, 2003).

2.4.2. Sürüye Özgü Otovaksinler

Sürüye özgü otovaksinler, özellikle belirli sürülerde baskın olan *S. aureus* suşlarına karşı daha hedefli bir koruma sağlama amacıyla kullanılmaktadır. Freick ve diğerleri (2016), BestVac® adı verilen herd-spesifik aşının *S. aureus* mastitis prevalansını ticari aşıya benzer biçimde azaltabildiğini göstermiştir.

Czernomysy-Furowicz ve diğerleri (2014), herd-spesifik bir otovaksin tek başına ya da intramammary sefuroksim ile kombine kullanımını incelemiş; özellikle kombinasyon yaklaşımının yüksek subklinik mastitis oranına sahip bir sürüde *S. aureus* enfeksiyonlarının eliminasyonunda etkili olduğunu ve aşılanan hayvanlarda en az iki yıl klinik mastitis görülmediğini bildirmiştir. Benzer şekilde Slobodanka ve diğerleri (2008), herd-spesifik içerikte hazırlanmış bir preparatın hem subklinik hem de klinik mastitis oranlarını azaltabildiğini göstermiştir. Bu bulgular, herd-spesifik otovaksinlerin özellikle sürüde baskın dolaşan suşların iyi tanımlandığı durumlarda daha hedefli bir kontrol seçeneği oluşturabileceğini düşündürmektedir (Slobodanka ve diğerleri, 2008).

2.4.3. Deneysel ve Yeni Nesil Aşılar

Deneysel ve yeni nesil aşılar, mastitis kontrolünde daha güçlü ve daha seçici bağışıklık yanıtları oluşturma hedefiyle geliştirilmektedir. Rekombinant *S. aureus* enterotoksin tip C mutantını içeren MastaVac® ile yapılan deneysel çalışmada, aşıları ineklerde spesifik antikor oluşumu, daha düşük SCC ve sütte *S. aureus* izolasyonunun engellenmesi bildirilmiştir (Chang ve diğerleri, 2008).

Biyofilm ilişkili bakterin esaslı bir aşıda serum ve süt antikor titrelerinde artış ile süt içindeki *S. aureus* sayısında azalma gözlenmiş; ancak klinik bulguların şiddetinde anlamlı fark saptanmamıştır (Prenafeta ve diğerleri, 2010). *S. aureus* kapsüller polisakkarit tip 5, tip 8 ve tip

336'yı içeren trivalan preparat ise serum antikor düzeylerini artırmış, CD4⁺ ve CD8⁺ lenfosit oranlarını yükseltmiş ve nötrofillerin fagositoz fonksiyonlarında iyileşme sağlamıştır (Lee ve diğerleri, 2005).

2.5. Aşıların Süt Mikrobiyomu Üzerine Etkileri

Mastitis aşıları üzerine yürütülen çalışmaların büyük bölümü; klinik mastitis insidansı, enfeksiyon süresi, yeni enfeksiyon gelişimi, somatik hücre sayısı (SCC), süt verimi, sürüden çıkarma oranı ve spesifik antikor yanıtları gibi klasik klinik ve immünolojik parametreler üzerine yoğunlaşmıştır (Bradley ve diğerleri, 2015; Freick ve diğerleri, 2016; Landin ve diğerleri, 2015; Middleton ve diğerleri, 2009; Piepers ve diğerleri, 2016; Schukken ve diğerleri, 2014; Wilson ve diğerleri, 2009). Bununla birlikte son yıllarda yapılan çalışmalar, mastitisin yalnızca spesifik bir patojen enfeksiyonu olarak değerlendirilemeyeceğini, aynı zamanda süt mikrobiyotasında disbiyotik değişimlere yol açan kompleks bir süreç olduğunu göstermektedir. Oluşan bu mikrobiyal değişimlerin; enfeksiyon etkeni, hastalığın evresi, çevresel koşullar, çiftlik yönetimi ve konağa ait faktörlerden etkilenebildiği bildirilmektedir (Pang ve diğerleri, 2018; Secchi ve diğerleri, 2025; Urrutia-Angulo ve diğerleri, 2024; Yang ve diğerleri, 2025).

Bu durum, mastitis patogenezinin yalnızca patojen varlığı ile açıklanamayacağını ve süt mikrobiyal topluluğunun oldukça dinamik bir ekolojik yapı oluşturduğunu düşündürmektedir. Dolayısıyla aşılama ile sağlanan immünomodülatör etkinin, sadece hedef mikroorganizmanın baskılanması ile sınırlı kalmayıp süt mikrobiyotasının genel kompozisyonunu da etkileyebileceği öngörülmektedir. Aşılama sonrasında bildirilen düşük SCC düzeyleri, inflamatuvar hücre yükündeki azalma, enfeksiyon süresinin kısalması ve artmış özgül antikor yanıtları gibi bulgular, süt içerisindeki mikrobiyal dengenin de değişebileceğine işaret etmektedir.

Bununla birlikte, mastitis aşılarının süt mikrobiyomu üzerindeki etkisinin doğrudan sekans temelli mikrobiyom analizleri ile değerlendirildiği çalışma sayısı halen oldukça sınırlıdır. Bu nedenle mastitis aşılmasının süt mikrobiyal topluluğu üzerindeki potansiyel etkilerinin ortaya konulması, mevcut literatürde halen yeterince açıklığa kavuşmamış önemli araştırma alanlarından biri olarak değerlendirilmektedir (Derakhshani ve diğerleri, 2018; Ruegg, 2022).

Mastitis aşılarının etkinliği üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde, elde edilen sonuçların oldukça değişken olduğu ve bu değişkenliğin birden fazla faktör tarafından şekillendirildiği görülmektedir. Bu kapsamda, Mata ve diğerleri (2023) tarafından gerçekleştirilen meta-analizde, aşı etkinliğini etkileyen temel değişkenlerin “yayın yılı”, “aşı üretim yöntemi”, “aşılama zamanı” ve “denemede kullanılan hayvan grubu” olduğu ortaya konmuştur. Aynı çalışmada kullanılan karma etkiler modelinin heterojenlik göstermemesi ($I^2 = \%0$), bu faktörlerin gözlenen varyasyonun büyük bir kısmını açıkladığını göstermektedir. Meta-analiz bulguları, aşı etkinliğinin zaman içerisinde azalma eğilimi gösterebildiğini ortaya koymaktadır. Yayın yılına bağlı olarak yapılan analizlerde, daha güncel çalışmaların aşı etkinliğini daha düşük bildirdiği görülmüştür. Bu durumun, mastitis etkeni patojenlerin zamanla değişim göstermesi ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir (Bradley ve diğerleri, 2015). Bunun yanı sıra, aşı üretim yönteminin de önemli bir belirleyici olduğu; sürüye özgü olarak geliştirilen aşılamanın belirli düzeyde etkinlik gösterebildiği, ticari aşılamanın ise daha sınırlı sonuçlar ortaya koyabildiği bildirilmiştir (Mata ve diğerleri, 2023).

Aşılama zamanının da aşı yanıtı üzerinde etkili olduğu belirtilmektedir. Doğum öncesi uygulamaların belirli bir koruyuculuk sağlayabildiği, buna karşılık doğum sonrası uygulamaların daha sınırlı bir etki ile ilişkilendirildiği ifade edilmektedir (Mata ve diğerleri, 2023). Yüksek verimli süt ineklerinde periparturient dönemde meydana gelen fizyolojik stres ve immün baskılanma durumunun mastitis duyarlılığı ile ilişkili olduğu da rapor edilmiştir (Burvenich ve diğerleri, 2000). Ayrıca, aşılama sonrası antikor gelişiminin yaklaşık dört hafta sürdüğü (Pyörälä, 2002) ve doğum öncesi yapılan aşılama ve hatırlatma dozlarının kolostrumdaki IgG konsantrasyonunu artırdığı bildirilmiştir (Menichetti ve diğerleri, 2021).

Bununla birlikte, farklı hayvan gruplarında (düve, multiparous veya karma sürüler) aşı etkinliğinin belirgin şekilde ayrılmadığı da rapor edilmiştir (Mata ve diğerleri, 2023). Bu durum, çalışmalar arasındaki metodolojik farklılıklar ve etkileşim analizlerinin sınırlı olması ile ilişkilendirilmektedir. Ayrıca, multiparous ineklerde yaşla birlikte somatik hücre sayısının arttığı ve enfeksiyon süresinin uzadığı da literatürde yer almaktadır (Rainard ve diğerleri, 2018).

Mastitis, çok sayıda mikroorganizmanın etkileşimi ile şekillenen kompleks bir hastalık olup, hastalığın ortaya çıkışında mikrobiyal ekosistem dinamikleri önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle mastitis kontrolüne yönelik geliştirilen aşılamanın temel hedefi, belirli patojenlerin baskılanmasının ötesinde, hastalık insidansının genel olarak azaltılmasıdır. Ancak saha çalışmalarında elde edilen bulgular, aşılama sonrasında her zaman toplam mastitis insidansında mutlak bir azalma görülmediğini, bazı durumlarda patojen spektrumunda değişim meydana

gelebileceğini göstermektedir (Bradley ve diğerleri, 2015). Bradley ve diğerleri (2015), aşının belirli fırsatçı patojenlere karşı koruyucu etki gösterirken, duyarlı hayvanlarda farklı patojenlerin enfeksiyon oluşturabileceğini ve bunun “yer değiştirme (substitution)” etkisi olarak değerlendirilebileceğini bildirmiştir. Bu durum, mastitisin etiolojisinde mikrobiyal rekabet ve ekolojik denge kavramlarının önemini ortaya koymaktadır. Aynı çalışmada klinik mastitis etiolojisinin oldukça heterojen olduğu ve 40’tan fazla bakteri cinsinin tanımlandığı rapor edilmiştir. Bu yüksek çeşitlilik, mastitisin yalnızca tek bir patojene bağlı bir hastalık olmadığını, aksine meme bezinde yer alan mikrobiyal toplulukların dengesindeki değişimlerle ilişkili olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla aşılama ile belirli patojenlerin baskılanması, meme bezindeki mikrobiyal kompozisyonu etkileyerek süt mikrobiyomunda değişimlere yol açabilir (Bradley ve diğerleri, 2015). Bununla birlikte, aşının saha koşullarındaki etkinliğinin yalnızca doğrudan koruyucu etkilerle sınırlı olmadığı, aynı zamanda dolaylı etkileri de içerebileceği belirtilmektedir. Ancak çevresel mastitis etkenlerinin baskın olduğu sürülerde bu dolaylı etkinin sınırlı kalabileceği ifade edilmektedir (Bradley ve diğerleri, 2015).

Mastitis, yalnızca belirli patojenlerin varlığı ile açıklanamayacak, memedeki mikrobiyal toplulukların dengesinin bozulmasıyla ilişkili kompleks bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (Schukken ve diğerleri, 2014). Süt mikrobiyomu üzerine yapılan yeni nesil çalışmalar, sağlıklı meme dokusunda dahi çeşitli bakteriyel toplulukların bulunduğunu ve bu toplulukların dengesi bozulduğunda mastitis gelişiminin kolaylaştığını ortaya koymaktadır (Derakhshani ve diğerleri, 2018; Oikonomou ve diğerleri, 2014). Bu bağlamda, mastitis kontrolüne yönelik geliştirilen aşılamanın etkisi yalnızca hedef patojenlerin baskılanması ile sınırlı olmayıp, aynı zamanda süt mikrobiyomunun kompozisyonu ve dinamikleri üzerinde de belirleyici rol oynayabilmektedir (Schukken ve diğerleri, 2014).

Stafilokokal aşılamanın saha koşullarındaki etkinliği incelendiğinde, aşılama sonrası toplam yeni enfeksiyon insidansında her zaman belirgin bir azalma görülmediği, ancak enfeksiyonun yayılım dinamiklerinde önemli değişiklikler meydana geldiği bildirilmektedir (Schukken ve diğerleri, 2014). Özellikle popülasyon temelli modelleme çalışmalarında, aşılama ile *Staphylococcus aureus* ve koagülaz-negatif stafilokoklara (CoNS) bağlı intramammary enfeksiyonlarda temel üreme sayısının (R_0) anlamlı şekilde azaldığı gösterilmiştir (Schukken ve diğerleri, 2014). Bu durum, aşının mikrobiyal topluluk içerisinde patojenlerin yayılım kapasitesini sınırlayarak dolaylı bir dengeleyici etki oluşturduğunu düşündürmektedir (Halloran ve diğerleri, 1997). Aşılama ile R_0 değerinin 1’in altına düşmesi, enfeksiyonun popülasyon düzeyinde zamanla sönmülenebileceğini göstermektedir (Schukken ve diğerleri,

2014). Ancak çevresel patojen kaynaklarının varlığı nedeniyle enfeksiyonun tamamen ortadan kaldırılması çoğu zaman mümkün olmamakta ve bu durum süt mikrobiyomunun dinamik ve sürekli değişen yapısını yansıtmaktadır (Barlow ve diğerleri, 2013; Reksen ve diğerleri, 2012).

Aşının mikrobiyal denge üzerindeki en önemli dolaylı etkilerinden biri enfeksiyon süresini kısaltmasıdır. Aşılı hayvanlarda hem *Staphylococcus aureus* hem de CoNS enfeksiyonlarının daha kısa sürdüğü ve kür oranlarının arttığı gösterilmiştir (Schukken ve diğerleri, 2014). Enfeksiyon süresinin azalması, patojen saçılımını sınırlandırarak sürü genelinde mikrobiyal maruziyeti düşürmekte ve bu durum mikrobiyom kompozisyonunun yeniden şekillenmesine katkı sağlamaktadır (Halloran ve diğerleri, 1997). Bununla birlikte, aşılama her zaman yeni enfeksiyon oluşumunu doğrudan azaltmamaktadır. Doğrudan etkiyi değerlendiren analizlerde aşının yeni enfeksiyon insidansı üzerinde anlamlı bir etkisi bulunmazken, maruziyet düzeyinin dikkate alındığı modellemelerde enfeksiyon dinamiklerinin anlamlı şekilde değiştiği ortaya konmuştur (Schukken ve diğerleri, 2014).

Süt mikrobiyomu üzerine yapılan çalışmalar, mastitis sırasında yalnızca patojenlerin artmadığını, aynı zamanda kommensal bakterilerin azalması ve mikrobiyal çeşitliliğin düşmesi ile karakterize bir disbiyoz geliştiğini ortaya koymaktadır (Derakhshani ve diğerleri, 2018; Oikonomou ve diğerleri, 2014). Bu bağlamda aşılama, doğrudan mikrobiyom kompozisyonunu değiştirmese bile, patojen baskısını ve enfeksiyon süresini azaltarak dolaylı olarak mikrobiyal dengenin korunmasına katkı sağlayabilir (Schukken ve diğerleri, 2014).

Aşı etkinliğinin hayvan yaşı ve laktasyon sayısına bağlı olarak değişkenlik göstermesi de mikrobiyal dinamikler açısından önemlidir. Birinci laktasyondaki hayvanlarda bulaşın daha belirgin şekilde azalması, genç hayvanların mikrobiyomunun daha stabil ve müdahalelere daha duyarlı olabileceğini düşündürmektedir (Schukken ve diğerleri, 2014). Buna karşılık, ileri laktasyonlarda kronik enfeksiyonların daha dirençli olması, mikrobiyal topluluğun daha yerleşik ve stabil hale gelmesi ile açıklanmaktadır (Barkema ve diğerleri, 2006).

Süt mikrobiyomunun şekillenmesinde aşılama dışında birçok faktör rol oynamaktadır. Sağım hijyeni, sürü yönetimi, patojen suş farklılıkları ve çevresel koşullar mikrobiyal topluluk yapısını doğrudan etkileyen önemli parametrelerdir (Lam ve diğerleri, 1997; Barkema ve diğerleri, 2006). Bu nedenle aşının mikrobiyom üzerindeki etkisi, işletmeden işletmeye farklılık gösterebilmektedir (Schukken ve diğerleri, 2014).

Sonuç olarak, mastitis aşılarının etkisi yalnızca hedef patojenlerin baskılanması ile sınırlı olmayıp, enfeksiyon süresi, bulaş dinamikleri ve sürü içi mikrobiyal maruziyet gibi faktörler

üzerinden süt mikrobiyomunu dolaylı olarak şekillendirmektedir. Bu nedenle süt mikrobiyomunun değerlendirilmesinde yalnızca patojen varlığı değil, aynı zamanda mikrobiyal topluluk dinamiklerinin bütüncül olarak ele alınması gerekmektedir (Derakhshani ve diğerleri, 2018).

Stafilokokal mastitise karşı geliştirilen aşuların etkinliği incelendiğinde, aşılama uygulamalarının her zaman yeni intramammary enfeksiyonların (IMI) oluşumunu engellemede yeterli koruma sağlayamadığı bildirilmektedir (Middleton ve diğerleri, 2009). Özellikle laktasyon döneminde uygulanan iki dozluk aşılama protokolünün, hem *Staphylococcus aureus* hem de koagülaz-negatif stafilokoklara (CoNS) bağlı yeni enfeksiyonların görülme sıklığını belirgin düzeyde azaltmadığı rapor edilmiştir (Middleton ve diğerleri, 2009).

Aşılama uygulamalarının süt sağlığı parametreleri üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde, somatik hücre sayısı (SCC) bakımından aşılı ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılık oluşmadığı görülmüştür. Benzer şekilde süt içerisindeki immün yanıt incelendiğinde; IgA, IgG1, IgG2 ve IgM düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir değişim saptanmamıştır (Middleton ve diğerleri, 2009). Bu sonuçlar, aşılama sonrasında süt içerisinde güçlü ve ölçülebilir bir spesifik immünoglobulin yanıtının her zaman oluşmayabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte bazı çalışmalarda toplam anti-*Staphylococcus aureus* immünoglobulin düzeylerinde artış bildirildiği, ancak bu yanıtın tüm immünoglobulin alt tiplerinde benzer şekilde ortaya çıkmadığı ifade edilmektedir (Middleton ve diğerleri, 2009).

Süt içerisinde yeterli düzeyde immünoglobulin yanıtının oluşmaması, meme bezinde etkin opsonizan antikor üretiminin sınırlı kalması ile ilişkili olabilir. Bu durumun fagositik aktiviteyi ve bakteriyel eliminasyonu azaltarak enfeksiyonun devamlılığına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir (Middleton ve diğerleri, 2009). Ayrıca aşının koruyucu etkinliğinin kullanılan aşılama programına bağlı olarak değişebileceği bildirilmektedir. Özellikle doğum öncesi dönemde başlatılan ve tekrar dozlarla desteklenen aşılama protokollerinin stafilokokal mastitis kontrolünde daha başarılı sonuçlar verebildiği belirtilmektedir (Middleton ve diğerleri, 2009). Bu bulgular, bağışıklık yanıtının zamanlaması ve şiddetinin enfeksiyon kontrolünde önemli rol oynadığını göstermektedir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, stafilokokal mastitis aşularının etkisinin doğrudan patojen eliminasyonundan ziyade enfeksiyon şiddetinin sınırlandırılması ve immün yanıtın modülasyonu şeklinde ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bu nedenle aşılama uygulamalarının

mastitis kontrolünde tek başına yeterli olmadığı, hijyen uygulamaları, sürü yönetimi ve düzenli sağlık kontrolleri ile birlikte yürütülmesi gereken tamamlayıcı bir yaklaşım olduğu kabul edilmektedir (Middleton ve diğerleri, 2009).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Örnekler

Bu çalışmada, 3–5 yaş aralığında ve 1. ile 4. laktasyon dönemleri arasında bulunan toplam 12 baş sığırdan elde edilen süt örnekleri kullanılmıştır. Çalışma, aynı hayvanlar üzerinde yürütülen zamana bağlı (öncesi–sonrası) karşılaştırmalı bir deneysel tasarım şeklinde planlanmıştır.

İlk örnekleme, 27.10.2022 tarihinde gerçekleştirilmiş olup bu aşamada elde edilen 12 süt numunesi kontrol grubunu temsil etmektedir. Bu hayvanların tamamının, ticari bir mastitis aşısı ile en son aşılama zamanının örnekleme tarihinden yaklaşık 11 ay önce olduğu belirlenmiştir. Hayvanların yaşlarının 3 ile 5 arasında değiştiği ve 1. ile 4. laktasyon dönemlerinde buldukları kaydedilmiştir. Ayrıca iki hayvanda klinik mastitis öyküsü bulunduğu tespit edilmiştir.

İkinci örnekleme ise aynı hayvanlardan, mastitis aşılama programı sonrasında gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda hayvanlara birinci doz ticari aşı 28.10.2022 tarihinde, ikinci doz ticari aşı ise 18.11.2022 tarihinde uygulanmıştır. Aşılama sonrası örnekleme, ikinci doz uygulamasını takiben 40. günde (29.12.2022) yapılmış ve yeniden 12 süt numunesi elde edilmiştir. Bu grup deney grubunu oluşturmaktadır (Tablo 1).

Çalışma başlangıçta aynı hayvanlardan aşılama öncesi ve sonrası örnek alınmasına dayalı öncesi–sonrası bir tasarım olarak planlanmıştır. Ancak moleküler analiz aşamasında aşılama öncesi DNA örneklerinin ikili havuzlanması nedeniyle analizler birebir hayvan eşleştirmesinden ziyade, havuzlanmış bazal kontrol profilleri ile aşı sonrası bireysel örneklerin karşılaştırılması şeklinde yürütülmüştür. Araştırmamızdaki toplam örnek sayısı 6 adet bazal kontrol grubu ve 12 adet mastitis aşısı uygulanmış hayvanlardan elde edilen süt örneği olmak üzere 18 olarak belirlenmiştir.

Tablo 1. Aşı uygulanan hayvanlara ait genel bilgiler ve örnekleme takvimi.

Sıra No	Laktasyon Dönemi	Mastitis Durumu	Önceki Aşılama Durumu	1. Doz Aşı Tarihi	2. Doz Aşı Tarihi	2. Doz Sonrası Örnekleme (40. gün)
1	2. Laktasyon	Yok	Eylül 2022	28.10.2022	18.11.2022	29.12.2022
2	3. Laktasyon	Yok	Eylül 2022	28.10.2022	18.11.2022	29.12.2022
3	1. Laktasyon	Yok	Eylül 2022	28.10.2022	18.11.2022	29.12.2022
4	1. Laktasyon	Yok	Eylül 2022	28.10.2022	18.11.2022	29.12.2022
5	4. Laktasyon	Yok	Eylül 2022	28.10.2022	18.11.2022	29.12.2022
6	4. Laktasyon	Var	Eylül 2022	28.10.2022	18.11.2022	29.12.2022
7	3. Laktasyon	Yok	Eylül 2022	28.10.2022	18.11.2022	29.12.2022
8	2. Laktasyon	Yok	Eylül 2022	28.10.2022	18.11.2022	29.12.2022
9	4. Laktasyon	Var	Eylül 2022	28.10.2022	18.11.2022	29.12.2022
10	4. Laktasyon	Yok	Eylül 2022	28.10.2022	18.11.2022	29.12.2022
11	2. Laktasyon	Yok	Eylül 2022	28.10.2022	18.11.2022	29.12.2022
12	4. Laktasyon	Yok	Eylül 2022	28.10.2022	18.11.2022	29.12.2022

3.1.2. Cihazlar

Çalışma kapsamında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan spektrofotometreler [Nanodrop Maestro® (Maestrogen®); Qubit 2.0 Fluorometer® (Thermo Fisher Scientific®)], termal kuru blok ısıtıcı (HB120-S, DragonLab®), santrifüj (Minispin 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 Technologies dizileme platformu (Nanopore MinION), otoklav (NC 90M, Nüve®), hassas terazi (Basiclite, Sartorius®) ve vorteks (MX-S, DragonLab®) kullanıldı.

3.1.3. DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için aşılama öncesi ve aşılama sonrası elde edilen 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). 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 µl 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 µl 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 µl 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 (Tablo 2). DNA miktarı 10 ng/μl'den düşük olan örnekler çalışmaya dahil edilmedi. Seçilen örneklerin DNA miktarları kayıt altına alınarak patotip tayinlerinden sonra gruplandırılarak mikrobiyom analizinde kullanıma kadar -20°C'de saklandı.

Tablo 2. Seçilen örneklerin DNA ölçümleri.

Örnek Numarası	DNA ölçümleri(ng/μl)
E13	10,20
E14	10,90
E15	12,35
E16	10,30
E17	10,25
E18	10,15
E19	13,20
E20	18,00
E21	10,90
E22	12,30
E23	18,00
E24	10,10
K1	25,40
K2	13,50
K3	14,60
K4	15,30
K5	21,50

3.1.4. Mikrobiyom Analizi

Örneklerden elde edilen DNA'lar, 16S rRNA gen bölgesine yönelik dizileme analizleri için hazırlanmıştır. DNA konsantrasyonları Qubit 2.0 Fluorometer ile ölçülmüş ve 16S Barcoding Kit (SQK- 16S114.24) protokolüne uygun şekilde normalize edilmiştir.

3.1.4.1 PCR Amplifikasyonu

Metagenom analizleri kapsamında, kontrol ve aşı uygulaması sonrası elde edilen süt örneklerinden izole edilen DNA'lar ayrı gruplar halinde değerlendirilmiştir. Toplam 18 örnekten elde edilen DNA'lar barkodlama işlemi öncesinde uygun şekilde hazırlanmış ve her bir örneğe özgü barkod atanabilmesi amacıyla PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda çalışma, kontrol grubu (aşı öncesi) ve aşı uygulaması yapılmış grup olmak üzere iki ana grup üzerinden analiz edilmiştir.

Amplifikasyon kütüphanelerinin hazırlanmasında, 16S rRNA geninin V1–V9 bölgelerini kapsayan yaklaşık 1500 bp uzunluğundaki hedef bölge için daha önce tanımlanmış primer çiftleri kullanılmıştır (Klindworth ve diğerleri, 2013; Zeng ve diğerleri, 2013). Kütüphane oluşturma aşamasında kullanılan hedefe özgü primerlerin 5' uçlarına Oxford Nanopore Technologies'e ait barkod DNA dizileri eklenmiştir.

16S rRNA genine yönelik primer-konnekör dizileri ileri primer için 5'-TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC-AGRGTTTGATYHTGGCTCAG-3', geri primer için ise 5'-ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC-TACCTTGTTAYGACTT-3' olarak kullanılmıştır. İlk PCR reaksiyonu, Proof Reading DNA Polymerase 2× Reaction Mix ile her bir primerden 200 nM olacak şekilde hazırlanmıştır. Amplifikasyon sonrası elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiş ve yaklaşık 1450 bp büyüklüğündeki bant doğrulanmıştır.

Barkod primerlerinin DNA uç bölgelerine bağlanabilmesi amacıyla gerçekleştirilen ikinci PCR işlemi sonrasında DNA konsantrasyon ölçümleri yapılmıştır. Kütüphane hazırlığı için örnekler, üretici protokolünde önerilen DNA girdi miktarına uygun olacak şekilde normalize edilmiştir. DNA konsantrasyonu 10 ng/µL'nin altında olan örnekler çalışmaya dahil edilmemiştir. Süt örneklerinden izole edilen DNA'ların miktar tayini Qubit 2.0 fluorometer cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiş, ardından 16S Barcoding Kit 24 V14 (SQK-16S114.24)

protokolüne uygun şekilde DNA yoğunlukları standardize edilerek barkodlama PCR işlemi uygulanmıştır.

Barkodlama PCR işlemi aşağıdaki reaksiyon karışımı ile gerçekleştirilmiştir (Tablo 3-4).

Tablo 3. PCR karışımı oranları.

Bileşen	Hacim
LongAmp Taq 2X Master Mix	25 µl
Barcode Primer	10 µl
ddH ₂ O	5 µl
Kalıp DNA	10 µl
Toplam	50 µl

Tablo 4. Barkod PCR ısı döngü ve süre diyagramı.

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Başlangıç Denatürasyon	1	95°C	1 dk
Denatürasyon		95°C	20 sn
Bağlanma		55°C	30 sn
Uzama	25	65°C	2 dk
Son Uzama	1	65°C	5 dk
Bekletme	1	4°C	∞

PCR amplifikasyonu sonrasında elde edilen ürünler, PCR ürünü pürifikasyon kiti kullanılarak saflaştırılmıştır. Amplikon kütüphanelerinin hazırlanmasında Ligation Sequencing Kit (SQK-LSK109; Oxford Nanopore Technologies) ile Native Barcoding Kit (EXP-NBD104-114; Oxford Nanopore Technologies) protokollerinden yararlanılmıştır.

İlk aşamada, toplam hacmi 60 µL olacak şekilde hazırlanan ve 100–200 fmol DNA içeren örneklerde uç hazırlama, dA kuyruk ekleme ve uç tamir işlemleri uygulanmıştır. Ardından saflaştırma işlemi için 0.5X MagBeads (MobiomX) kiti kullanılmıştır. Hazırlanan DNA uçlarına native barkodların bağlanabilmesi amacıyla reaksiyon karışımı oda sıcaklığında

10 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra numuneler tekrar saflaştırılmış ve spektrofotometrik yöntem ile miktar tayini gerçekleştirilmiştir.

Barkodlanan her numuneden eşit miktarda DNA alınarak tek bir tüpte birleştirilmiş ve toplam hacim 35 µL olacak şekilde hazırlanmıştır. Adaptörlerin barkodlu DNA uçlarına bağlanmasının ardından örnekler yeniden saflaştırılmış ve konsantrasyon ölçümleri yapılmıştır. Hazırlık aşamaları tamamlandıktan sonra yaklaşık 50 fmol kütüphane Spot-On akış hücresine (FLO-MIN106D) yüklenmiştir.

Sekanslama işlemi, Oxford Nanopore Technologies Mk1C™ cihazında MinKNOW™ yazılımı kullanılarak başlatılmıştır. Veri miktarının yeterli seviyeye ulaşması veya maksimum 72 saatlik çalışma süresinin tamamlanmasının ardından sekanslama sonlandırılmış ve elde edilen ham veriler biyoinformatik analizler için kullanılmıştır.

3.1.4.2 Biyoinformatik Analiz

Dizileme işleminin tamamlanmasının ardından fast5 formatında elde edilen ham veriler, Guppy v3.1.5 yazılımı kullanılarak base-calling ve de-multiplexing işlemlerine tabi tutulmuş ve fastq formatına dönüştürülmüştür. Elde edilen dizilerde yer alan barkod ve adaptör sekansları Porechop v0.2.3 yazılımı aracılığıyla uzaklaştırılmıştır. Ayrıca dizilerin her iki ucundan 45 baz kesilerek evrensel primer ve etiket sekansları analizden çıkarılmıştır.

Kalite kontrol ve temizleme aşamalarını takiben, 1350–1550 bp uzunluk aralığında bulunan okumalar seçilmiş, bu aralığın dışında kalan diziler analiz dışı bırakılmıştır. Filtrelenmiş yüksek kaliteli okumalar, mothur v1.39.5 yazılımı kullanılarak özelleştirilmiş bir analiz akışı çerçevesinde değerlendirilmiştir.

Analiz sürecinde sekanslar öncelikle kimerik yapılardan arındırılmış, ardından hizalama işlemi gerçekleştirilmiş ve sekanslar arası genetik uzaklıklar benzerlik matrisi aracılığıyla hesaplanmıştır. %99 benzerlik eşiği temel alınarak sekanslar kümelendirilmiş ve bu kümeler operasyonel taksonomik birimler (OTU) olarak tanımlanmıştır.

Elde edilen OTU'lar, RDP 16S rRNA veri tabanı kullanılarak taksonomik olarak sınıflandırılmıştır. Aynı taksonomik gruba ait OTU'lar birleştirilerek örnekler arası karşılaştırmalar yapılmış ve istatistiksel değerlendirmeler gerçekleştirilmiştir. OTU'ların temsil ettiği mikroorganizmalar, bunların bolluk düzeyleri ve örneklerle ait metadata verileri dikkate

alınarak grafiksel görselleştirmeler ve istatistiksel analizler Minitab ve R yazılımları kullanılarak oluşturulmuştur.

Çekirdek mikrobiyotanın belirlenmesi amacıyla, tüm örneklerde %1'in üzerinde relatif bolluk gösteren taksonlar değerlendirmeye alınmıştır (O'Donnell ve diğerleri, 2017).

Gruplar arası karşılaştırmalarda okuma derinliği farklılıklarının etkisini azaltmak amacıyla analizler normalize edilmiş OTU tablosu üzerinden yürütülmüştür. Alfa ve beta çeşitlilik analizleri için kullanılan indeksler, istatistiksel testler ve anlamlılık düzeyi ilgili analiz başlıklarında belirtilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Mikrobiyom Bulguları

Bu çalışmada elde edilen süt örneklerinden izole edilen bakteriyel DNA'lar kullanılarak mikrobiyom analizleri gerçekleştirilmiş ve örneklerin mikrobiyal çeşitlilik ve kompozisyonları karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmanın başlangıç tasarımında, aşıli gruba ait her bir örneğin kendi karşılık gelen aşılama öncesi kontrol/bazal grup örneği ile birebir karşılaştırılması planlanmıştır. Ancak moleküler analiz aşamasında kontrol grubuna ait DNA örneklerine havuzlama (pooling) yöntemi uygulanmıştır. Bu kapsamda ardışık sıra ile iki farklı aşılama öncesi kontrol/bazal grup süt örneğinden elde edilen DNA'lar eşit miktarlarda birleştirilerek tek bir kontrol örneği oluşturulmuştur (Tablo 5).

Tablo 5. Örneklerin havuzlama yöntemine göre dağılımları.

Kontrol Grubu	Aşıli Grup
K1	E13
	E14
K2	E15
	E16
K3	E17
	E18
K4	E19
	E20
K5	E21
	E22
K6	E23
	E24

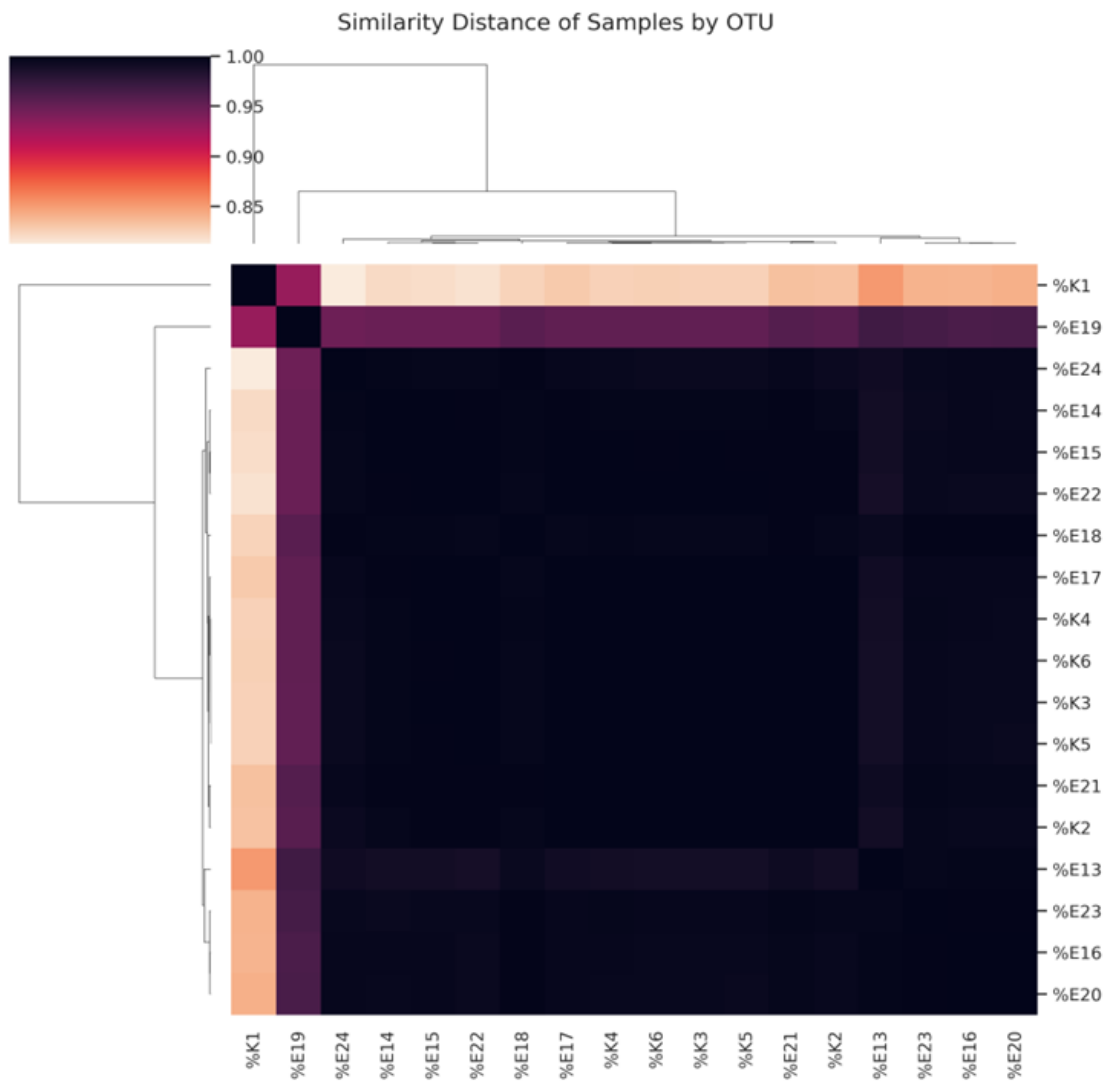
Herbir kontrol gurubundaki veriler birbirini takip eden ikili aşıllı grup örnekleri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Kontrol örneklerinin havuzlanması, aşılama öncesi döneme ait genel bir referans profil oluşturmayı sağlamış; ancak bireysel hayvan düzeyinde eşleştirilmiş karşılaştırma yapılmasını sınırlamıştır. Bu nedenle bulgular grup düzeyinde değerlendirilmiştir. (Tablo 6).

Tablo 6. Mikrobiyom analiz grupları.

Gruplar	Örnek Numarası	DNA ölçümleri (ng/µl)	PCR ürünü ölçümleri (ng/µl)
Kontrol Grubu	K1	25,40	52,20
	K2	13,50	67,80
	K3	14,60	50,50
	K4	15,30	54,50
	K5	21,50	62,60
	K6	18,20	65,30
Aşıllı Grup	E13	10,20	75,80
	E14	10,90	37,20
	E15	12,35	80,00
	E16	10,30	80,80
	E17	10,25	85,60
	E18	10,15	79,20
	E19	13,20	65,60
	E20	18,00	88,40
	E21	10,90	76,80
	E22	12,30	78,40
	E23	18,00	62,40
	E24	10,10	70,60

4.1.1 OTU Temelli Benzerlik Analizi Bulguları

OTU tabanlı analizler sonucunda kontrol grubuna ait 6 örnekten toplam 1.520.384 OTU'ya atanmış okuma sayısı elde edilirken, aşılı gruba ait 12 örnekten toplam 5.759.632 OTU'ya atanmış okuma sayısı elde edilmiştir. Elde edilen OTU verileri doğrultusunda örnekler arasındaki mikrobiyal benzerlikler ısı haritası ve hiyerarşik kümelendirme analizleri ile değerlendirilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. OTU temelli ısı haritası ve dendrogram analizi

OTU temelli analizlerde, hem aşılı hem de kontrol grubu örneklerinde baskın mikrobiyal toplulukların ağırlıklı olarak *Pseudomonadota*, *Bacillota*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostoc* ve

Pseudomonas ilişkili taksonlardan oluştuğu belirlenmiştir. Özellikle aşılı grup örneklerinde *Leuconostoc* ve *Leuconostoc lactis* relatif bolluklarının genel olarak daha yüksek olduğu dikkat çekmiştir. E13, E16, E17, E20, E22 ve E24 örneklerinde *Leuconostoc lactis* relatif abundansının belirgin düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir. Aşılı grup örneklerinin bir kısmında *Leuconostoc* ve *Leuconostoc lactis* ile ilişkili okuma oranlarının kontrol profiline kıyasla daha yüksek olduğu belirlendi.

Isı haritası ve dendrogram analizlerinde örneklerin büyük bölümünün birbirine yakın kümelenme paterni gösterdiği ve genel mikrobiyal topluluk yapısının önemli ölçüde korunduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte bazı örneklerin ana kümelenme yapısından ayrıştığı dikkat çekmiştir. Özellikle K1 örneğinin diğer örneklerden belirgin şekilde farklı konumlandığı görülmüştür. K1 örneğinde *Bacillota* filumunun relatif bolluğunun yüksek düzeyde olduğu (%64,22) belirlenmiş, ayrıca *Clostridia* sınıfına ait bakterilerin relatif abundansının diğer örneklerle göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Buna karşılık K2 örneğinde *Pseudomonas*, *Acinetobacter* ve *Moraxellaceae* ilişkili bakterilerin relatif bolluklarının diğer kontrol örneklerine kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durum, kontrol grubunda örnekler arası mikrobiyal heterojenitenin daha belirgin olduğunu desteklemektedir.

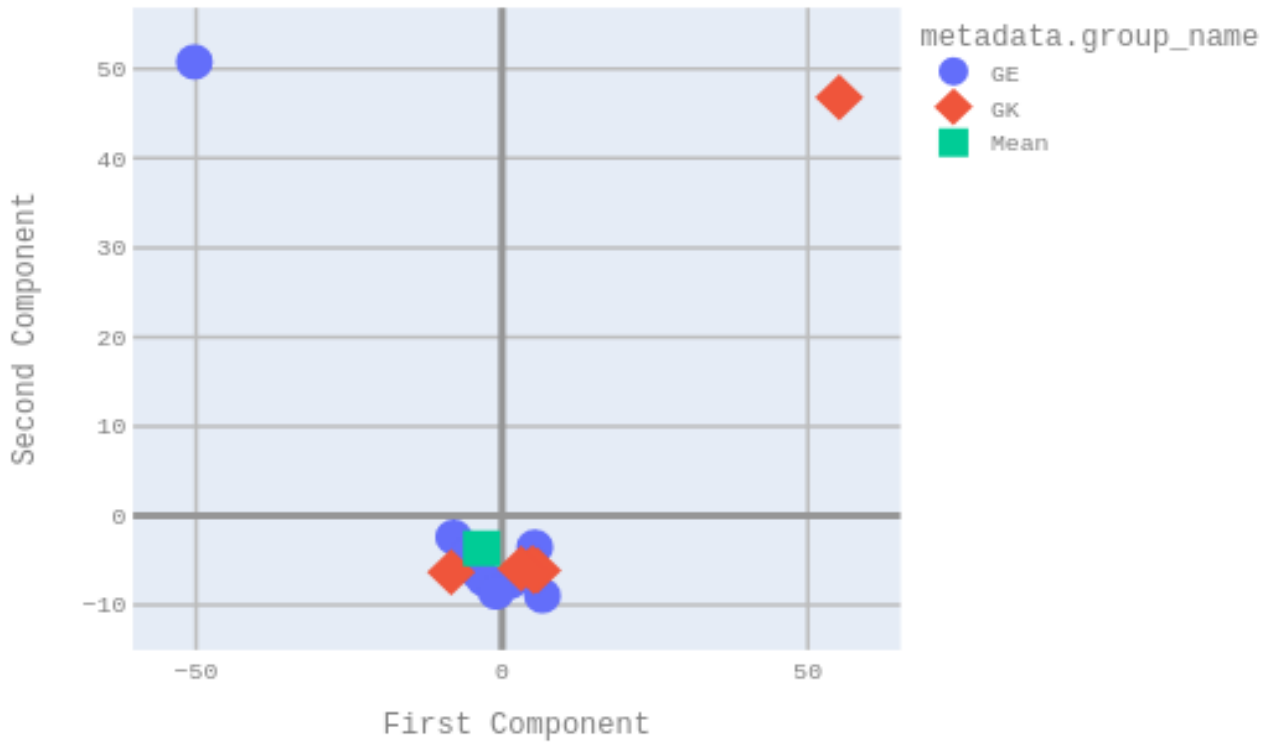
Aşılı grup içerisinde E19 örneğinin diğer örneklerden kısmen ayrıldığı gözlenmiştir. Bu örnekte *Leuconostoc* relatif bolluğunun diğer aşılı örneklere göre düşük seviyede kaldığı, buna karşılık *Clostridia*, *Clostridiaceae* ve bazı çevresel/opportunistik bakteriyel grupların relatif abundansında artış olduğu belirlenmiştir. Ayrıca E19 örneğinde *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* ilişkili taksonların relatif bolluklarının diğer aşılı örneklere göre daha düşük olduğu dikkat çekmiştir. E19 örneğinin klinik mastitis geçmişine sahip olması, gözlenen bu farklı mikrobiyal profil ile ilişkili olabilir.

Örneklerin büyük bölümünde *Pseudomonas*, *Acinetobacter* ve *Leuconostoc* ilişkili taksonların ortak olarak bulunması, süt mikrobiyotasında belirli çekirdek mikrobiyal toplulukların korunduğunu göstermektedir. Bununla birlikte relatif bolluk düzeylerindeki değişimlerin örnekler arasındaki kümelenme yapısını etkileyerek mikrobiyal kompozisyonda farklılaşmalara yol açtığı düşünülmektedir.

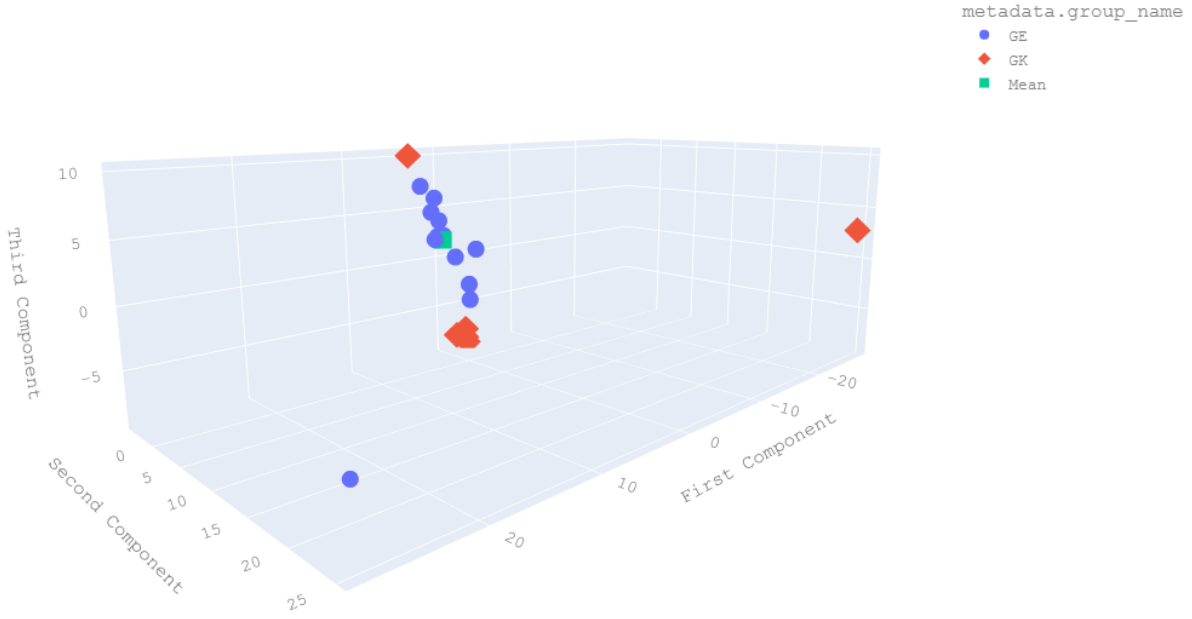
4.1.2 PCA (Principal Component Analysis) Bulgular

Örnekler arasındaki mikrobiyal kompozisyon farklılıklarının ortaya konulabilmesi amacıyla Principal Component Analysis (PCA) uygulanmıştır. Analizler, hem tüm taksonomik veriler dikkate alınarak hem de genus düzeyindeki dağılımlar kullanılarak ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

Tüm taksonomik veriler kullanılarak oluşturulan iki boyutlu PCA grafiğinde, örneklerin büyük kısmının birbirine yakın bölgelerde konumlandığı ve genel mikrobiyal yapı açısından benzer profil sergilediği görülmüştür (Şekil 2). Aşılı grup (GE) ile kontrol grubu (GK) örneklerinin önemli ölçüde aynı dağılım alanı içerisinde yer alması, gruplar arasında tamamen ayrılmış bir mikrobiyal yapı oluşmadığını göstermektedir. Bununla birlikte bazı örneklerin ana kümelenme alanından uzaklaşarak farklı bölgelerde konumlandığı dikkat çekmiştir. Özellikle bazı kontrol örneklerinin pozitif ekseninde daha ayrık dağılım göstermesi, bu örneklerde belirli mikrobiyal taksonların relatif abundansındaki değişimlerle ilişkili olabilir. Benzer şekilde E19 örneğinin de diğer aşılı örneklerden kısmen ayrılması, bu örneğe özgü mikrobiyal kompozisyon farklılığını desteklemektedir (Şekil 3).



Şekil 2. Tüm taksonomik verilere dayalı PCA dağılım grafiği.



Şekil 3. Örneklerin 3 boyutlu PCA analiz grafiği.

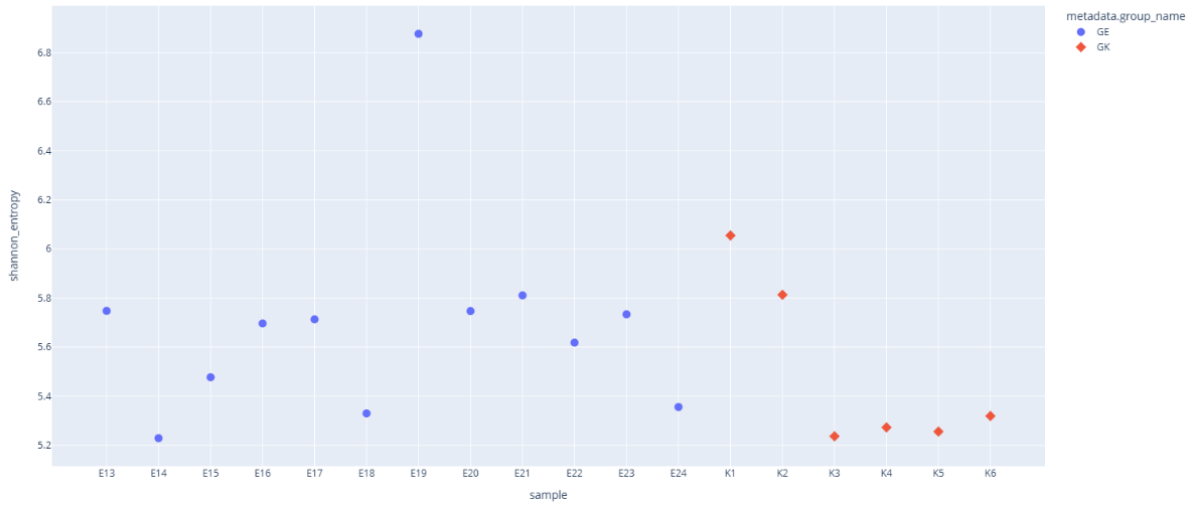
Genus düzeyinde gerçekleştirilen PCA analizinde de benzer dağılım paterni gözlenmiştir. Örneklerin büyük çoğunluğu merkezi bölgede kümelenirken, bazı örneklerin dağılım eksenleri boyunca ayrıştığı belirlenmiştir. Bu farklılaşmanın özellikle belirli genusların relatif bolluklarındaki değişimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. E19 örneğinin genus düzeyinde de diğer aşılı örneklerden ayrışması, bu örnekte gözlenen farklı mikrobiyal profilin yalnızca aile düzeyinde değil, daha alt taksonomik seviyelerde de devam ettiğini göstermektedir.

Genel değerlendirmede PCA sonuçları, örneklerin büyük bölümünde benzer mikrobiyal topluluk yapısının korunduğunu, ancak bazı örneklerde belirli taksonların relatif bolluklarındaki farklılıklarına bağlı olarak mikrobiyal kompozisyonun değişebildiğini ortaya koymuştur. Özellikle kontrol grubundaki bazı örnekler ile E19 örneğinde gözlenen ayrışma, mastitis geçmişi, bireysel mikrobiyal varyasyon veya çevresel faktörlerle ilişkili olabilecek mikrobiyal değişimlerin varlığını düşündürmektedir.

4.1.3 Alfa Çeşitlilik Analizi Bulguları

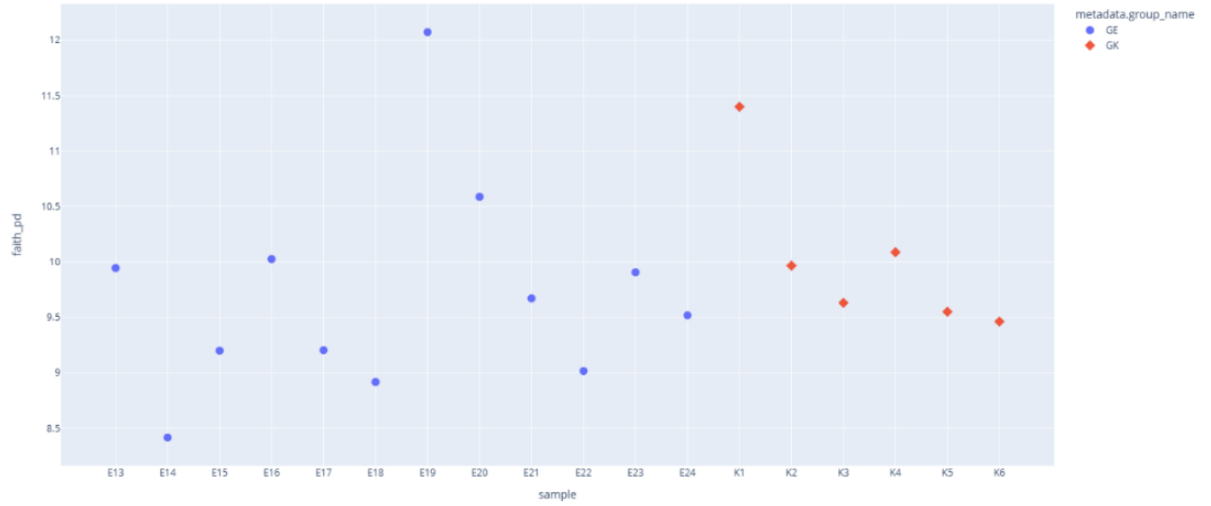
Mikrobiyal toplulukların örnek bazındaki çeşitliliğini değerlendirmek amacıyla alfa çeşitlilik analizleri gerçekleştirilmiş ve Shannon entropy, Faith's Phylogenetic Diversity (Faith_PD), Observed Features, Pielou evenness, Chao1 ve Simpson indeksleri hesaplanmıştır.

Alfa çeşitlilik analizleri incelendiğinde, aşılı grup (GE) örneklerinde Shannon çeşitlilik indeks değerlerinin 5,22 ile 6,87 arasında değiştiği görülmüştür. En yüksek Shannon çeşitlilik değeri E19 örneğinde (6,87) belirlenmiştir. Kontrol grubu (GK) örneklerinde ise Shannon indeks değerlerinin 5,23–6,05 aralığında olduğu ve en yüksek değer K1 örneğinde (6,05) bulunduğu tespit edilmiştir. Elde edilen Shannon indeks sonuçları, her iki grupta da yüksek mikrobiyal çeşitlilik bulunduğunu göstermektedir (Şekil 4).



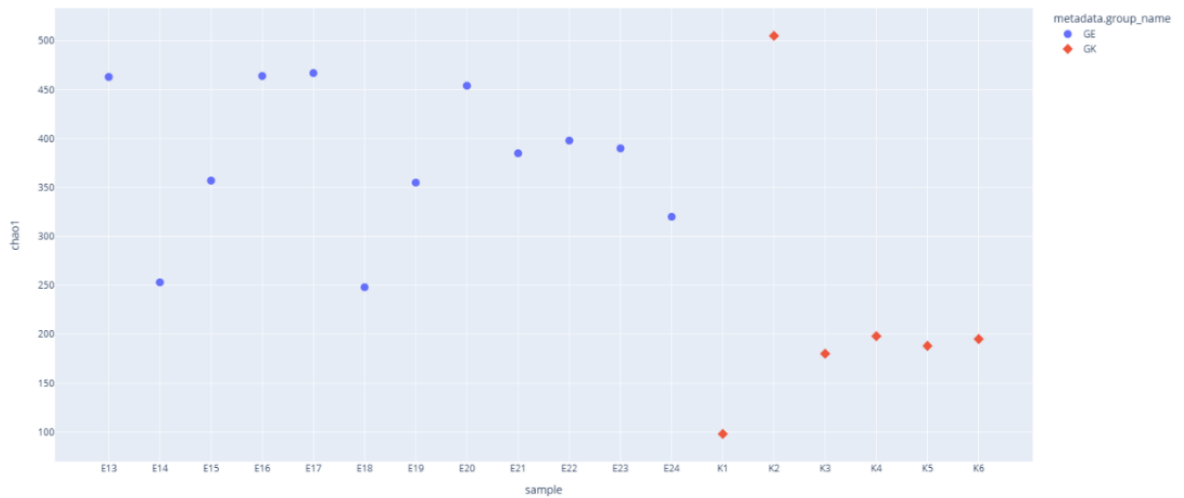
Şekil 4. Shannon entropy indeksine ait scatter plot analizi.

Faith's Phylogenetic Diversity (Faith_PD) analiz sonuçları değerlendirildiğinde, aşılı grup örneklerinde filogenetik çeşitlilik düzeylerinin genel olarak daha yüksek olduğu dikkat çekmiştir. En yüksek Faith_PD değeri E19 örneğinde 12,07 olarak belirlenirken, kontrol grubunda en yüksek değer K1 örneğinde 11,39 olarak saptanmıştır. Bu bulgular, bazı örneklerde filogenetik çeşitliliğin belirgin şekilde arttığını göstermektedir (Şekil 5).



Şekil 5. Örneklerin Faith_PD alfa çeşitlilik indeksine göre dağılımı.

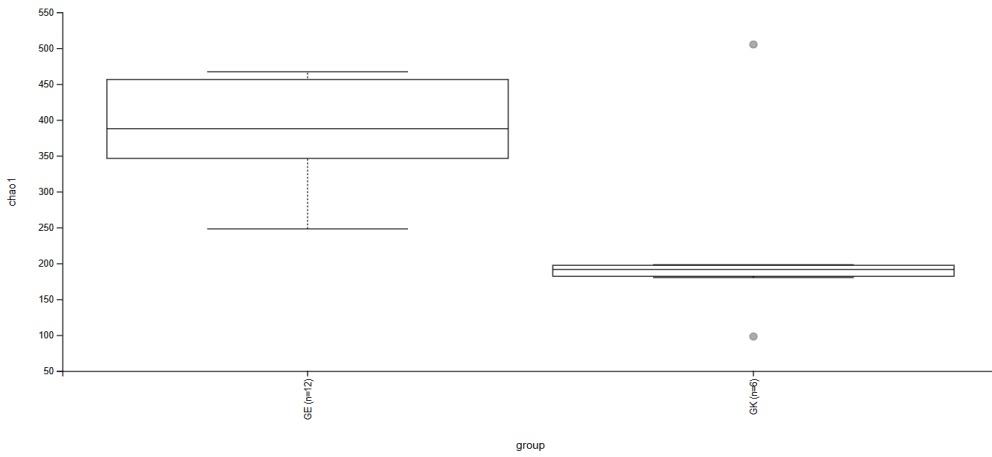
Observed Features analizinde aşılı grupta gözlenen takson sayısının 35 ile 64 arasında değiştiği belirlenmiştir. En yüksek gözlenen özellik sayısının E19 örneğinde bulunması, bu örneğin yüksek tür zenginliğine sahip olduğunu desteklemektedir. Benzer şekilde Chao1 analizlerinde de aşılı grup örneklerinde daha yüksek tür zenginliği değerleri dikkat çekmiştir. Özellikle E13, E16, E17 ve E20 örneklerinde yüksek Chao1 indeks değerleri saptanmıştır. Kontrol grubunda ise K2 örneğinde yüksek tür zenginliği görülürken, K1 örneğinde Chao1 değerinin belirgin şekilde düşük olduğu gözlenmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. Chao1 alfa çeşitlilik indeksinin örnek bazlı scatter plot gösterimi.

Pielou evenness analiz sonuçları değerlendirildiğinde, K1 örneğinin diğer örneklere kıyasla daha yüksek evenness değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu durum, ilgili örnekte türlerin relatif dağılımının daha dengeli olduğunu göstermektedir.

Chao1 boxplot grafikleri incelendiğinde, aşılı grubun kontrol grubuna kıyasla daha yüksek tür zenginliği eğilimi gösterdiği görülmüştür. Ayrıca Kruskal–Wallis testi sonuçlarına göre Chao1 indeksine dayalı tür zenginliği bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunduğu belirlenmiştir ($H=5,05$; $p=0,0245$). Chao1 indeksine göre gruplar arasında anlamlı farklılık saptanması, aşılama sonrası dönemde tür zenginliği açısından farklılaşma olabileceğini düşündürmektedir (Şekil 7).



Şekil 7. Gruplara ait Chao1 alfa çeşitlilik indekslerinin boxplot gösterimi.

Simpson çeşitlilik indeks sonuçları tüm örneklerde yüksek mikrobiyal çeşitliliğin korunduğunu göstermiştir. Simpson indeks değerlerinin genel olarak 0,89'un üzerinde olması, örneklerde yalnızca belirli baskın türlerin değil, aynı zamanda geniş mikrobiyal çeşitliliğin de sürdüğünü ortaya koymaktadır.

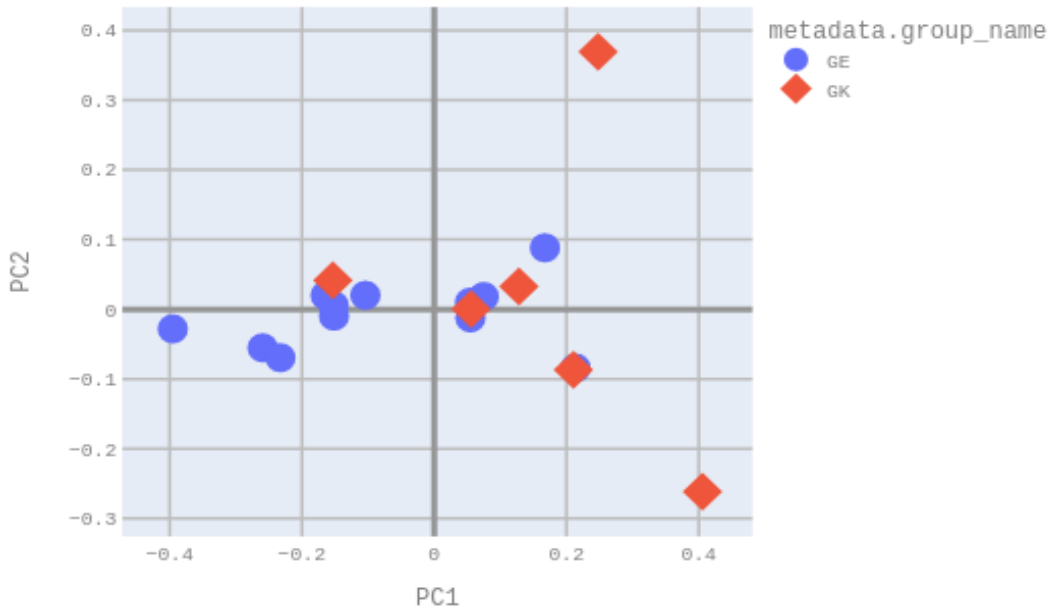
Genel değerlendirmede alfa çeşitlilik analizleri, aşılı grup örneklerinde tür zenginliği ve filogenetik çeşitlilik düzeylerinin daha yüksek olabileceğine işaret etmektedir. Özellikle Chao1 analizlerinde elde edilen istatistiksel farklılık, aşılamanın süt mikrobiyotasının çeşitlilik yapısı üzerinde etkili olabileceğini desteklemektedir.

4.1.4 Beta Çeşitlilik (Weighted UniFrac PCoA) Bulguları

Weighted UniFrac mesafe matrisi kullanılarak gerçekleştirilen beta çeşitlilik analizleri, örnekler arasındaki filogenetik ilişkiler ile taksonların relatif bolluklarını birlikte

değerlendirerek mikrobiyal topluluk yapılarındaki benzerlik ve farklılıkların ortaya konulmasını sağlamıştır. Analiz sonuçları Principal Coordinates Analysis (PCoA) yöntemi ile görselleştirilmiştir.

Weighted UniFrac mesafe değerleri incelendiğinde, örneklerin büyük kısmında düşük ve orta düzeyde uzaklık değerleri bulunduğu görülmüş, bu durum genel mikrobiyal kompozisyonun önemli ölçüde benzer olduğunu düşündürmüştür. Özellikle E16–E17 (0,108), E16–E23 (0,100), E17–K3 (0,066) ve E13–K6 (0,083) örnek çiftleri arasında düşük mesafe değerleri belirlenmiştir. Bu bulgular, ilgili örneklerin filogenetik açıdan benzer mikrobiyal topluluk yapısına sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 8.).



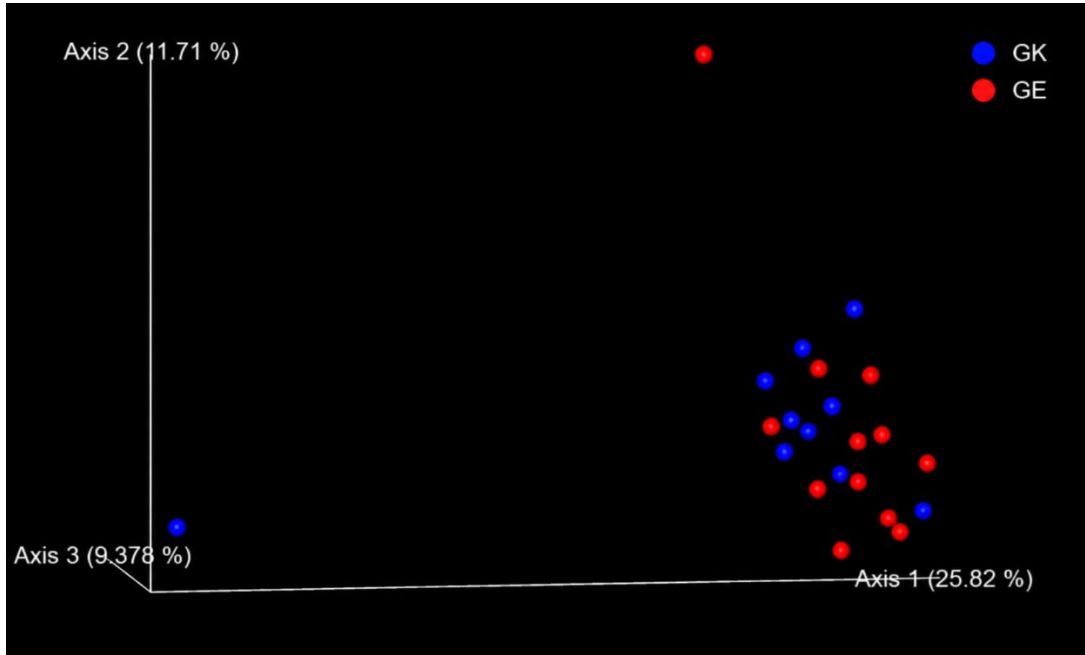
Şekil 8. Weighted UniFrac tabanlı PCoA beta çeşitlilik analizi.

Buna karşın E14–K5 örnek çifti arasında yüksek Weighted UniFrac mesafe değeri (0,849) saptanmıştır. Bu durum, söz konusu örneklerin mikrobiyal kompozisyon bakımından belirgin şekilde farklılaştığını ortaya koymaktadır. Ayrıca PCoA dağılımı incelendiğinde K1 ve K5 örneklerinin diğer örneklerden daha ayırık konumlandığı dikkat çekmiştir. Bu ayrışmanın, ilgili örneklerde belirli taksonların relatif abundansındaki değişimlerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Weighted UniFrac temelli üç boyutlu PCoA grafiğinde aşılı grup (GE) örneklerinin büyük bölümünün grafik merkezine yakın bölgelerde kümelenildiği ve daha sınırlı varyasyon gösterdiği gözlenmiştir. Kontrol grubu (GK) örneklerinde ise dağılımın daha geniş olduğu ve

bazı örneklerin ana kümelenme alanından uzaklaştığı belirlenmiştir. Özellikle GK grubunda örnekler arası heterojenitenin daha belirgin olması, kontrol grubundaki mikrobiyal topluluk yapısının daha değişken karakter gösterdiğini düşündürmektedir. Grafik üzerinde GK grubuna ait bazı örneklerin Axis 3 boyunca diğer örneklerden belirgin şekilde ayrıştığı, GE grubunda ise örneklerin daha kompakt bir dağılım sergilediği görülmüştür. Ayrıca GE grubuna ait bir örneğin Axis 2 yönünde ayrışma göstermesi, ilgili örnekte mikrobiyal kompozisyonun diğer aşıllı örneklerle göre farklılık taşıdığını ortaya koymaktadır.

PCoA eksenleri değerlendirildiğinde Axis 1 toplam varyasyonun %25,82'sini, Axis 2 %11,71'ini ve Axis 3 ise %9,378'ini açıklamaktadır. İlk üç eksenin birlikte toplam varyasyonun önemli bir bölümünü temsil ettiği görülmüştür (Şekil 9).

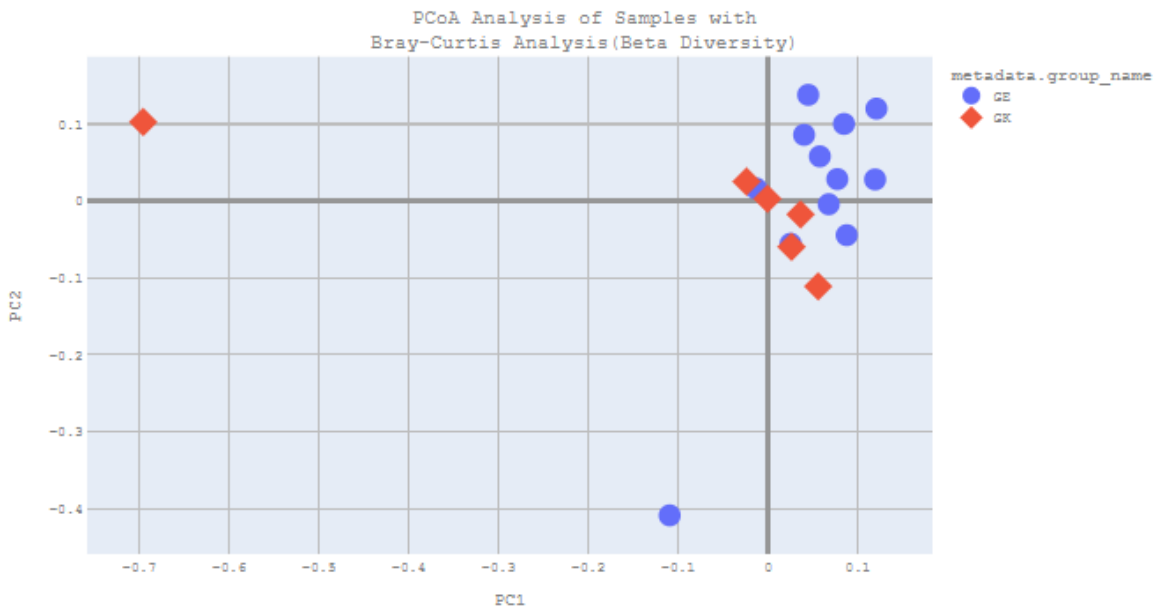


Şekil 9. GE ve GK gruplarına ait Weighted UniFrac PCoA analizi.

Genel değerlendirmede beta çeşitlilik analizleri, aşıllı ve kontrol grupları arasında tamamen ayrılmış bir mikrobiyal yapı bulunmadığını ortaya koymuştur. Bununla birlikte kontrol grubunda örnekler arası varyasyonun daha yüksek olması, aşıllama uygulamasının mikrobiyal topluluk stabilitesi üzerinde düzenleyici etkiler oluşturabileceğine işaret etmektedir.

4.1.5. Bray–Curtis PCoA Bulguları

Bray–Curtis uzaklık indeksine göre gerçekleştirilen PCoA analizinde örneklerin büyük bölümünün birbirine yakın kümelendiği belirlenmiştir. Aşılı grup örneklerinin genel olarak daha homojen dağılım gösterdiği gözlenmiştir. Kontrol grubunda ise bazı örneklerin ana kümelenmeden belirgin şekilde ayrıldığı tespit edilmiştir. Özellikle bir kontrol örneğinin negatif PC1 eksenini boyunca uzak konumlanması, bu örneğin mikrobiyal kompozisyon bakımından diğer örneklerden farklı olduğunu göstermiştir (Şekil 10).



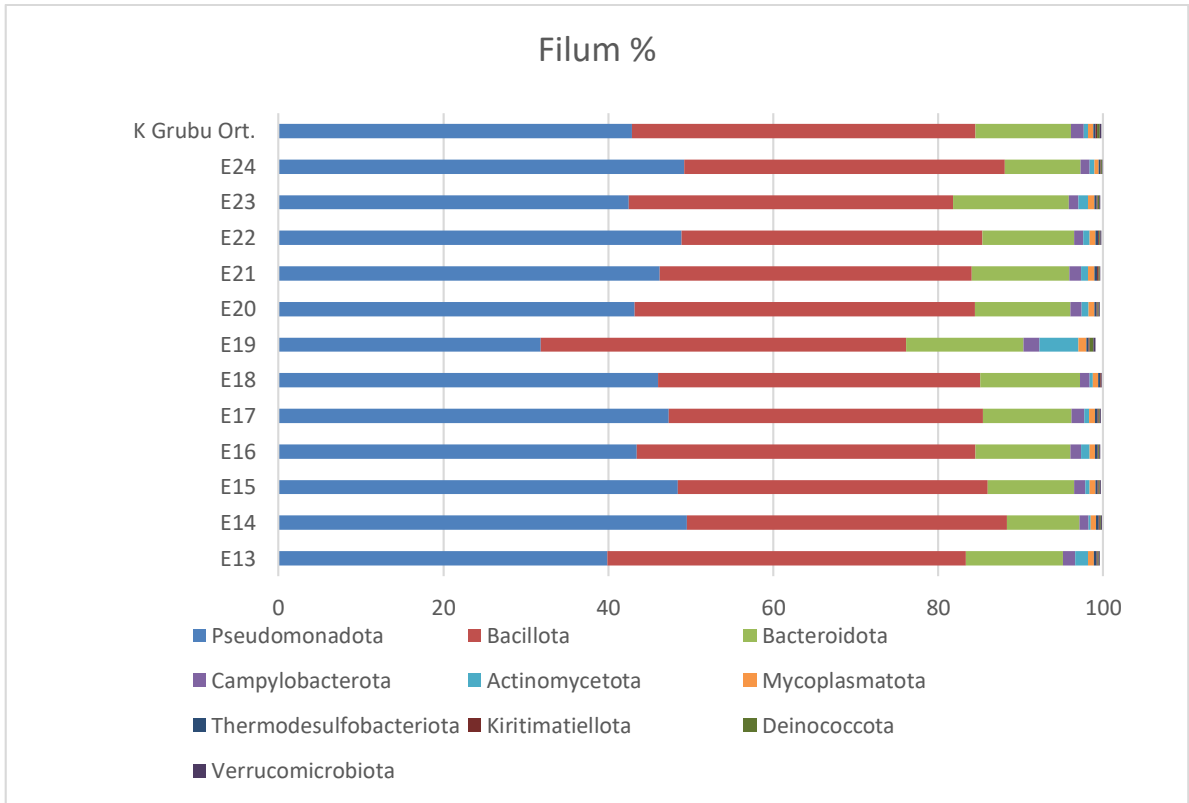
Şekil 10. Beta çeşitliliğin Bray–Curtis tabanlı PCoA analizi

Gruplar arasındaki farklılığın istatistiksel olarak değerlendirilmesi amacıyla PERMANOVA analizi uygulanmıştır. PERMANOVA sonuçlarına göre aşılı ve kontrol grupları arasında beta çeşitlilik açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (pseudo-F=1,397; p=0,083). Bu nedenle beta çeşitlilik bulguları, belirgin grup ayrışmasından ziyade örnekler arası dağılım eğilimi ve heterojenite farklılığı olarak yorumlanmalıdır.

4.1.6 Filum Düzeyinde Taksonomik Dağılım Bulguları

Kontrol grubu ortalaması ile aşılı grup örnekleri karşılaştırıldığında, tüm örneklerde baskın filumların *Pseudomonadota*, *Bacillota* ve *Bacteroidota* olduğu belirlenmiştir. Aşılı örneklerin büyük bölümünde kontrol grubuna benzer mikrobiyal dağılım gözlenmiştir.

Özellikle E13, E18 ve E24 örneklerinde *Bacillota* oranının daha yüksek olduğu dikkat çekmiştir. Buna karşılık E19 örneğinde *Pseudomonadota* oranının düşük, *Actinomycetota* oranının ise diğer örneklere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 11).



Şekil 11. Aşılı grup örnekleri ile kontrol grubu ortalamasının filum düzeyinde karşılaştırılması

Genel olarak değerlendirildiğinde, aşılı grup örneklerinde daha dengeli ve homojen bir filum dağılımı olduğu gözlenmiştir.

Filum düzeyinde gerçekleştirilen analizler sonucunda tüm örneklerde baskın filumların *Pseudomonadota*, *Bacillota* ve *Bacteroidota* olduğu belirlenmiştir. Ortalama relatif bolluk değerleri sırasıyla %45,15, %39,23 ve %11,61 olarak hesaplanmıştır.

Aşılı grup örneklerinde *Pseudomonadota* filumunun relatif bolluğunun genel olarak %40–49 aralığında dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Kontrol grubunda ise K2–K6 örneklerinde

benzer oranlar gözlenirken, K1 örneğinde bu filumun relatif bolluğunun belirgin şekilde düşük olduğu (%24,31) tespit edilmiştir.

Bacillota filumunun özellikle K1 örneğinde %64,22 ile diğer tüm örneklerden daha yüksek relatif bolluğa sahip olduğu belirlenmiştir. Aşılı örneklerde ise bu filumun relatif bolluğu genel olarak %36–44 aralığında bulunmuştur.

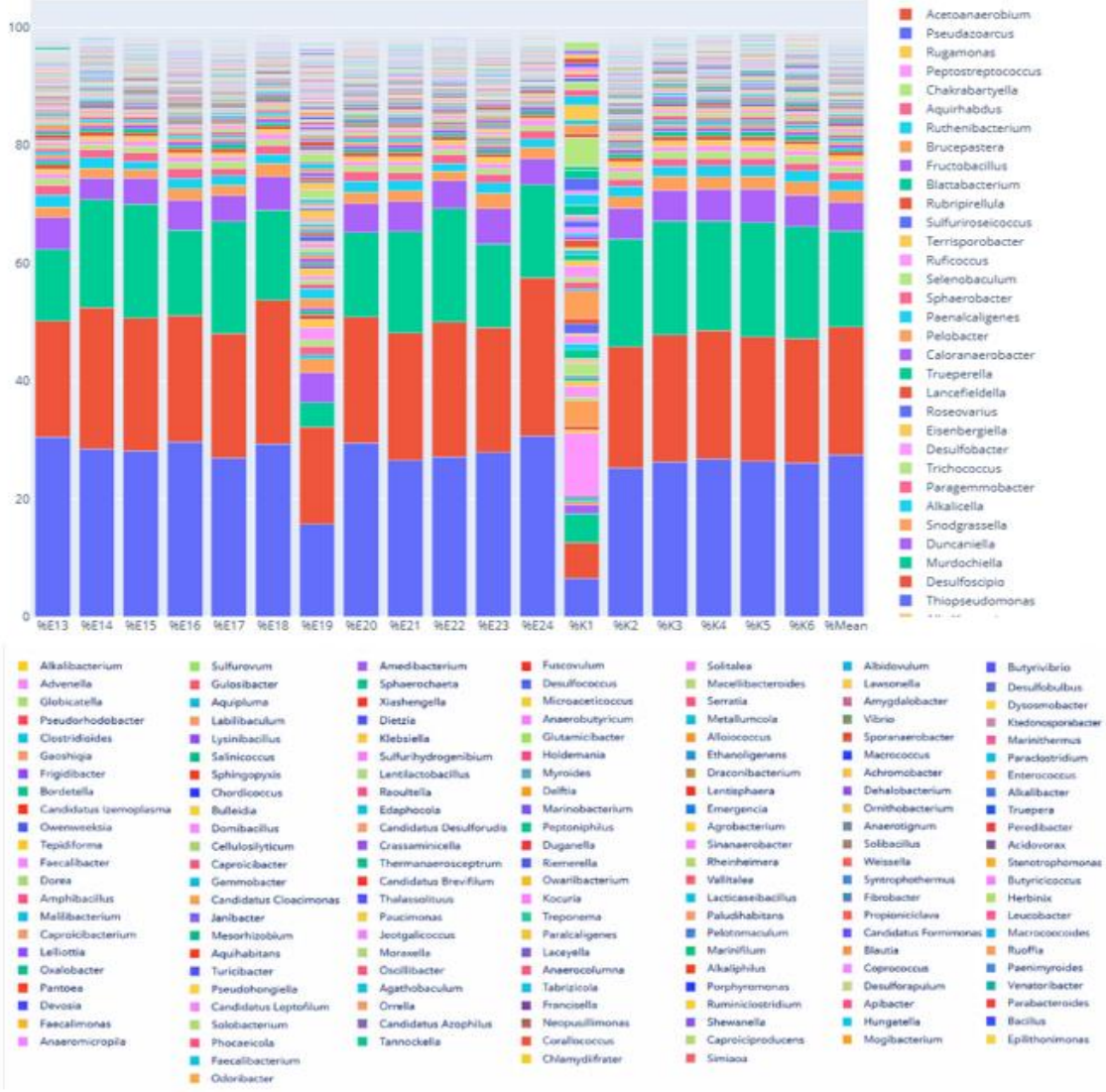
Bacteroidota filumunun tüm örneklerde daha stabil dağılım gösterdiği ve relatif bolluk değerlerinin genel olarak %8–14 arasında değiştiği belirlenmiştir.

Düşük bollukta bulunan diğer filumlar arasında *Campylobacterota*, *Actinomycetota* ve *Mycoplasmata* yer almıştır. Özellikle E19 örneğinde *Actinomycetota* filumunun relatif bolluğunun diğer örneklere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Genel olarak değerlendirildiğinde örneklerde baskın mikrobiyal topluluğun *Pseudomonadota* ve *Bacillota* filumlarından oluştuğu, bazı örneklerde ise belirli filumların relatif bolluk farklılıklarına bağlı olarak mikrobiyal kompozisyon değişiklikleri meydana geldiği belirlenmiştir.

4.1.7 Genus Bazında Taksonomik Dağılım Bulguları

Kontrol grubu ile aşılı grup örneklerinin genus düzeyindeki dağılımları karşılaştırıldığında, tüm örneklerde baskın genusların *Leuconostoc*, *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* olduğu belirlenmiştir. Aşılı örneklerin büyük bölümünde kontrol grubuna benzer bir mikrobiyal dağılım gözlenmiştir (Şekil 12).



Şekil 12. Mikrobiyal toplulukların genus düzeyinde taksonomik kompozisyonu.

E13, E18, E20 ve E24 örneklerinde *Leuconostoc* oranının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu dikkat çekmiştir. Bu bulgu, aşılı grup örneklerinin bir kısmında laktik asit bakterileriyle ilişkili taksonların göreceli temsilinin arttığını göstermektedir. Ancak bu artışın fonksiyonel veya koruyucu bir etki olarak yorumlanabilmesi için tür düzeyinde doğrulama ve fonksiyonel analizlere ihtiyaç vardır. E19 örneğinde ise diğer aşılı örneklerden farklı olarak *Leuconostoc* ve *Acinetobacter* oranlarının düşük, buna karşılık çevresel ve fırsatçı bazı genusların relatif bolluklarının daha yüksek olduğu gözlenmiştir. E21 örneğinde ise genus dağılımının kontrol grubuna oldukça benzer olduğu belirlenmiştir (Şekil 13).

Genus Level Taxonomic Comparison of Sample



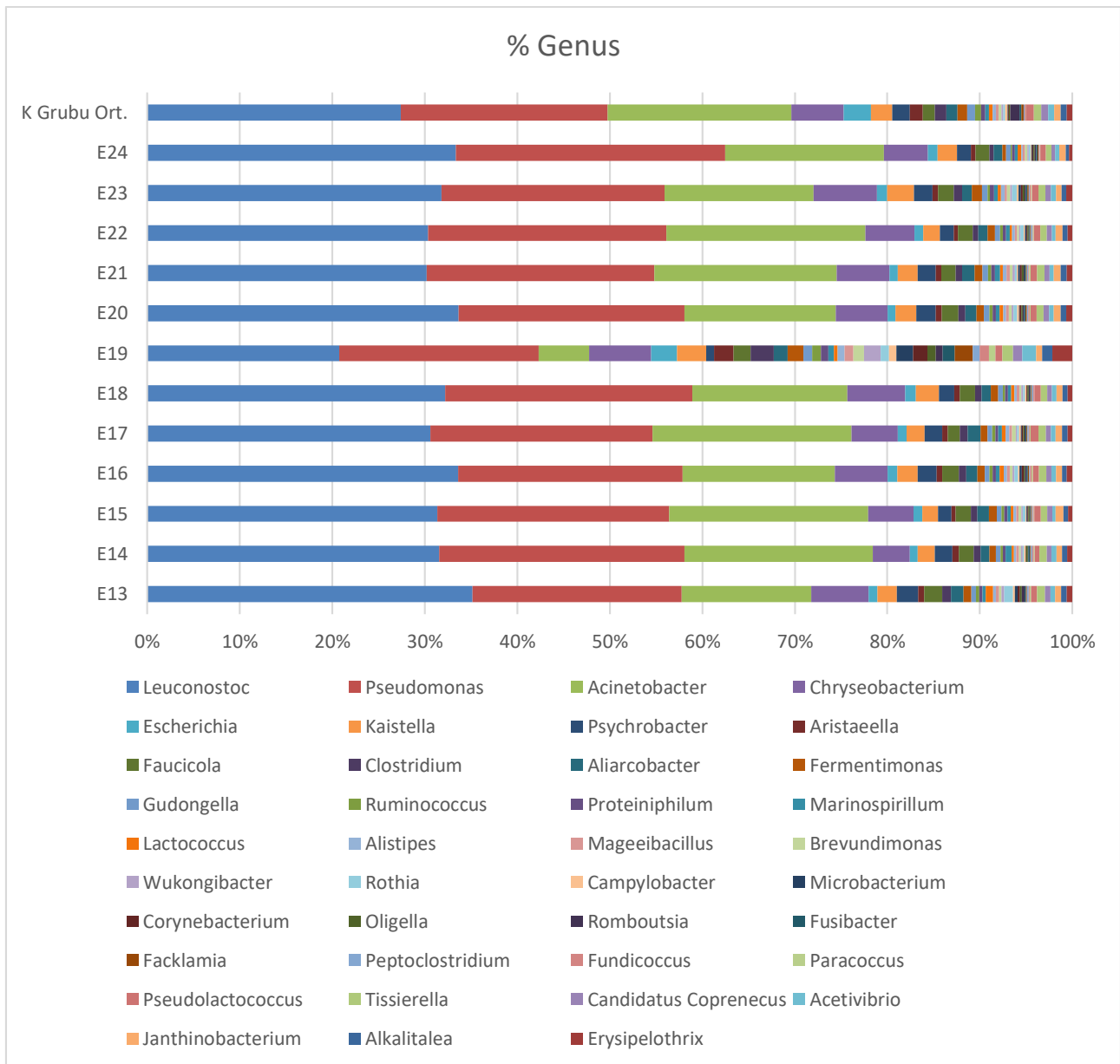
Şekil 13. Örneklerin genus düzeyinde relatif bolluk dağılımlarının pasta grafikler ile gösterimi.

Genel olarak değerlendirildiğinde, aşılı grup örneklerinde daha dengeli ve homojen bir genus dağılımı olduğu, bazı örneklerde ise mikrobiyal kompozisyon farklılıklarının bulunduğu tespit edilmiştir. Genus düzeyinde gerçekleştirilen taksonomik analizler sonucunda tüm örneklerde baskın mikrobiyal toplulukların genel olarak benzer yapıda olduğu belirlenmiştir. Örneklerde en yüksek relatif bolluğa sahip genusların *Leuconostoc*, *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* olduğu tespit edilmiştir. Ortalama relatif bolluk değerleri incelendiğinde *Leuconostoc* genusunun yaklaşık %27,51 ile en baskın genus olduğu, bunu %21,64 relatif bolluk ile *Pseudomonas* ve %16,25 relatif bolluk ile *Acinetobacter* genuslarının izlediği tespit edilmiştir.

Aşılı grup (GE) örneklerinde özellikle *Leuconostoc* genusunun yüksek relatif bolluk gösterdiği gözlenmiştir. Aşılı örneklerde *Leuconostoc* oranının genel olarak %26–30 aralığında dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle E13 (%30,51) ve E24 (%30,71) örneklerinde bu genusun baskın hale geldiği tespit edilmiştir. Buna karşılık kontrol grubunda yer alan K1

örneğinde *Leuconostoc* relatif bolluğunun (%6,51) diğer örneklere göre belirgin düzeyde düşük olduğu gözlenmiştir.

Pseudomonas genusunun tüm örneklerde yaygın olarak bulunduğu belirlenmiştir. Aşılı grup örneklerinde relatif bolluk değerlerinin yaklaşık %16,39–26,80 arasında değiştiği, kontrol grubu örneklerinde ise genellikle %20 civarında bulunduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde *Acinetobacter* genusunun da hem aşılı hem kontrol grubunda yüksek relatif bolluk gösterdiği belirlenmiştir. Ancak E19 örneğinde *Acinetobacter* relatif bolluğunun (%4,12) diğer örneklere kıyasla daha düşük seviyede olduğu gözlenmiştir (Şekil 14).



Şekil 14. Kontrol grubu ortalaması ve aşılı örneklerin genus bazlı taksonomik kompozisyonu.

Genus düzeyindeki relatif bolluk grafikleri incelendiğinde örneklerin büyük bölümünde benzer mikrobiyal dağılım yapısına sahip olduğu görülmüştür. Bununla birlikte bazı örneklerde belirgin kompozisyon farklılıkları dikkat çekmiştir. Özellikle K1 örneğinin diğer örneklerden ayrıştığı ve daha heterojen bir genus dağılımı sergilediği belirlenmiştir.

Kontrol ve aşılı gruplara ait örneklerin ailesi düzeyindeki mikrobiyom profilleri incelendiğinde, tüm örneklerde baskın ailelerin ağırlıklı olarak *Leuconostocaceae*, *Pseudomonadaceae* ve *Moraxellaceae* olduğu görülmüştür. Kontrol grubu ortalama değerlerinde en yüksek relatif bolluğuna *Leuconostocaceae* (%22,89), *Pseudomonadaceae* (%18,70) ve *Moraxellaceae* (%18,18) ailelerine ait olduğu saptanmıştır.

Aşılı grup örneklerinde özellikle *Leuconostocaceae* ailesinin daha yüksek relatif bolluk değerlerine ulaştığı dikkat çekmiştir. Bu aileye ait en yüksek oran E24 örneğinde %30,71 olarak belirlenirken, en düşük değer %15,78 ile E19 örneğinde tespit edilmiştir. *Pseudomonadaceae* ailesinin ise tüm örneklerde yaygın dağılım gösterdiği ve relatif bolluk değerlerinin %16,40 ile %26,81 arasında değiştiği görülmüştür.

Moraxellaceae ailesinin bazı örneklerde kontrol grubuna benzer düzeylerde temsil edildiği, ancak E19 örneğinde relatif bolluğun belirgin şekilde azaldığı (%4,76) belirlenmiştir. Buna karşılık aynı örnekte *Clostridiaceae* (%2,49), *Enterobacteriaceae* (%2,13) ve *Lachnospiraceae* (%9,20) ailelerinin diğer aşılı örneklere kıyasla daha yüksek relatif bolluk gösterdiği saptanmıştır. Özellikle *Lachnospiraceae* ve çevresel/opportunistik bakterilerle ilişkili ailelerdeki artışın, E19 örneğinin klinik mastitis geçmişi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Genel değerlendirilmede, aşılı grup örneklerinde laktik asit bakterileri ile ilişkili *Leuconostocaceae* ve *Lactobacillaceae* ailelerinin daha stabil ve baskın bir dağılım sergilediği görülmüştür. Kontrol grubunda ise ailesi düzeyindeki mikrobiyal dağılımın daha heterojen karakter gösterdiği ve düşük bolluklu farklı ailelerin daha geniş temsil edildiği dikkat çekmiştir (Tablo 7-8).

Tablo 7. Kontrol ve E13–E18 örneklerinde baskın familyaların karşılaştırılması.

Familya	Kontrol Ort.(%)	E13	E14	E15	E16	E17	E18
<i>Leuconostocaceae</i>	22,89	30,51	28,47	28,16	29,70	26,94	29,33
<i>Pseudomonadaceae</i>	18,70	19,65	23,96	22,54	21,44	21,15	24,36
<i>Moraxellaceae</i>	18,18	14,16	20,11	20,66	16,33	20,63	16,82
<i>Flavobacteriaceae</i>	8,90	9,45	7,35	7,79	9,09	7,81	10,03
<i>Lachnospiraceae</i>	4,33	3,53	3,31	3,12	3,42	3,26	3,28
<i>Enterobacteriaceae</i>	2,47	0,85	0,73	0,88	0,95	0,83	1,02
<i>Peptostreptococcaceae</i>	1,55	1,01	0,82	0,68	0,84	0,78	0,79
<i>Clostridiaceae</i>	1,15	0,99	0,83	0,73	0,81	0,84	0,78
<i>Arcobacteraceae</i>	1,04	1,16	0,84	1,11	1,06	1,25	0,92
<i>Lactobacillaceae</i>	0,70	0,59	0,46	0,63	0,58	0,77	0,60

Tablo 8. Kontrol ve E19–E24 örneklerinde baskın familyaların karşılaştırılması.

Familya	Kontrol Ort. (%)	E19	E20	E21	E22	E23	E24
<i>Leuconostocaceae</i>	22,89	15,78	29,48	26,51	27,10	27,93	30,71
<i>Pseudomonadaceae</i>	18,70	16,40	21,42	21,60	22,95	21,17	26,81
<i>Moraxellaceae</i>	18,18	4,76	16,16	19,00	20,56	15,92	17,19
<i>Flavobacteriaceae</i>	8,90	10,52	9,00	8,78	8,15	10,60	8,17
<i>Lachnospiraceae</i>	4,33	9,20	3,53	3,64	3,17	3,74	2,55
<i>Enterobacteriaceae</i>	2,47	2,13	0,77	0,78	0,85	0,97	0,98
<i>Peptostreptococcaceae</i>	1,55	1,45	0,81	0,78	0,67	0,79	0,66
<i>Clostridiaceae</i>	1,15	2,49	0,80	0,74	0,66	0,92	0,46
<i>Arcobacteraceae</i>	1,04	1,12	1,05	1,17	0,87	0,89	0,87
<i>Lactobacillaceae</i>	0,70	0,59	0,54	0,60	0,62	0,62	0,55

4.1.8 Krona Analiz Bulguları

Krona analizleri değerlendirildiğinde kontrol (K) ve aşılı (E) gruplar arasında mikrobiyal topluluk yapısı bakımından belirgin farklılıklar bulunduğu görülmüştür. Tüm örneklerde baskın bakteriyel toplulukların çoğunlukla *Leuconostoc*, *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* ilişkili taksonlardan oluştuğu belirlenmiştir. Bununla birlikte kontrol grubunda mikrobiyal dağılımın

daha değişken karakter gösterdiği ve düşük bollukta bulunan çevresel/opportunistik bakterilerin daha geniş çeşitlilikte temsil edildiği dikkat çekmiştir. Aşılı örneklerde ise mikrobiyal kompozisyonun daha düzenli bir yapı sergilediği ve özellikle *Leuconostocaceae* ile ilişkili laktik asit bakterilerinin relatif abundansında artış meydana geldiği saptanmıştır.

Aşı uygulanan örneklerin önemli bir kısmında *Leuconostoc* başta olmak üzere laktik asit bakterilerinin baskınlığındaki artış, aşılama sonrası yararlı mikrobiyal popülasyonların desteklenmiş olabileceğini düşündürmektedir. Özellikle E13, E18, E22 ve E24 örneklerinde *Leuconostoc* relatif abundansının diğer örneklerle kıyasla daha yüksek olduğu ve mikrobiyal dağılımın daha dengeli bir profil oluşturduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte bazı örneklerde *Pseudomonas* ilişkili bakterilerin relatif düzeylerini koruduğu gözlenmiştir.

Örnekler arasındaki en dikkat çekici farklılığın E19 örneğinde ortaya çıktığı görülmüştür. Bu örnekte *Leuconostoc* bolluğunun diğer aşılı örneklerle göre daha düşük seviyede olduğu, buna karşın *Actinomyces* ilişkili bakteriler ile düşük abundanslı çevresel mikroorganizmaların relatif temsil oranlarının arttığı belirlenmiştir. E19 örneğinde gözlenen farklı mikrobiyal profil, ilgili hayvanın klinik geçmişi, bireysel mikrobiyotaya özellikleri veya örnekleme/çevresel faktörlerle ilişkili olabilir. Ancak tek bir örnek üzerinden nedensel çıkarım yapılması uygun değildir.

Genel değerlendirmede, Krona analizlerinin aşılı gruplarda mikrobiyal topluluğun daha dengeli ve laktik asit bakterileri bakımından zenginleşmiş bir yapı kazandığını ortaya koyduğu görülmüştür. Kontrol grubunda ise çevresel kaynaklı ve düşük bolluklu bakteriyel taksonların daha geniş temsil edildiği belirlenmiştir. Bu bulgular, aşılama uygulamasının süt mikrobiyotasının kompozisyonu üzerinde düzenleyici etkiler oluşturabileceğini ve mikrobiyal stabilitenin korunmasına katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir.

K1, E13 ve E14 örneklerine ait Krona analizleri birlikte değerlendirildiğinde, örneklerin genel mikrobiyal yapılarının benzer filogenetik dağılım gösterdiği ancak baskın taksonların relatif bolluklarında belirgin farklılıklar bulunduğu görülmüştür (Şekil 14). K1 kontrol örneğinde mikrobiyal dağılımın daha heterojen olduğu ve düşük bolluklu çok sayıda bakteriyel grubun grafikte temsil edildiği dikkat çekmiştir. Ayrıca *Bacillota* ilişkili bazı bakterilerin relatif bolluğunun diğer örneklerle göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. E13 ve E14 aşılı örneklerinde ise mikrobiyal yapının daha homojen olduğu gözlenmiştir. Özellikle *Leuconostocaceae* ve diğer laktik asit bakterileri ile ilişkili taksonların daha baskın hale geldiği belirlenmiştir. E13 örneğinde *Leuconostoc* relatif bolluğunun oldukça yüksek olduğu dikkat çekerken, E14 örneğinde *Pseudomonadaceae* ilişkili bakterilerin relatif bolluğunda hafif artış gözlenmiştir. Her iki aşılı örnekte de çevresel ve fırsatçı bakterilerin relatif temsilinin kontrol

örneğine göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Genel olarak değerlendirildiğinde, aşılı örneklerde daha dengeli ve laktik asit bakterileri açısından zenginleşmiş bir mikrobiyal yapı olduğu görülmüştür.

K2 kontrol örneği ile E15 ve E16 aşılı örneklerine ait Krona analiz grafikleri birlikte değerlendirildiğinde, örneklerin genel mikrobiyal kompozisyonlarının benzer olduğu ancak bazı baskın bakteriyel grupların relatif bolluklarında farklılıklar bulunduğu görülmüştür (Şekil 15). K2 kontrol örneğinde mikrobiyal dağılımın daha heterojen olduğu ve özellikle *Pseudomonadota*, *Bacillota* ve *Bacteroidota* filumlarının birlikte baskın yapı oluşturduğu belirlenmiştir. Ayrıca *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* ilişkili bakterilerin relatif bolluklarının yüksek olduğu dikkat çekmiştir. E15 ve E16 aşılı örneklerinde ise özellikle *Leuconostocaceae* ve diğer laktik asit bakterileri ile ilişkili taksonların daha belirgin hale geldiği gözlenmiştir. Her iki örnekte de *Leuconostoc* genusunun yüksek relatif bolluk göstermesi, aşılama uygulamasının laktik asit bakterilerinin gelişimini desteklediğini düşündürmektedir. E15 örneğinde mikrobiyal dağılımın kontrol örneğine göre daha dengeli olduğu görülürken, E16 örneğinde *Pseudomonas* ilişkili bakterilerin relatif bolluğunda hafif artış gözlenmiştir. Bununla birlikte her iki aşılı örnekte de mikrobiyal topluluğun genel yapısının korunduğu belirlenmiştir.

K3 kontrol örneği ile E17 ve E18 aşılı örneklerine ait Krona analiz grafikleri birlikte değerlendirildiğinde, örneklerin genel mikrobiyal yapılarının benzer olduğu ancak bazı baskın bakteriyel grupların relatif bolluklarında farklılıklar bulunduğu görülmüştür (Şekil 16). K3 kontrol örneğinde özellikle *Pseudomonadota* ve *Bacillota* filumlarının baskın olduğu, ayrıca *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* ilişkili bakterilerin yüksek relatif bolluk gösterdiği belirlenmiştir. Kontrol örneğinde mikrobiyal dağılımın daha heterojen olduğu ve düşük bolluklu çok sayıda bakteriyel grubun bulunduğu dikkat çekmiştir. E17 ve E18 aşılı örneklerinde ise özellikle *Leuconostocaceae* ile ilişkili laktik asit bakterilerinin daha baskın hale geldiği gözlenmiştir. E18 örneğinde *Leuconostoc lactis* relatif bolluğunun daha yüksek olduğu ve mikrobiyal yapının daha homojen dağılım gösterdiği belirlenmiştir. E17 örneğinde kontrol grubuna benzer şekilde *Pseudomonas* ilişkili bakterilerin relatif bolluğu korunurken, E18 örneğinde laktik asit bakterilerinin artışı ile birlikte çevresel bakterilerin relatif temsilinin azaldığı gözlenmiştir. Genel olarak değerlendirildiğinde, aşılı örneklerde özellikle laktik asit bakterileri ile ilişkili taksonların zenginleştiği ve mikrobiyal yapının daha dengeli hale geldiği belirlenmiştir.

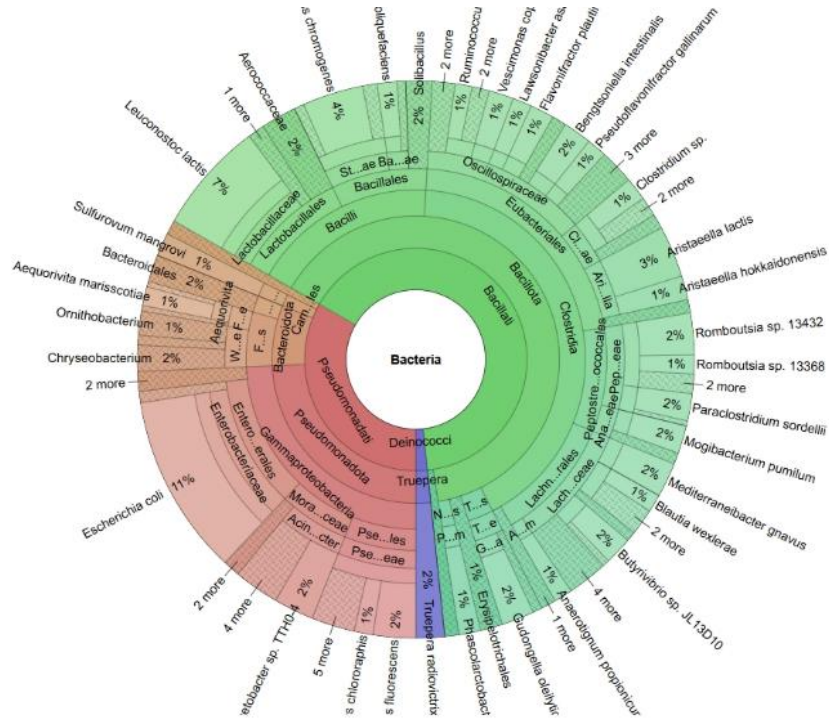
K4 kontrol örneği ile E19 ve E20 aşılı örneklerine ait Krona analiz grafikleri birlikte değerlendirildiğinde, E19 örneğinin diğer örneklere göre belirgin şekilde farklı mikrobiyal

dağılım gösterdiği dikkat çekmiştir (Şekil 17). K4 kontrol örneğinde baskın mikrobiyal yapının genel olarak *Leuconostoc*, *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* ilişkili bakterilerden oluştuğu görülmüştür. Kontrol örneğinde mikrobiyal dağılımın dengeli olduğu ve laktik asit bakterilerinin önemli düzeyde temsil edildiği belirlenmiştir. E20 örneğinde kontrol grubuna oldukça benzer bir mikrobiyal yapı gözlenmiştir. Özellikle *Leuconostocaceae* ve diğer laktik asit bakterilerinin relatif bolluğunun yüksek olduğu ve mikrobiyal dağılımın daha homojen yapıda olduğu dikkat çekmiştir. Buna karşılık E19 örneğinde diğer aşılı örneklerden farklı olarak *Leuconostoc* relatif bolluğunun belirgin şekilde düşük olduğu görülmüştür. Ayrıca *Actinomycetota* ilişkili bazı bakterilerin ve düşük bolluklu çevresel bakteriyel grupların relatif temsilinin arttığı dikkat çekmiştir. E19 örneğinin daha önce klinik mastitis geçmesine sahip olması, gözlenen bu farklı mikrobiyal yapıyı açıklayabilecek önemli bir faktör olarak değerlendirilmiştir. Genel olarak değerlendirildiğinde, E20 örneği daha stabil bir mikrobiyal yapı sergilerken E19 örneğinde belirgin kompozisyon farklılıkları gözlenmiştir.

K5 kontrol örneği ile E21 ve E22 aşılı örneklerine ait Krona analiz grafikleri birlikte değerlendirildiğinde, örneklerin genel mikrobiyal kompozisyonlarının büyük ölçüde benzer olduğu görülmüştür (Şekil 18). Tüm örneklerde baskın bakteriyel grupların *Leuconostoc*, *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* ilişkili taksonlardan oluştuğu belirlenmiştir. K5 kontrol örneğinde mikrobiyal dağılımın daha heterojen olduğu ve düşük bolluklu çok sayıda bakteriyel grubun bulunduğu dikkat çekmiştir. Özellikle çevresel bakteriler ve düşük relatif bolluklu taksonların kontrol örneğinde daha yaygın dağılım gösterdiği gözlenmiştir. E21 ve E22 aşılı örneklerinde ise özellikle *Leuconostocaceae* ile ilişkili laktik asit bakterilerinin daha baskın hale geldiği belirlenmiştir. Her iki örnekte de *Leuconostoc lactis* oranının yüksek olduğu ve mikrobiyal yapının daha homojen dağılım gösterdiği dikkat çekmiştir. E22 örneğinde laktik asit bakterilerinin relatif bolluğunun daha belirgin hale geldiği ve bazı çevresel bakterilerin relatif temsilinin azaldığı görülmüştür. E21 örneğinin klinik mastitis geçmesine sahip olmasına rağmen mikrobiyal kompozisyonunun genel olarak stabil kaldığı ve kontrol grubundan belirgin düzeyde ayrılmadığı belirlenmiştir.

K6 kontrol örneği ile E23 ve E24 aşılı örneklerine ait Krona analiz grafikleri birlikte değerlendirildiğinde, örneklerin genel mikrobiyal kompozisyonlarının büyük ölçüde benzer olduğu ancak bazı bakteriyel grupların relatif bolluklarında farklılıklar bulunduğu görülmüştür (Şekil 19). K6 kontrol örneğinde baskın bakteriyel grupların özellikle *Leuconostoc*, *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* ilişkili taksonlardan oluştuğu belirlenmiştir. Kontrol örneğinde düşük bolluklu çok sayıda çevresel bakterinin bulunması, mikrobiyal yapının daha heterojen

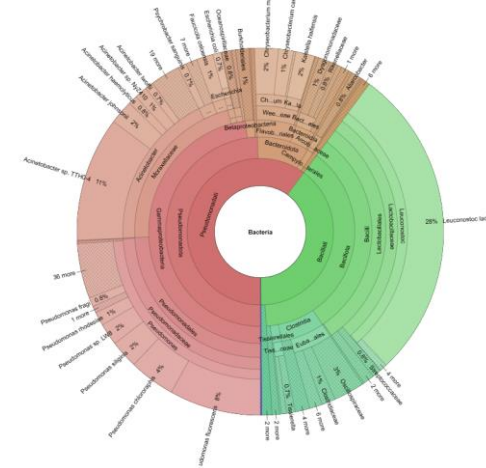
özelliğini ortaya koymuştur. E23 ve E24 aşılı örneklerinde ise özellikle *Leuconostocaceae* ile ilişkili laktik asit bakterilerinin relatif bolluğunun arttığı dikkat çekmiştir. E24 rneğinde *Leuconostoc lactis* oranının daha yüksek olduğu ve mikrobiyal dağılımın daha homojen hale geldiği gözlenmiştir. E23 rneğinde kontrol grubuna benzer şekilde *Pseudomonas* ilişkili bakterilerin relatif bolluğu korunurken, E24 rneğinde laktik asit bakterilerinin baskınlığının daha belirgin olduğu görülmüştür. Ayrıca her iki aşılı örneklerde de düşük bolluklu çevresel bakterilerin relatif temsilinin kontrol grubuna göre azaldığı belirlenmiştir. Genel olarak değerlendirildiğinde, E23 ve E24 örneklerinde daha stabil ve laktik asit bakterileri açısından zenginleşmiş bir mikrobiyal yapı oluştuğu görülmüştür.



K1 örneği Krona analiz grafiği

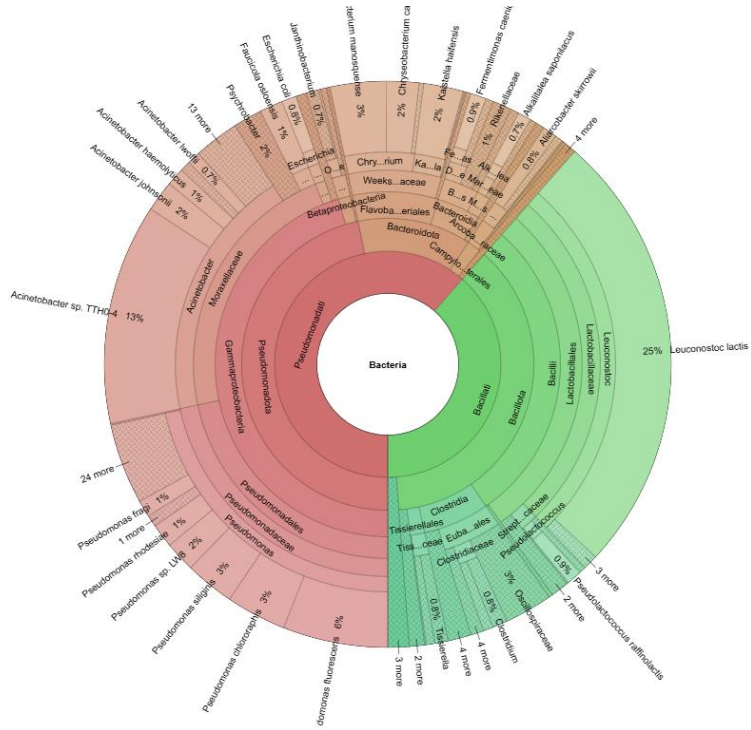


E13 örneği Krona analiz grafiği

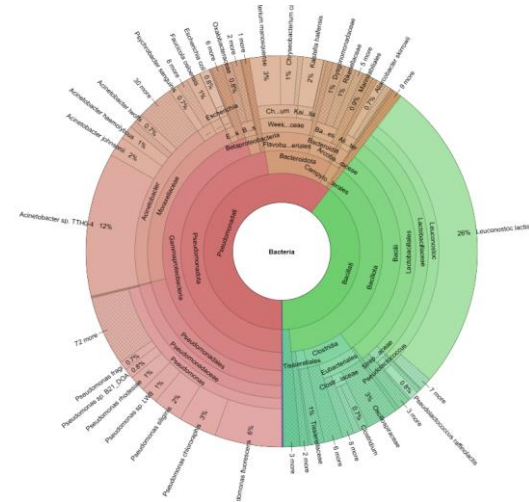


E14 örneği Krona analiz grafiği

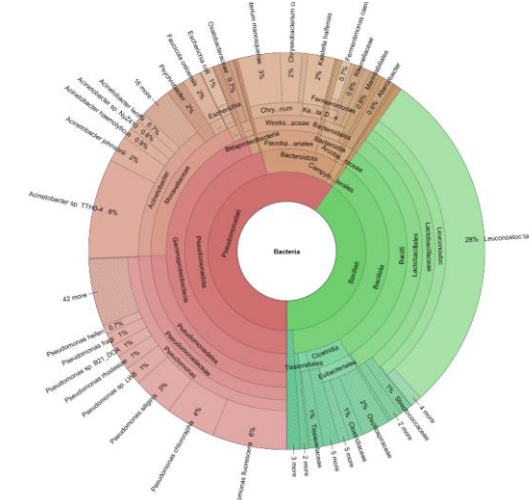
Şekil 15. K1 kontrol ve E13-E14 aşıllı örneklerine ait Krona grafikleri.



K3 örneği Krona analiz grafiği

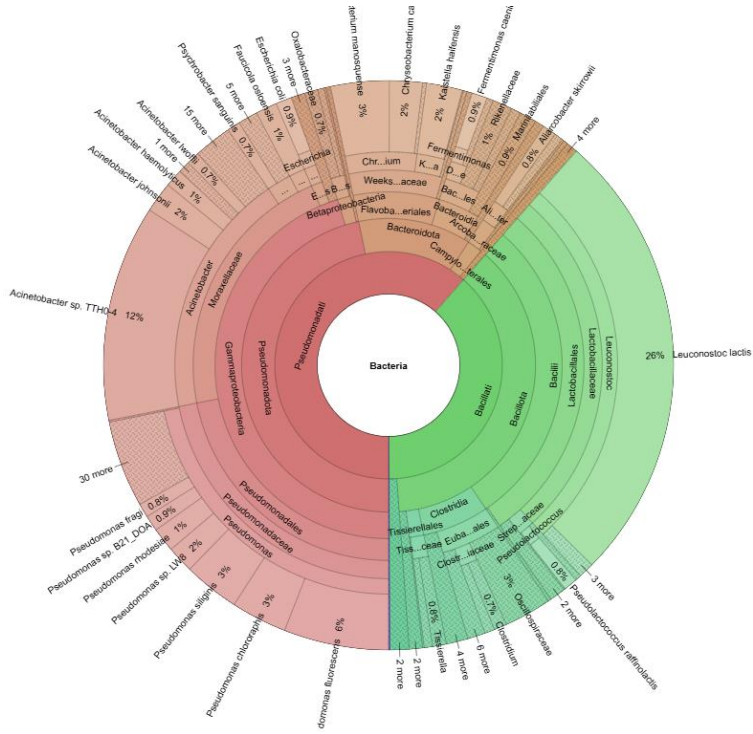


E17 örneği Krona analiz grafiği



E18 örneği Krona analiz grafiği

Şekil 17. K3 kontrol ve E17-E18 aşı örneklerine ait Krona grafikleri.



K4 örneği Krona analiz grafiği

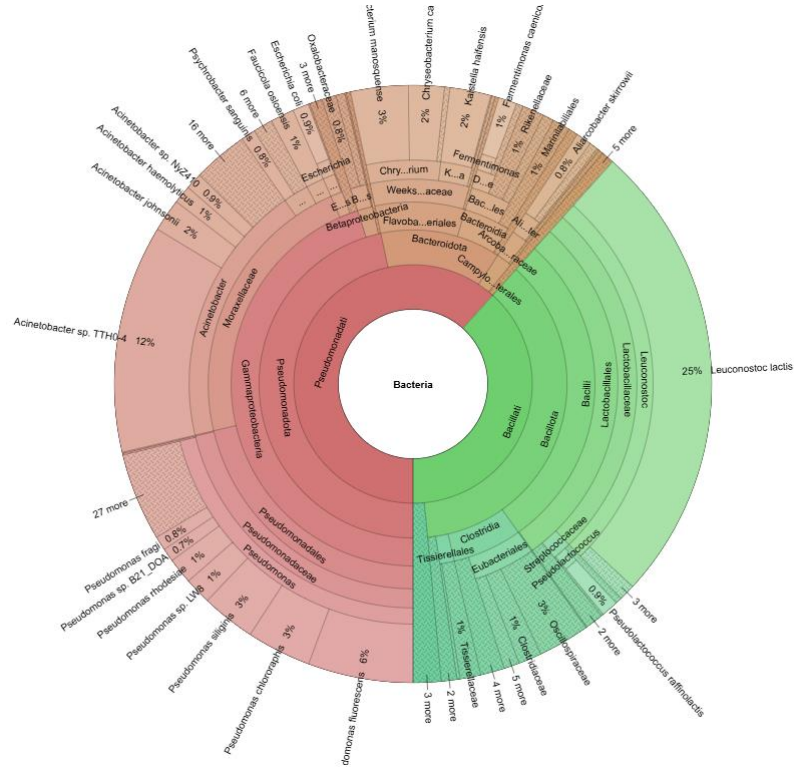


E19 örneği Krona analiz grafiği

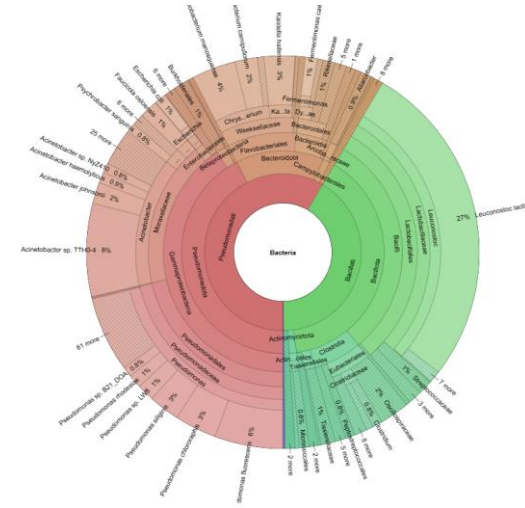


E20 örneği Krona analiz grafiği

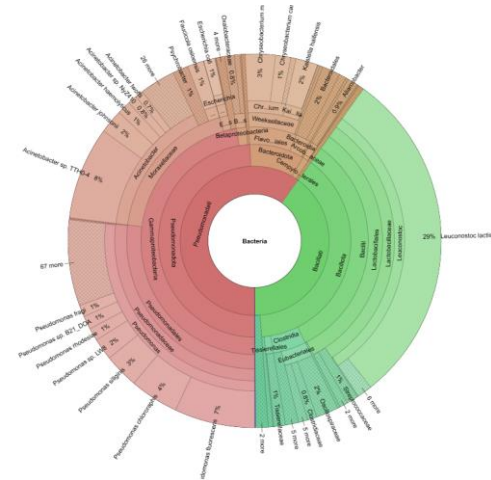
Şekil 18. K4 kontrol ve E19-E20 aşılı örneklerine ait Krona grafikleri.



K6 örneği Krona analiz grafiği



E23 örneği Krona analiz grafiği

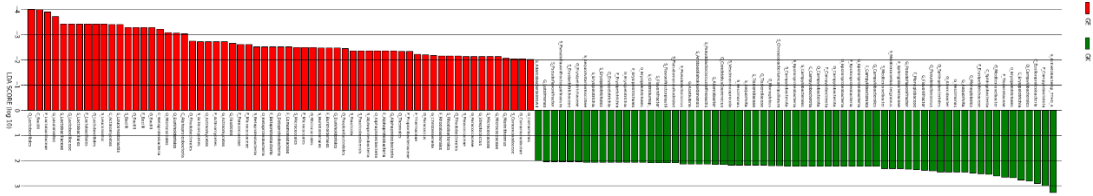


E24 örneği Krona analiz grafiği

Şekil 20. K6 kontrol ve E23-E24 aşıllı örneklerine ait Krona grafikleri.

4.1.9 LEfSe Analizi Bulguları

Genus düzeyinde gerçekleştirilen LEfSe analizi sonucunda aşılı grup (GE) ve kontrol grubu (GK) arasında ayırt edici mikrobiyal taksonlar belirlenmiştir. LDA skor grafiğinde kırmızı renk GE grubunda, yeşil renk ise GK grubunda zenginleşen taksonları göstermektedir (Şekil 21).



Şekil 21. Genus düzeyinde LEfSe (LDA Effect Size) analiz grafiği.

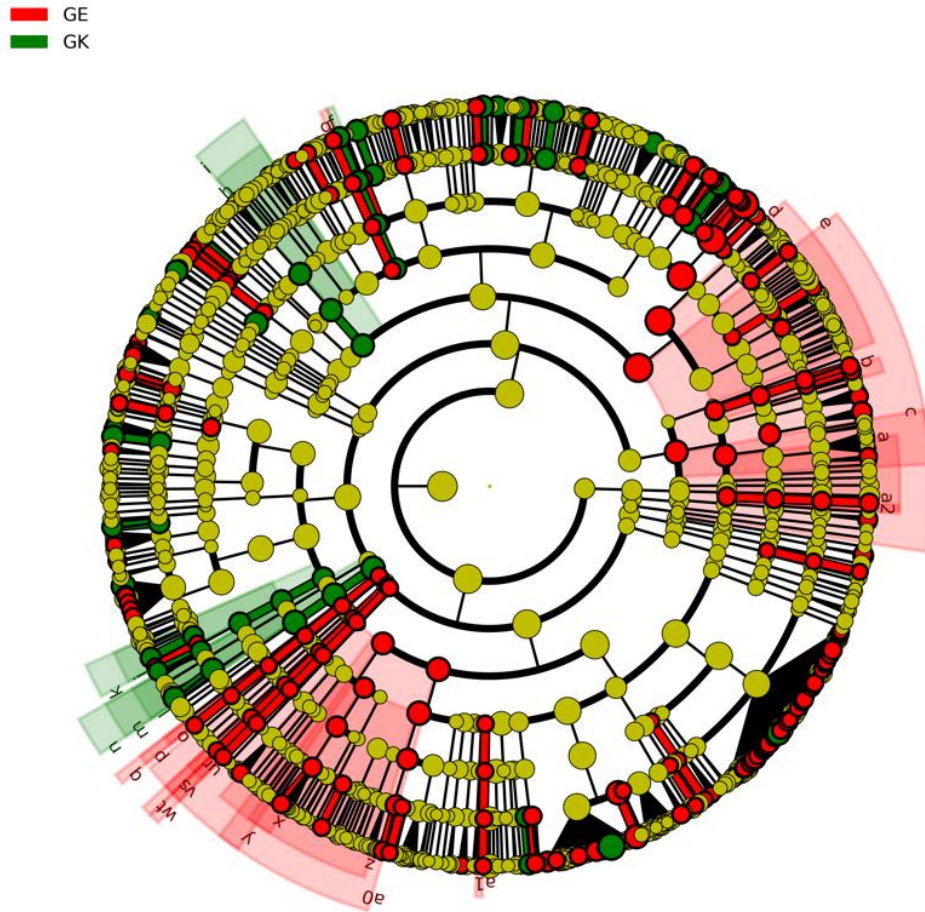
Analiz sonuçlarına göre aşılı grup (GE) örneklerinde özellikle *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Paucilactobacillus* ve *Companilactobacillus* gibi laktik asit bakterileri ile ilişkili genusların yüksek LDA skorları ile öne çıktığı belirlenmiştir. Ayrıca *Lactobacillaceae* ve *Leuconostocaceae* ile ilişkili bazı taksonların da GE grubunda baskın olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, aşılama uygulamasının laktik asit bakterilerinin gelişimini desteklediğini düşündürmektedir.

Kontrol grubu (GK) örneklerinde ise *Aliarcobacter*, *Pseudofulvibacter*, *Flavofractor*, *Mediterraneibacter*, *Tissierella* ve *Erysipelothrix* gibi genusların daha yüksek relatif bolluk gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca *Campylobacterota* ile ilişkili bazı taksonların GK grubunda daha baskın olduğu gözlenmiştir.

LDA skor dağılımları incelendiğinde GE grubunda daha fazla sayıda ayırt edici genus bulunduğu belirlenmiştir. Özellikle fermentasyon süreçleri ve organik asit üretimi ile ilişkili laktik asit bakterilerinin GE grubunda yoğunlaşması, aşılama uygulamasının mikrobiyal kompozisyonu belirli fonksiyonel bakteriler lehine şekillendirebileceğini göstermektedir.

Genel olarak değerlendirildiğinde genus düzeyindeki LEfSe analiz sonuçları, aşılı örneklerde laktik asit bakterileri açısından daha zengin ve homojen bir mikrobiyal yapı bulunduğunu, kontrol grubunda ise daha heterojen bir mikrobiyal dağılım oluştuğunu ortaya koymuştur.

LEfSe kladogramı, aşılı grup (GE) ile kontrol grubu (GK) arasında ayırt edici özellik gösteren bakteriyel taksonların filogenetik dağılımını göstermektedir. Kladogramda merkezden dışa doğru ilerleyen halkalar sırasıyla üst ve alt taksonomik düzeyleri temsil etmektedir. İç halkalarda daha genel taksonomik sınıflandırmalar yer alırken, dış halkalarda genus ve tür düzeyindeki taksonlar gösterilmektedir. Kırmızı renk GE grubunda, yeşil renk GK grubunda zenginleşen taksonları ifade etmektedir. Sarı renkli düğümler ise iki grup arasında belirgin farklılık göstermeyen ortak taksonları temsil etmektedir (Şekil 22).



Şekil 22. Genus düzeyinde LEfSe kladogramı.

Kladogram incelendiğinde, GE grubunda bazı bakteriyel taksonların belirgin şekilde kümelendiği görülmektedir. Özellikle *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weissella* ve diğer fermentasyon ilişkili bakteriler ile bağlantılı taksonların GE grubunda daha baskın olduğu dikkat çekmiştir. GK grubunda ise farklı bakteriyel taksonların zenginleştiği görülmüştür. Özellikle çevresel ve fırsatçı bakteriler ile ilişkili bazı grupların kontrol örneklerinde daha

yüksek relatif bolluk gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum, kontrol grubunda mikrobiyal yapının daha heterojen özellik gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Genel olarak değerlendirildiğinde LEfSe kladogramı, aşı ve kontrol grupları arasında tamamen keskin bir ayrışma olmadığını, ancak belirli bakteriyel taksonların grup bazında farklılaştığını göstermektedir. GE grubunda fermentasyon ilişkili ve yararlı bakteriyel grupların öne çıkması, aşı uygulama uygulamasının süt mikrobiyomu üzerinde düzenleyici etkiler oluşturabileceğini düşündürmektedir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, mastitis aşısı uygulanan süt sığırlarından aşılama öncesi ve sonrası elde edilen süt örneklerinin 16S rRNA gen dizileme temelli mikrobiyom profilleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgular, aşılama sonrası örneklerde mikrobiyal topluluk yapısının tamamen farklılaşmadığını; buna karşın bazı laktik asit bakterileriyle ilişkili taksonların göreceli bolluklarında artış eğilimi bulunduğunu göstermektedir. Beta çeşitlilik analizlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ayrışma saptanmaması, aşılama etkisinin keskin bir kompozisyonel değişimden çok sınırlı ve takson-spesifik farklılıklar şeklinde ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir.

Araştırmamızda elde edilen süt mikrobiyota sonuçları, sağlıklı meme mikrobiyotasının kompleks ve yüksek çeşitlilik gösteren bir bakteriyel topluluk yapısına sahip olduğunu bildiren önceki çalışmalar ile genel olarak uyum göstermiştir. Bhatt ve diğerleri (2012) tarafından gerçekleştirilen çalışmada sağlıklı meme çeyreklerinden elde edilen süt örneklerinde baskın filumların *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* ve *Actinobacteria* olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde Kuehn ve diğerleri (2013), Oikonomou ve diğerleri (2014), Ganda ve diğerleri (2016; 2017) ile Bonsaglia ve diğerleri (2017) tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda da sağlıklı süt mikrobiyotasında benzer filum dağılımlarının bulunduğu belirtilmiştir. Araştırmamızda da baskın filumların *Pseudomonadota*, *Bacillota* ve *Bacteroidota* olduğu belirlenmiştir. Ortalama relatif bolluk değerleri sırasıyla %45,15, %39,23 ve %11,61 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca düşük bollukta bulunan diğer filumlar arasında *Campylobacterota*, *Actinomycetota* ve *Mycoplasmata* yer almıştır. Özellikle E19 örneğinde *Actinomycetota* filumunun relatif bolluğunun diğer örneklere göre daha yüksek olduğu (%4,72) dikkat çekmiştir. Aşılı grup örneklerinde *Pseudomonadota* filumunun relatif bolluğunun genel olarak %40–49 aralığında dağılım gösterdiği belirlenirken, *Bacillota* filumunun relatif bolluğunun çoğu örnekte %36–44 aralığında olduğu görülmüştür. Özellikle E13, E18 ve E24 örneklerinde *Bacillota* oranının diğer örneklere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubunda ise özellikle K1 örneğinde *Bacillota* oranının %64,22 ile diğer tüm örneklerden daha yüksek olduğu dikkat çekmiştir. Genel olarak değerlendirildiğinde her iki grupta da baskın filumların benzer şekilde korunduğu, ancak bazı bakteriyel grupların relatif bolluklarında değişiklikler meydana geldiği görülmüştür.

Bhatt ve diğeri (2012), Oikonomou ve diğeri (2014) ile Ganda ve diğeri (2016; 2017) çalışmalarında sağlıklı süt örneklerinde en sık tespit edilen bakteriyel genuslar arasında *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* ve *Bacteroides* gibi bakterilerin bulunduğu bildirilmiştir. Araştırmamızda ise özellikle *Leuconostoc*, *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* genuslarının dominant olduğu belirlenmiştir. Ortalama relatif bolluk değerleri incelendiğinde *Leuconostoc* yaklaşık %27,51, *Pseudomonas* %21,64 ve *Acinetobacter* %16,25 oranında belirlenmiştir. Literatürde *Pseudomonas*'ın sağlıklı süt mikrobiyotasının doğal üyelerinden biri olarak tanımlanması ile araştırmamızda yüksek oranda tespit edilmesi birbiriyle uyumlu bulunmuştur. *Pseudomonas* cinsinin tüm örneklerde yaygın olarak saptanması, süt örneklerinin çevresel mikrobiyal maruziyeti, sağım/örnekleme koşulları veya düşük biyokütleli örneklerde reaktif kaynaklı sinyal olasılığı dikkate alınarak yorumlanmalıdır. Bununla birlikte araştırmamızda *Leuconostoc* genusunun baskın bulunması dikkat çekici bir sonuç olarak değerlendirilmiştir. Her ne kadar Bhatt ve diğeri (2012) ile Oikonomou ve diğeri (2014) tarafından *Leuconostoc* doğrudan baskın genuslar arasında bildirilmemiş olsa da, aynı çalışmalarda *Lactobacillus* ve diğer laktik asit bakterilerinin sağlıklı süt mikrobiyotasında yer aldığı ifade edilmiştir. Bu nedenle *Leuconostoc*'un yüksek relatif bollukta bulunması, araştırmamızda laktik asit bakterilerinin baskın hale geldiğini düşündürmektedir.

Araştırmamızda gerçekleştirilen LEfSe analizlerinde uygulama grubunda *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Paucilactobacillus* ve *Companilactobacillus* gibi laktik asit bakterilerinin zenginleşmiş olması da bu görüşü desteklemektedir. Laktik asit bakterilerinin mikrobiyal dengeyi koruyucu etkileri olduğu bilinmektedir. Bu nedenle araştırmamızda uygulama sonrasında bu bakterilerin artış göstermesi, süt mikrobiyotasında daha dengeli bir yapı oluşmuş olabileceğini düşündürmektedir.

Derakhshani ve diğeri (2018) mastitisli veya mastitis öyküsü bulunan meme çeyreklerinde mikrobiyal çeşitliliğin azaldığını ve disbiyotik bir yapı oluşabileceğini bildirmiştir. Benzer şekilde Falentin ve diğeri (2016) çalışmasında da mastitis geçmişi bulunan örneklerde Shannon çeşitlilik indeksinin sağlıklı örneklere göre daha düşük olduğu belirtilmiştir. Araştırmamızda Shannon çeşitlilik indeksinin yaklaşık 5,22–6,87 aralığında değiştiği belirlenmiştir. Özellikle bazı kontrol grubu örneklerinde belirli bakteriyel grupların baskın hale geldiği ve çeşitliliğin azalma eğilimi gösterdiği gözlenmiştir. Buna karşın aşılı grup örneklerinde çeşitliliğin genel olarak korunduğu belirlenmiştir. Ancak gruplar arasında

tamamen farklı mikrobiyal toplulukların oluşmadığı, genel mikrobiyal yapının büyük ölçüde benzer şekilde devam ettiği görülmüştür.

Oikonomou ve diğerleri (2014) ile Ganda ve diğerleri (2016; 2017), sağlıklı süt mikrobiyotasında yüksek çeşitlilik ve kommensal bakterilerin bir arada bulunduğunu bildirmiştir. Araştırmamızda da *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* gibi çevresel bakterilerin belirlenmesi, süt mikrobiyotasının yalnızca patojen bakterilerden oluşmadığını ve oldukça kompleks bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, sağlıklı süt mikrobiyotasının steril olmadığı ve farklı bakteriyel toplulukları barındırdığı yönündeki güncel görüşleri desteklemektedir.

Araştırmamızda aşılı grup (E13–E24) ile aşılama öncesi kontrol/bazal grubu (K1–K6) arasında süt mikrobiyomu bakımından tamamen farklı mikrobiyal topluluklar oluşmadığı, ancak bazı bakteriyel grupların relatif bolluklarında değişiklikler meydana geldiği belirlenmiştir. Özellikle aşılı grupta *Pseudomonadota* (*Proteobacteria*) filumuna ait bakterilerin relatif bolluğunun bazı örneklerde daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca *Pseudomonas* cinsine ait OTU abundanslarının özellikle E16, E17, E20 ve E22 örneklerinde arttığı dikkat çekmiştir. Benzer şekilde *Acinetobacter* abundansının da bazı aşılı grup örneklerinde kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Özellikle E17 örneğinde yüksek *Acinetobacter* abundansı dikkat çekmiştir.

Fursova ve diğerleri (2021) tarafından gerçekleştirilen çalışmada mastitisli süt örneklerinde *Proteobacteria*, *Pseudomonadales*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* ve *Streptococcaceae* ilişkili bakterilerde artış olduğu bildirilmiştir. Araştırmamızda da özellikle *Streptococcaceae* ailesinin E13 ve E17 örneklerinde daha yüksek abundans gösterdiği belirlenmiştir. Bunun yanında *Burkholderiales* grubunun da özellikle E17, E20 ve E22 örneklerinde daha yüksek relatif bolluk gösterdiği dikkat çekmiştir. Fursova ve diğerleri (2021) çalışmasında da mastitisli süt örneklerinde *Burkholderiales* üyelerinde artış olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte araştırmamızda bu bakteriyel gruplardaki değişimlerin genel mikrobiyal yapıyı tamamen değiştirmedeği görülmüştür.

Aşılı grup ile kontrol grubu arasındaki bir diğer dikkat çekici farklılık *Lactobacillales* grubu ile ilişkili bakterilerde gözlenmiştir. Özellikle *Lactobacillaceae* ve *Leuconostocaceae* üyelerinin aşılı grupta daha yüksek relatif bolluk gösterdiği belirlenmiştir. E grubunda *Leuconostoc lactis* abundansının yaklaşık 4.529–23.279 arasında değiştiği görülmüştür. Bu durum, aşı uygulamasının yalnızca fırsatçı bakteriler üzerinde değil, aynı zamanda yararlı laktik

asit bakterileri üzerinde de etkili olabileceğini düşündürmektedir. *Leuconostoc* ve *Lactobacillaceae* üyeleri düşük pH oluşturabilmeleri, antimikrobiyal metabolit üretmeleri ve rekabetçi inhibisyon sağlayabilmeleri nedeniyle koruyucu mikrobiyota üyeleri arasında değerlendirilmektedir. Fursova ve diğerleri (2021) çalışmasında *Lactobacillales* grubunun süt mikrobiyotasında bulunduğu belirtilmiş olmakla birlikte, araştırmamızdaki kadar yüksek *Leuconostoc* abundansı bildirilmemiştir. Bu nedenle araştırmamızda belirlenen yüksek *Leuconostoc* düzeyleri dikkat çekici bir bulgu olarak değerlendirilebilir.

Salman ve diğerleri (2023) çalışmasında sağlıklı, subklinik mastitisli ve klinik mastitisli manda sütlerinde mikrobiyal kompozisyon incelenmiş ve örneklerde baskın filumların *Proteobacteria* ve *Firmicutes* olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar sağlıklı grupta *Proteobacteria* filumunun baskın olduğunu (%52,58), buna karşın klinik mastitis grubunda *Firmicutes* filumunun belirgin şekilde arttığını (%58,20) ortaya koymuştur. Ayrıca subklinik mastitis grubunda da *Firmicutes* oranının yüksek olduğu (%49,12) belirlenmiştir. Araştırmamızda ise tüm örneklerde baskın filumların *Pseudomonadota*, *Bacillota* ve *Bacteroidota* olduğu belirlenmiştir. Ancak gruplar arasında tamamen farklı filum dağılımlarının oluşmadığı, genel mikrobiyal yapının büyük ölçüde korunduğu görülmüştür. Bununla birlikte aşılı grup örneklerinde daha homojen bir filum dağılımı eğilimi olduğu dikkat çekmiştir.

Salman ve diğerleri (2023) çalışmasında mastitisli gruplarda özellikle *Streptococcaceae* ve *Staphylococcaceae* familyalarının arttığı bildirilmiştir. Klinik mastitis grubunda *Streptococcaceae* familyasının relatif bolluğunun %33,19'a kadar yükseldiği belirtilmiştir. Araştırmamızda ise familya düzeyindeki dağılımlar değerlendirildiğinde örneklerin genel olarak birbirine yakın mikrobiyal yapılar sergilediği belirlenmiştir. Bunun yanında *Lactobacillaceae* ve *Leuconostocaceae* gibi laktik asit bakterileri ile ilişkili familyaların aşılı grup örneklerinde daha dengeli dağılım gösterdiği dikkat çekmiştir.

Genus düzeyinde Salman ve diğerleri (2023) çalışmasında sağlıklı grupta baskın bakterilerin *Streptococcus*, *Herbaspirillum* ve *Staphylococcus* olduğu bildirilmiştir. Klinik mastitis grubunda ise *Streptococcus* baskınlığının belirgin şekilde arttığı belirtilmiştir. Araştırmamızda ise baskın genusların *Leuconostoc*, *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* olduğu belirlenmiştir. Salman ve diğerleri (2023) çalışmasında bildirilen yoğun *Streptococcus* baskınlığı araştırmamızda gözlenmemiştir. Buna karşılık araştırmamızda laktik asit bakterileri ile ilişkili *Leuconostoc*, *Lactobacillus* ve *Weissella* gibi genusların daha yüksek relatif bolluk göstermesi dikkat çekmiştir.

Salman ve diğeri (2023) çalışmasında klinik mastitis grubunda Shannon çeşitlilik indeksinin azaldığı ve mikrobiyal çeşitliliğin düştüğü bildirilmiştir. Araştırmacılar klinik mastitis grubunda Shannon indeksini 5,50 olarak belirlerken, sağlıklı grupta bu değerin 6,24 olduğunu rapor etmiştir. Araştırmamızda ise Shannon çeşitlilik indeksinin örnekler arasında yaklaşık 5,22–6,87 aralığında değiştiği belirlenmiştir. Genel olarak değerlendirildiğinde aşı grup örneklerinde mikrobiyal çeşitliliğin korunduğu, ancak gruplar arasında tamamen ayrılmış çeşitlilik profilleri oluşmadığı görülmüştür.

Beta çeşitlilik analizleri açısından Salman ve diğeri (2023) çalışmasında PCA analizlerinde örneklerin tamamen ayrılmış kümeler oluşturmadığı, gruplar arasında karışık bir dağılım bulunduğu bildirilmiştir. Araştırmamızda gerçekleştirilen Weighted UniFrac analizlerinde de benzer şekilde örneklerin tamamen ayrılmış kümeler oluşturmadığı belirlenmiştir. Özellikle E16–E17 (0,108), E16–E23 (0,100) ve E17–K3 (0,066) örnek çiftlerinin mikrobiyal kompozisyon açısından birbirine oldukça benzer olduğu görülmüştür. Buna karşılık E14–K5 örnekleri arasında yüksek mesafe (0,849) belirlenmiş ve bazı örneklerde belirgin mikrobiyal farklılaşmalar bulunduğu ortaya konmuştur. Ancak genel olarak değerlendirildiğinde örneklerin büyük bölümünün birbirine yakın mikrobiyal profiller sergilediği ve gruplar arasında keskin ayrılmalar oluşmadığı görülmüştür.

Steinberg ve diğeri (2022) çalışmasında süt mikrobiyotasında baskın filumların *Firmicutes*, *Proteobacteria* ve *Actinobacteria* olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar sağlıklı hayvanlarda *Proteobacteria* oranının daha yüksek, subklinik mastitisli hayvanlarda ise *Firmicutes* oranının arttığını belirtmiştir. Araştırmamızda da benzer şekilde baskın filumların *Pseudomonadota* ve *Bacillota* olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte gruplar arasında tamamen farklı mikrobiyal kompozisyonların oluşmadığı, yalnızca bazı bakteriyel grupların relatif bolluklarında değişimler meydana geldiği görülmüştür.,

Rainard ve diğeri (2021), mastitis aşuları üzerine yaptıkları kapsamlı derlemede, günümüzde kullanılan mastitis aşularının bazı durumlarda klinik mastitis şiddetini azaltabildiğini ancak koruyucu mekanizmalarının halen tam olarak açıklanamadığını bildirmiştir. Araştırmacılar özellikle mevcut aşuların çoğunda enfeksiyonun tamamen önlenemediğini, buna karşın meme dokusunda oluşan inflamasyonun şiddetinin azaltılabildiğini ve süt kayıplarında düşüş sağlanabildiğini belirtmiştir (Rainard ve diğeri, 2021). Bu durum, mastitis aşularının yalnızca spesifik patojenleri hedef alan bir koruma mekanizmasına sahip olmadığını, aynı zamanda meme dokusundaki immün dengeyi ve mikrobiyal yapıyı da etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Mevcut çalışmada elde edilen Krona analiz sonuçları da bu görüşü destekler nitelikte bulunmuştur. Aşılı gruplarda özellikle *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Paucilactobacillus* ve *Companilactobacillus* gibi laktik asit bakterileri ile ilişkili taksonların relatif bolluğunda artış olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık kontrol gruplarında mikrobiyal yapının daha heterojen dağılım gösterdiği, düşük bolluklu çevresel bakterilerin relatif temsilinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Özellikle E13, E18, E20, E22 ve E24 örneklerinde *Leuconostocaceae* ilişkili bakterilerin baskın hale gelmesi, aşılama uygulamasının meme mikrobiyotasında daha stabil bir yapı oluşmasına katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir. Bu durum, aşılama sonrası oluşan koruyucu etkinin yalnızca patojen eliminasyonu ile sınırlı olmayabileceğini göstermektedir.

Rainard ve diğerleri (2021), mastitis aşılarının koruyucu etkinliğinin yalnızca antikor yanıtı ile açıklanamayacağını, özellikle hücresel bağışıklık mekanizmalarının ve T hücre ilişkili immün yanıtların önemli olabileceğini bildirmiştir. Çalışmada özellikle IL-17 ilişkili immün yanıtların meme enfeksiyonlarının kontrolünde rol oynayabileceği vurgulanmıştır (Rainard ve diğerleri, 2021). Ayrıca bazı deneysel çalışmalarda antikor düzeylerinde belirgin artış oluşmamasına rağmen enfeksiyon şiddetinde azalma görülmesi, aşılama sonrası oluşan koruyucu etkinin yalnızca humoral bağışıklık ile sınırlı olmadığını göstermektedir.

Mevcut çalışmada da benzer şekilde aşılı örneklerde mikrobiyal yapının daha homojen hale geldiği ve laktik asit bakterilerinin relatif bolluğunun arttığı belirlenmiştir. Laktik asit bakterilerinin meme mikrobiyotasında koruyucu rol oynayabileceği ve çevresel fırsatçı bakterilerin gelişimini baskılayabileceği bilinmektedir. Bu nedenle aşılı gruplarda gözlenen mikrobiyal değişimlerin, meme dokusunda daha dengeli bir mikrobiyal ekosistem oluşmasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Özellikle kontrol örneklerinde düşük bolluklu çok sayıda çevresel bakterinin bulunması, mikrobiyal yapının daha değişken ve heterojen olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, aşılama uygulamasının süt mikrobiyotası üzerinde düzenleyici etki oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Rainard ve diğerleri (2021), mastitis aşı çalışmalarında bireysel hayvan farklılıklarının önemli olduğunu ve aynı aşılama protokolüne rağmen hayvanlar arasında farklı immün yanıtlar oluşabileceğini bildirmiştir. Mevcut çalışmada da bazı örneklerde farklı mikrobiyal kompozisyonlar dikkat çekmiştir. Özellikle E19 örneğinde diğer aşılı örneklere kıyasla *Leuconostoc* relatif bolluğunun daha düşük olduğu, buna karşılık düşük bolluklu çevresel bakterilerin relatif temsilinin arttığı belirlenmiştir. Bu durumun bireysel mikrobiyota farklılıkları veya hayvanlar arası immün yanıt değişkenliği ile ilişkili olabileceği

düşünülmektedir. Buna rağmen E20 örneğinde daha homojen ve laktik asit bakterileri açısından zenginleşmiş bir yapı gözlenmesi, aynı kontrol grubundan gelen örneklerde dahi aşılama sonrası farklı mikrobiyal yanıtlar gelişebileceğini göstermektedir (Rainard ve diğerleri, 2021).

Araştırmacılar ayrıca mevcut mastitis aşılarının çoğunda koruyucu mekanizmanın tam olarak açıklanamadığını ve mikrobiyal denge üzerindeki etkilerin yeterince araştırılmadığını belirtmiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde mevcut çalışma, yalnızca patojen odaklı değerlendirmeler yerine süt mikrobiyotasının genel kompozisyonundaki değişimlerin de dikkate alınması gerektiğini göstermektedir. Özellikle aşılı gruplarda laktik asit bakterileri ile ilişkili taksonların artış göstermesi, aşılama uygulamasının meme mikrobiyotasında koruyucu bakteriyel toplulukların gelişimini destekleyebileceğini düşündürmektedir. Bu sonuçlar, mastitis aşılarının etkisinin yalnızca enfeksiyon insidansı üzerinden değil, aynı zamanda mikrobiyal homeostazın korunması açısından da değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır (Rainard ve diğerleri, 2021).

Ismail (2017) tarafından yayımlanan bu derleme çalışmasında, mastitis aşılarının süt sığırlarında mastitis insidansını tamamen ortadan kaldırmasa da bazı çalışmalarda hastalık şiddetini azaltabildiği, somatik hücre sayısını düşürebildiği ve süt verimini olumlu yönde etkileyebildiği bildirilmiştir. Araştırmada özellikle *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* kaynaklı mastitislere karşı geliştirilen ticari ve otovaksinlerin farklı düzeylerde koruyucu etki oluşturduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte çalışmada aşı etkinliğinin her çalışmada aynı düzeyde olmadığı ve bazı saha çalışmalarında sınırlı sonuçlar elde edildiği de vurgulanmıştır (Ismail, 2017).

Mevcut çalışmada elde edilen mikrobiyota sonuçları değerlendirildiğinde, aşılı gruplarda özellikle laktik asit bakterileri ile ilişkili taksonların relatif bolluğunda artış olduğu belirlenmiştir. LEfSe analizlerinde *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Paucilactobacillus* ve *Companilactobacillus* gibi bakterilerin aşılı grupta zenginleşmiş olması, aşılama uygulamasının meme mikrobiyotası üzerinde düzenleyici etki oluşturabileceğini düşündürmektedir. Ismail (2017), mastitis aşılarının yalnızca spesifik patojenleri baskılamakla kalmayıp meme sağlığını genel olarak iyileştirebileceğini bildirmiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde mevcut çalışmada gözlenen mikrobiyal değişimlerin literatür ile uyumlu olduğu düşünülmektedir.

Ismail (2017), bazı çalışmalarda Startvac uygulanan sürülerde klinik mastitis şiddetinin azaldığını ve süt veriminde artış gözlendiğini bildirmiştir. Özellikle Bradley ve diğerleri (2015)

tarafından yürütülen saha çalışmasında aşılama sonrasında klinik mastitis vakalarının şiddetinde azalma ve süt üretiminde artış olduğu belirtilmiştir (Ismail, 2017). Buna karşın bazı çalışmalarda ise somatik hücre sayısı, mastitis prevalansı veya süt verimi üzerinde anlamlı değişiklik görülmediği ifade edilmiştir. Özellikle Landin ve diğerleri (2015), ticari polivalan aşının meme sağlığı parametreleri üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığını bildirmiştir (Ismail, 2017). Bu durum, mastitis aşılarının etkinliğinin sürü yapısı, çevresel koşullar, hayvanların mevcut bağışıklık durumu ve mikrobiyota kompozisyonuna bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir.

Mevcut çalışmada da örnekler arasında bireysel farklılıklar dikkat çekmiştir. Özellikle E13, E18, E20, E22 ve E24 örneklerinde *Leuconostocaceae* ilişkili bakterilerin relatif bolluğunun belirgin şekilde arttığı görülürken, E19 örneğinde diğer aşı örneklerine kıyasla daha farklı bir mikrobiyal profil belirlenmiştir. Bu durum, Ismail (2017) tarafından bildirilen bireysel yanıt farklılıkları ile uyumlu bulunmuştur. Aynı aşılama protokolü uygulanmasına rağmen hayvanlar arasında farklı mikrobiyal yanıtların oluşması, meme mikrobiyotasının oldukça dinamik bir yapıya sahip olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmada ayrıca bazı mastitis aşılarının serum ve süt immünoglobulin düzeylerini artırdığı, CD4+ ve CD8+ lenfosit yanıtlarını güçlendirdiği ve nötrofil fagositoz aktivitesini artırabildiği bildirilmiştir (Ismail, 2017). Bu durum, aşılama sonrası yalnızca spesifik patojen baskılanmasının değil, aynı zamanda meme bağışıklık sisteminin genel olarak aktive olmasının da önemli olduğunu göstermektedir. Mevcut çalışmada aşı örneklerinde daha homojen ve laktik asit bakterileri açısından zenginleşmiş bir mikrobiyal yapı belirlenmesi, aşılama sonrası oluşan immün düzenlenmenin mikrobiyota kompozisyonunu etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Ismail (2017), mastitis kontrolünde aşının tek başına yeterli olmadığını; sağımlı hijyeni, enfekte hayvanların kontrolü, uygun tedavi protokolleri ve sürü yönetimi ile birlikte uygulanması gerektiğini vurgulamıştır. Mevcut çalışmada elde edilen mikrobiyota sonuçları da mastitisin yalnızca tek bir patojen ile ilişkili olmadığını, oldukça kompleks ve dinamik bir mikrobiyal ekosistem ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Özellikle aşı gruplarında faydalı bakteriyel toplulukların artış göstermesi, mastitis kontrolünde mikrobiyal kompozisyonun korunmasının önemli olabileceğini düşündürmektedir.

Bradley ve diğerleri (2015) tarafından gerçekleştirilen bu saha çalışmasında, STARTVAC® uygulamasının mastitis insidansını tamamen ortadan kaldırmadığı ancak klinik mastitis şiddetini azaltabildiği ve süt verimi üzerinde olumlu etkiler oluşturduğu bildirilmiştir.

Araştırmacılar özellikle aşılama uygulanan ineklerde klinik mastitis vakalarının daha hafif seyrettiğini, süt verimi ve süt kuru maddesi miktarında artış meydana geldiğini belirtmiştir. Buna karşın klinik ve subklinik mastitis prevalansında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma belirlenmediği ifade edilmiştir (Bradley ve diğerleri, 2015).

Mevcut çalışmada elde edilen mikrobiyota sonuçları değerlendirildiğinde, aşıli gruplarda özellikle *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weissella* ve diğer laktik asit bakterileri ile ilişkili taksonların relatif bolluğunda artış olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık kontrol grubunda çevresel ve düşük bolluklu fırsatçı bakterilerin daha heterojen dağılım gösterdiği gözlenmiştir. Bradley ve diğerleri (2015), aşılama sonrası mastitis şiddetinin azalmasını bağışıklık sisteminin daha kontrollü yanıt oluşturması ile ilişkilendirmiştir. Mevcut çalışmada aşıli örneklerde daha homojen ve stabil bir mikrobiyal yapı gözlenmesi, bu görüşü destekler nitelikte değerlendirilebilir.

Çalışmada ayrıca uygulanan her ek aşının klinik mastitisin şiddetini azaltma olasılığını artırdığı bildirilmiştir. Özellikle “more doses, more protection” yaklaşımıyla birlikte aşı sayısı arttıkça mastitisin daha hafif klinik belirtiler gösterdiği belirtilmiştir (Bradley ve diğerleri, 2015). Bu durum, aşılama sonrası gelişen immün yanıtın zamanla güçlenebileceğini göstermektedir. Mevcut çalışmada da aşıli örneklerin büyük kısmında laktik asit bakterileri ile ilişkili taksonların baskın hale gelmesi, aşılama sonrası meme mikrobiyotasında laktik asit bakterileriyle ilişkili taksonların göreceli temsilinin artabileceği düşündürmektedir.

Bradley ve diğerleri (2015), STARTVAC® uygulanan gruplarda süt veriminde yaklaşık %6, süt kuru maddesinde ise yaklaşık %5 artış gözlendiğini bildirmiştir. Ayrıca aşılanan hayvanlarda sürüden çıkarılma oranının da daha düşük olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlar, aşının yalnızca enfeksiyon kontrolü değil, aynı zamanda hayvan performansı ve sürü sürdürülebilirliği açısından da fayda sağlayabileceğini göstermektedir. Mevcut çalışmada doğrudan süt verimi veya sürüden çıkarılma oranı değerlendirilmemiş olsa da, aşıli gruplarda gözlenen daha dengeli mikrobiyal yapı ve faydalı bakterilerin artışı, meme sağlığının korunmasına katkı sağlayabilecek bir mikrobiyal ortam oluşturduğunu düşündürmektedir.

Araştırmada dikkat çeken bir diğer bulgu ise, aşılanmanın mastitis etkenlerinin tamamen eliminasyonunu sağlamamasına rağmen klinik tabloyu hafifletebilmesidir (Bradley ve diğerleri, 2015). Bu durum, mastitisin yalnızca spesifik patojen varlığı ile açıklanamayacağını ve meme mikrobiyotasındaki genel dengenin de önemli olduğunu göstermektedir. Mevcut çalışmada kontrol grubunda çevresel bakterilerin daha düzensiz dağılım göstermesi, buna karşılık aşıli

örneklerde laktik asit bakterileri ile ilişkili taksonların baskın hale gelmesi, aşılama uygulamasının mikrobiyal homeostaz üzerinde düzenleyici etki oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Bradley ve diğerleri (2015), saha koşullarında aşılama etkinliğinin sürü yapısı, çevresel faktörler ve yönetim uygulamalarına bağlı olarak değişebileceğini de vurgulamıştır. Mevcut çalışmada da örnekler arasında bireysel mikrobiyal farklılıklar belirlenmiştir. Özellikle E19 örneğinde diğer aşılı örneklerle kıyasla farklı mikrobiyal dağılım gözlenmesi, hayvanlar arası bireysel mikrobiyota farklılıklarının aşılama sonrası oluşan yanıt üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Buna karşılık E13, E18, E20, E22 ve E24 örneklerinde *Leuconostocaceae* ilişkili bakterilerin baskın hale gelmesi, aşılama sonrası daha stabil bir mikrobiyal yapı geliştirebileceğini desteklemektedir.

Bu çalışmanın sonuçları değerlendirilirken bazı metodolojik sınırlılıkların da göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Süt örnekleri düşük mikrobiyal biyokütleyle sahip örnekler arasında yer aldığından, reaktif, ekstraksiyon kiti veya çevresel kaynaklı kontaminasyon sinyalleri 16S rRNA gen dizileme sonuçlarını etkileyebilmektedir. Bu nedenle elde edilen bulgular bu olasılık dikkate alınarak yorumlanmalıdır. Gelecekte gerçekleştirilecek çalışmalarda ekstraksiyon blank kontrolü, PCR negatif kontrolü ve mock community kontrolü gibi kalite kontrol adımlarının eklenmesi, mikrobiyal profillerin daha güvenilir şekilde değerlendirilmesine katkı sağlayacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, mastitis aşısı uygulanan süt sığırlarından aşılama öncesi ve sonrası elde edilen süt örneklerinin 16S rRNA gen dizileme temelli mikrobiyom profilleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgular, aşılama sonrası süt mikrobiyotasının tamamen yeniden şekillenmediğini, ancak bazı bakteriyel taksonların göreceli bolluklarında değişiklikler oluşabileceğini göstermiştir.

Filum düzeyindeki analizlerde tüm örneklerde baskın grupların *Pseudomonadota*, *Bacillota* ve *Bacteroidota* olduğu belirlenmiştir. Gruplar arasında temel mikrobiyal yapının büyük ölçüde korunduğu görülmüş, ancak aşılı grup örneklerinde mikrobiyal dağılımın daha homojen bir eğilim sergilediği dikkat çekmiştir. Bu durum, süt mikrobiyotasının çevresel faktörler, bireysel farklılıklar, bağışıklık yanıtı ve mikrobiyal etkileşimler gibi çok sayıda faktörden etkilenen dinamik bir ekosistem olduğunu desteklemektedir.

Cins düzeyindeki analizlerde *Leuconostoc*, *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* en baskın taksonlar arasında yer almıştır. Özellikle aşılı grup örneklerinde *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Paucilactobacillus* ve *Companilactobacillus* gibi laktik asit bakterileriyle ilişkili cinslerin daha yüksek göreceli bolluk göstermesi dikkat çekici bulunmuştur. Bununla birlikte, bu bulgunun doğrudan koruyucu veya fonksiyonel bir etki olarak yorumlanabilmesi için tür düzeyinde doğrulama, kültür temelli analizler ve fonksiyonel metagenomik çalışmalar gereklidir.

LEfSe analizlerinde aşılı grup örneklerinde *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Paucilactobacillus* ve *Companilactobacillus* ayırt edici biyobelirteçler olarak belirlenirken; kontrol grubunda *Aliarcobacter*, *Pseudofulvibacter*, *Flavofractor*, *Mediterraneibacter*, *Tissierella* ve *Erysipelothrix* cinslerinin daha yüksek göreceli bolluk gösterdiği saptanmıştır. Bu sonuçlar, aşılama uygulamasının süt mikrobiyotasının genel kompozisyonunu tamamen değiştirmedeğini, ancak belirli bakteriyel grupların dağılımı üzerinde seçici etkiler oluşturabileceğini göstermektedir.

Alfa çeşitlilik analizlerinde özellikle Chao1 indeksine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunması, aşılama sonrası dönemde tür zenginliği bakımından değişiklik oluşabileceğini düşündürmektedir. Buna karşın Shannon çeşitlilik indekslerinin benzer aralıklarda seyretmesi, süt mikrobiyotasının temel yapısının korunduğunu

göstermektedir. Aşılı grup örneklerinde tür zenginliğinin genel olarak daha yüksek bulunması, aşılamanın mikrobiyal çeşitlilik üzerinde etkili olabileceğini ortaya koymaktadır.

Beta çeşitlilik analizlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ayrışma saptanmamış, örneklerin tamamen farklı kümeler oluşturmadığı belirlenmiştir. Bu bulgu, aşılama etkisinin genel mikrobiyal topluluk yapısını tamamen değiştirmekten çok, belirli taksonların göreceli bollukları ve örnekler arası dağılım eğilimleri üzerinden ortaya çıkabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte aşılı grup örneklerinde daha homojen bir kümelenme eğilimi gözlenmiştir.

Araştırma bulguları, süt mikrobiyotasının yalnızca mastitis varlığına bağlı olarak şekillenmediğini; çevresel koşullar, bireysel farklılıklar, hayvanların klinik geçmişi, bağışıklık yanıtı ve mikrobiyal rekabet gibi çok sayıda faktörden etkilenebilen dinamik bir ekosistem olduğunu ortaya koymuştur. Bu durum, mastitisin yalnızca spesifik patojenlerle ilişkili enfeksiyöz bir hastalık olarak değil, aynı zamanda süt mikrobiyotasındaki ekolojik denge ile ilişkili kompleks bir süreç olarak değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir.

Ayrıca süt örneklerinin düşük mikrobiyal biyokütleyle sahip olması nedeniyle reaktif, ekstraksiyon kiti veya çevresel kaynaklı kontaminasyon sinyallerinin 16S rRNA gen dizileme sonuçlarını etkileyebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle elde edilen bulguların yorumlanmasında bu olasılık dikkate alınmalıdır. Gelecekte gerçekleştirilecek çalışmalarda ekstraksiyon blank kontrolü, PCR negatif kontrolü ve mock community kontrolü gibi kalite kontrol uygulamalarının kullanılması önerilmektedir.

Sonuç olarak, mastitis aşılmasının süt mikrobiyomu üzerindeki etkisi keskin bir kompozisyonel değişimden ziyade, sınırlı taksonomik farklılıklar ve daha homojen mikrobiyal dağılım eğilimi şeklinde değerlendirilebilir. Daha geniş örneklem büyüklüğüne sahip, bireysel eşleştirmeyi koruyan, negatif kontrol içeren ve uzunlamasına tasarlanan çalışmalarla bu bulguların doğrulanması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Abdi, R.D., Gillespie, B.E., Ivey, S., Pighetti, G.M., Almeida, R.A. ve Kerro Dego, O. (2021). Antimicrobial resistance of major bacterial pathogens from dairy cows with high somatic cell count and clinical mastitis. *Animals*, 11, 131. doi:10.3390/ani11010131

Aghamohammadi, M., Haine, D., Kelton, D.F., Barkema, H.W., Hogeveen, H., Keefe, G.P. ve Dufour, S. (2018). Herd-level mastitis-associated costs on Canadian dairy farms. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 100. doi:10.3389/fvets.2018.00100

Ashraf, A. ve Imran, M. (2020). Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. *Animal Health Research Reviews*, 21, 36-49. doi:10.1017/S1466252319000094

Babra, C., Tiwari, J.G., Pier, G., Thein, T.H., Sunagar, R., Sundareshan, S., Isloor, S., Hegde, N.R., de Wet, S., Deighton, M. ve diğerleri. (2013). The persistence of biofilm-associated antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical bovine mastitis cases in Australia. *Folia Microbiologica*, 58, 469-474. doi:10.1007/s12223-013-0234-0

Barkema, H.W., Schukken, Y.H. ve Zadoks, R.N. (2006). Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science*, 89(6), 1877-1895. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72256-1

Barlow, J.W., White, L.J., Zadoks, R.N. ve Schukken, Y.H. (2013). A mathematical model demonstrating indirect effects of lactation therapy targeting *Staphylococcus aureus* mastitis. *Preventive Veterinary Medicine*, 112(3-4), 273-283. doi:10.1016/j.prevetmed.2013.08.005

Bonsaglia, E.C., Gomes, M.S., Canisso, I.F., Zhou, Z., Lima, S.F., Rall, V.L., Oikonomou, G., Bicalho, R.C. ve 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, 8067. doi:10.1038/s41598-017-08779-9

Bradley, A.J., Breen, J.E., Payne, B., White, V. ve Green, M.J. (2015). An investigation of the efficacy of a polyvalent mastitis vaccine using different vaccination regimens under field conditions. *Journal of Dairy Science*, 98, 1709-1720. doi:10.3168/jds.2014-8893

Burvenich, C., Detilleux, J., Paape, M. ve Massart-Leen, A. (2000). Physiological and genetic factors that influence the cows resistance to mastitis, especially during early lactation. A. Zecconi (Ed.), *Proceedings of the IDF Symposium on Immune Ruminant Mammary Gland* içinde (ss. 9-20). Stresa, Italy.

Castelani, L., Arcaro, J.R.P., Braga, J.E.P., Bosso, A.S., Moura, Q., Esposito, F., Sauter, I.P., Cortez, M. ve Lincopan, N. (2019). Activity of nisin, lipid bilayer fragments and cationic nisin-lipid nanoparticles against multidrug-resistant *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, 102, 678-683. doi:10.3168/jds.2018-15437

Chakraborty, S., Dhama, K., Tiwari, R., Iqbal Yatoo, M., Khurana, S.K., Khandia, R., Munjal, A., Munuswamy, P., Kumar, M.A., Singh, M. ve diğerleri. (2019). Technological interventions and advances in the diagnosis of intramammary infections in animals with emphasis on bovine population: A review. *Veterinary Quarterly*, 39, 76-94. doi:10.1080/01652176.2019.1642543

Chang, B.S., Moon, J.S., Kang, H.M., Kim, Y.I., Le, H.K., Kim, J.D., Lee, B.S., Koo, H.C. ve Park, Y.H. (2008). Protective effects of recombinant *Staphylococcal enterotoxin* type C mutant vaccine against experimental bovine infection by a strain of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical mastitis in dairy cattle. *Vaccine*, 26, 2081-2091. doi:10.1016/j.vaccine.2008.02.014

Collado, R., Prenafeta, A., González-González, L., Pérez-Pons, J.A. ve Sitjà, M. (2016). Probing vaccine antigens against bovine mastitis caused by *Streptococcus uberis*. *Vaccine*, 34, 3848-3854. doi:10.1016/j.vaccine.2016.05.046

Côté-Gravel, J. ve Malouin, F. (2019). Symposium review: Features of *Staphylococcus aureus* mastitis pathogenesis that guide vaccine development strategies. *Journal of Dairy Science*, 102, 4727-4740. doi:10.3168/jds.2018-15438

Czernomysy-Furowicz, D., Fijalkowski, K., Silecka, A., Karakulska, J., Nawrotek, P., Drozd, R., Ferlas, M., Borkowski, J. ve Jankowiak, D. (2014). Herd-specific autovaccine and antibiotic treatment in elimination of *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cattle. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 38, 1-5. doi:10.3906/vet-1305-38

Dalanezi, F.M., Joaquim, S.F., Guimarães, F.F., Guerra, S.T., Lopes, B.C., Schmidt, E.M.S., Cerri, R.L.A. ve Langoni, H. (2020). Influence of pathogens causing clinical mastitis on reproductive variables of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 103, 3648-3655. doi:10.3168/jds.2019-17738

De Vliegher, S., Fox, L.K., Piepers, S., McDougall, S. ve Barkema, H.W. (2012). Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *Journal of Dairy Science*, 95, 1025-1040. doi:10.3168/jds.2011-4666

Denis, M., Wedlock, D.N., Lacy-Hulbert, S.J., Hillerton, J.E. ve Buddle, B.M. (2009). Vaccines against bovine mastitis in the New Zealand context: What is the best way forward? *New Zealand Veterinary Journal*, 57, 132-140. doi:10.1080/00480169.2009.36892

des Roches, A.D.B., Lussert, A., Faure, M., Herry, V., Rainard, P., Durand, D., Françoise, W. ve Foucras, G. (2018). Dairy cows under experimentally-induced *Escherichia coli* mastitis show negative emotional states assessed through qualitative behaviour assessment. *Applied Animal Behaviour Science*, 206, 1-11.

Falentin, H., Rault, L., Nicolas, A., Bouchard, D.S., Lassalas, J., Lambertson, P., Aubry, J.-M., Marnet, P.G., Le Loir, Y. ve 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. doi:10.3389/fmicb.2016.00480

Fox, L.K. (2009). Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis. *Veterinary Microbiology*, 134, 82-88.

Frazilio, D.A., De Almeida, O.G.G., De Oliveira, C.A.F., Lee, S.H.I., Corassin, C.H., Alves, V.F. ve De Martinis, E.C.P. (2020). Metataxonomics contributes to unravel the microbiota of a Brazilian dairy. *Journal of Dairy Research*, 87, 360-363. doi:10.1017/S0022029920000513

Freick, M., Frank, Y., Steinert, K., Hamedy, A., Passarge, O. ve Sobiraj, A. (2016). Mastitis vaccination using a commercial polyvalent vaccine or a herd-specific *Staphylococcus aureus* vaccine: Results of a controlled field trial on a dairy farm. *Tierärztliche Praxis*, 44, 219-229.

Fursova, K.K., Sokolov, S.L., Shchannikov, M.P., Nikanova, D.A., Artem'eva, O.A., Kolodina, E.N. ve Brovko, F.A. (2021). Changes in the microbiome of milk in cows with mastitis. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, 76(3), 165-172. doi:10.1134/S1607672921020046

Ganda, E., Beck, K.L., Haiminen, N., Silverman, J.D., Kawas, B., Cronk, B.D., Anderson, R.R., Goodman, L.B. ve Wiedmann, M. (2021). DNA extraction and host depletion methods

significantly impact and potentially bias bacterial detection in a biological fluid. *mSystems*, 6, e00619-21. doi:10.1128/mSystems.00619-21

Ganda, E.K., Bisinotto, R.S., Lima, S.F., Kronauer, K., Decter, D.H., Oikonomou, G., Schukken, Y.H. ve 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, 37565. doi:10.1038/srep37565

Ganda, E.K., Gaeta, N., Sipka, A., Pomeroy, B., Oikonomou, G., Schukken, Y.H. ve 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, 74. doi:10.1186/s40168-017-0281-1

Geary, U., Lopez-Villalobos, N., Begley, N., McCoy, F., O'Brien, B., O'Grady, L. ve Shalloo, L. (2012). Estimating the effect of mastitis on the profitability of Irish dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 95, 3662-3673.

Gomes, F. ve Henriques, M. (2016). Control of bovine mastitis: Old and recent therapeutic approaches. *Current Microbiology*, 72, 377-382. doi:10.1007/s00284-015-0958-8

Gorden, P.J., Kleinhenz, M.D., Ydstie, J.A., Brick, T.A., Slinden, L.M., Peterson, M.P., Straub, D.E. ve Burkhardt, D.T. (2018). Efficacy of vaccination with a *Klebsiella pneumoniae* siderophore receptor protein vaccine for reduction of *Klebsiella* mastitis in lactating cattle. *Journal of Dairy Science*, 101, 10398-10408. doi:10.3168/jds.2017-14267

Gruet, P., Maincent, P., Berthelot, X. ve Kaltsatos, V. (2001). Bovine mastitis and intramammary drug delivery: Review and perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50, 245-259.

Guo, X., Yu, Z., Zhao, F., Sun, Z., Kwok, L.Y. ve Li, S. (2021). Both sampling seasonality and geographic origin contribute significantly to variations in raw milk microbiota, but sampling seasonality is the more determining factor. *Journal of Dairy Science*, 104, 10609-10627. doi:10.3168/jds.2021-20437

Halasa, T., Huijps, K., Osteras, O. ve Hogeveen, H. (2007). Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary Quarterly*, 29, 18-31. doi:10.1080/01652176.2007.9695224

Halloran, M.E., Haber, M., Longini, I.M. ve Struchiner, C.J. (1997). Direct and indirect effects in vaccine efficacy and effectiveness. *American Journal of Epidemiology*, 146(7), 569-578. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a009313

Hogeveen, H., Steeneveld, W. ve Wolf, C.A. (2019). Production diseases reduce the efficiency of dairy production: A review of the results, methods, and approaches regarding the economics of mastitis. *Annual Review of Resource Economics*, 11, 289-312.

Hornik, B., Czarny, J., Staninska-Pięta, J., Wolko, Ł., Cyplik, P. ve Piotrowska-Cyplik, A. (2021). The raw milk microbiota from semi-subsistence farms characterized by NGS analysis method. *Molecules*, 26, 5029. doi:10.3390/molecules26165029

Huijps, K., Lam, T.J. ve Hogeveen, H. (2008). Costs of mastitis: Facts and perception. *Journal of Dairy Research*, 75, 113-120. doi:10.1017/S0022029907002932

Hussein, H.A., El-Razik, K., Gomaa, A.M., Elbayoumy, M.K., Abdelrahman, K.A. ve Hosein, H.I. (2018). Milk amyloid A as a biomarker for diagnosis of subclinical mastitis in cattle. *Veterinary World*, 11, 34-41. doi:10.14202/vetworld.2018.34-41

Ismail, Z.B. (2017). Mastitis vaccines in dairy cows: Recent developments and recommendations of application. *Veterinary World*, 10(9), 1057-1062. doi:10.14202/vetworld.2017.1057-1062

Izquierdo, A.C., Guerra Liera, J.E., Cervantes, R.E., Inzunza Castro, J.F., Villa Mancera, E.A., Huerta Crispin, R., Juarez Mosqueda, M.d.L., Vazquez, A.G., Olivares Perez, J., Aparicio, P.S. ve diğeri. (2017). Production of milk and bovine mastitis. *Advances in Dairy Research*, 5, 2. doi:10.4172/2329-888X.1000171

Jeršek, A.K. (2014). Evaluation of different methods for DNA extraction from milk. *Journal of Food and Nutrition Research*, 53, 97-104.

Kaczorowski, Ł., Powierska-Czarny, J., Wolko, Ł., Piotrowska-Cyplik, A., Cyplik, P. ve Czarny, J. (2022). The influence of bacteria causing subclinical mastitis on the structure of the cow's milk microbiome. *Molecules*, 27, 1829. doi:10.3390/molecules27061829

Kovačević, Z., Samardžija, M., Horvat, O., Tomanić, D., Radinović, M., Bijelić, K., Vukomanović, A.G. ve Kladar, N. (2022). Is there a relationship between antimicrobial use and antibiotic resistance of the most common mastitis pathogens in dairy cows? *Antibiotics*, 12, 3. doi:10.3390/antibiotics12010003

Kuehn, J.S., Gorden, P.J., Munro, D., Rong, R., Dong, Q., Plummer, P.J., Wang, C. ve Phillips, G.J. (2013). Bacterial community profiling of milk samples as a means to understand culture-negative bovine clinical mastitis. *PLoS One*, 8, e61959. doi:10.1371/journal.pone.0061959

Lam, T.J.G.M., Schukken, Y.H., van Vliet, J.H., Grommers, F.J., Tielen, M.J.M. ve Brand, A. (1997). Effect of natural infection with minor pathogens on susceptibility to natural infection with major pathogens in the bovine mammary gland. *American Journal of Veterinary Research*, 58(1), 17-22.

Landin, H., Jansson, M., Larsson, M.M. ve Waller, K.P. (2015). Vaccination against *Staphylococcus aureus* mastitis in two Swedish dairy herds. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 57, 81. doi:10.1186/s13028-015-0172-3

Lee, J.W., O'Brien, C.N., Guidry, A.J., Paape, M.J., Shafer-Weaver, K.A. ve Zhao, X. (2005). Effect of a trivalent vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis on lymphocyte subpopulations, antibody production, and neutrophil phagocytosis. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 69, 11-18.

Leitner, G., Yadlin, N., Lubashevsky, E., Ezra, E., Glickman, A., Chaffer, M., Winkler, M., Saran, A. ve Trainin, Z. (2003). Development of a *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows II: Field trial. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 93, 153-158. doi:10.1016/S0165-2427(03)00045-7

Li, L., Renye, J.A., Feng, L., Zeng, Q., Tang, Y., Huang, L., Ren, D. ve Yang, P. (2016). Characterization of the indigenous microflora in raw and pasteurized buffalo milk during storage at refrigeration temperature by high-throughput sequencing. *Journal of Dairy Science*, 99, 7016-7024. doi:10.3168/jds.2016-10955

Lima, S.F., Teixeira, A.G.V., Lima, F.S., Ganda, E.K., Higgins, C.H., Oikonomou, G. ve Bicalho, R.C. (2017). The bovine colostrum microbiome and its association with clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 100, 3031-3042. doi:10.3168/jds.2016-12039

Mata, F., Jesus, M.S., Pinto, R.P. ve Mata, A. (2023). A meta-analysis of the mastitis vaccination efficacy in dairy cattle. *Open Veterinary Journal*, 13(2), 179-187. doi:10.5455/OVJ.2023.v13.i2.5

Mellenberger, R.W. (1977). Vaccination against mastitis. *Journal of Dairy Science*, 60, 1016-1021.

Menichetti, B.T., Garcia-Guerra, A., Lakritz, J., Weiss, W.P., Velez, J.S., Bothe, H., Merchan, D. ve Schuenemann, G.M. (2021). Effects of prepartum vaccination timing relative to pen change with an acidogenic diet on serum and colostrum immunoglobulins in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 104, 11072-11081.

Metzger, S.A., Hernandez, L.L., Suen, G. ve Ruegg, P.L. (2018). Understanding the milk microbiota. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 34, 427-438. doi:10.1016/j.cvfa.2018.06.002

Michie, C.A. (2002). Staphylococcal vaccines. *Trends in Immunology*, 23, 461-463.

Middleton, J.R., Luby, C.D. ve Adams, S.D. (2009). Efficacy of vaccination against staphylococcal mastitis: A review and new data. *Veterinary Microbiology*, 134, 192-198. doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.012

Moscone, V., Skeie, S.B. ve Porcellato, D. (2025). Changes in milk microbiota and spore content during milk processing unit operations. *International Dairy Journal*, 168, 106293. doi:10.1016/j.idairyj.2025.1062937

Nikoloudaki, O., Lemos Junior, W.J.F., Borruso, L., Campanaro, S., De Angelis, M., Vogel, R.F., Di Cagno, R. ve Gobbetti, M. (2021). How multiple farming conditions correlate with the composition of the raw cow's milk lactic microbiome. *Environmental Microbiology*, 23, 1702-1716. doi:10.1111/1462-2920.15360

O'Donnell, M.M., Harris, H.M., Ross, R.P. ve O'Toole, P.W. (2017). Core fecal microbiota of domesticated herbivorous ruminant, hindgut fermenters, and monogastric animals. *MicrobiologyOpen*, 6(5), e00509. doi:10.1002/mbo3.509

Oikonomou, G., Bicalho, M.L., Meira, E., Rossi, R.E., Foditsch, C., Machado, V.S., Teixeira, A.G.V., Santisteban, C., Schukken, Y.H. ve Bicalho, R.C. (2014). Microbiota of cow's milk: Distinguishing healthy, sub-clinically and clinically diseased quarters. *PLoS One*, 9, e85904. doi:10.1371/journal.pone.0085904

Oikonomou, G., Machado, V.S., Santisteban, C., Schukken, Y.H. ve Bicalho, R.C. (2014). Microbial diversity of bovine mastitic milk as described by pyrosequencing of metagenomic 16S rRNA gene amplicons. *PLoS ONE*, 9(4), e95971. doi:10.1371/journal.pone.0095971

Pang, M., Xie, X., Bao, H., Sun, L., He, T., Zhao, H., Zhou, Y., Zhang, L., Zhang, H., Wei, R. ve diğerleri. (2018). Insights into the bovine milk microbiota in dairy farms with

different incidence rates of subclinical mastitis. *Frontiers in Microbiology*, 9, 406101. doi:10.3389/fmicb.2018.00406

Park, Y.K., Fox, L.K., Hancock, D.D., McMahan, W. ve Park, Y.H. (2012). Prevalence and antibiotic resistance of mastitis pathogens isolated from dairy herds transitioning to organic management. *Journal of Veterinary Science*, 13, 103-105. doi:10.4142/jvs.2012.13.1.103

Pascu, C., Herman, V., Iancu, I. ve Costinar, L. (2022). Etiology of mastitis and antimicrobial resistance in dairy cattle farms in the western part of Romania. *Antibiotics*, 11, 57. doi:10.3390/antibiotics11010057

Petersson-Wolfe, C.S., Leslie, K.E. ve Swartz, T.H. (2018). An update on the effect of clinical mastitis on the welfare of dairy cows and potential therapies. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 34, 525-535.

Piepers, S., Prenafeta, A., Verbeke, J., De Visscher, A., March, R. ve De Vliegher, S. (2016). Immune response after an experimental intramammary challenge with killed *Staphylococcus aureus* in cows and heifers vaccinated and not vaccinated with Startvac, a polyvalent mastitis vaccine. *Journal of Dairy Science*, 100, 769-782. doi:10.3168/jds.2016-11546

Pinheiro Machado, G.T., Veleirinho, M.B., Mazzarino, L., Machado Filho, L.C.P., Maraschin, M., Cerri, R.L.A. ve Kuhnen, S. (2019). Development of propolis nanoparticles for the treatment of bovine mastitis: In vitro studies on antimicrobial and cytotoxic activities. *Canadian Journal of Animal Science*, 99, 713-723. doi:10.1139/cjas-2018-0192

Prenafeta, A., March, R., Foix, A., Casals, I. ve Costa, L. (2010). Study of the humoral immunological response after vaccination with a *Staphylococcus aureus* biofilm-embedded bacterin in dairy cows: Possible role of the exopolysaccharide specific antibody production in the protection from *Staphylococcus aureus* induced mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 134, 208-217. doi:10.1016/j.vetimm.2009.10.018

Pyörälä, S. (2002). New strategies to prevent mastitis. *Reproduction in Domestic Animals*, 37, 211-216.

Rahman, M.T., Sobur, M.A., Islam, M.S., Ievy, S., Hossain, M.J., El Zowalaty, M.E., Rahman, A.T. ve Ashour, H.M. (2020). Zoonotic diseases: Etiology, impact, and control. *Microorganisms*, 8, 1405. doi:10.3390/microorganisms8091405

Rainard, P. (2017). Mammary microbiota of dairy ruminants: Fact or fiction? *Veterinary Research*, 48, 25. doi:10.1186/s13567-017-0429-2

Rainard, P., Durand, D., Françoise, W. ve Foucras, G. (2018). Dairy cows under experimentally-induced *Escherichia coli* mastitis show negative emotional states assessed through qualitative behaviour assessment. *Applied Animal Behaviour Science*, 206, 1-11.

Rainard, P., Gilbert, F.B., Germon, P. ve Foucras, G. (2021). Invited review: A critical appraisal of mastitis vaccines for dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 104, 10427-10448. doi:10.3168/jds.2021-20434

Razooqi, M.A., Mounam, M. ve Saleem, H.D. (2021). Changes in cows' milk quantity and quality due to bacterial contamination. *Natural Volatiles and Essential Oils Journal*, 8, 2550-2561.

Reksen, O., Solverød, L. ve Branscum, A.J. (2012). Relationships between milk culture results and treatment outcomes for clinical mastitis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95(9), 5344-5352. doi:10.3168/jds.2012-5457

Rodrigues, M.X., Lima, S.F., Canniatti-Brazaca, S.G. ve Bicalho, R.C. (2017). The microbiome of bulk tank milk: Characterization and associations with somatic cell count and bacterial count. *Journal of Dairy Science*, 100, 2536-2552. doi:10.3168/jds.2016-12062

Rollin, E., Dhuyvetter, K.C. ve Overton, M.W. (2015). The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. *Preventive Veterinary Medicine*, 122, 257-264. doi:10.1016/j.prevetmed.2015.09.006

Ruegg, P.L. (2017). A 100-year review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of Dairy Science*, 100, 10381-10397.

Ruegg, P.L. (2022). The bovine milk microbiome—An evolving science. *Domestic Animal Endocrinology*, 79, 106708. doi:10.1016/j.domaniend.2022.106708

Salman, M.M., Nawaz, M., Yaqub, T. ve Mushtaq, M.H. (2023). Exploring the milk microbiota of healthy and mastitic Nili Ravi buffalo using 16S rRNA gene base metagenomic analysis. *Animals*, 13(5), 874. doi:10.3390/ani13050874

Schukken, Y.H., Bronzo, V., Locatelli, C., Pollera, C., Rota, N., Casula, A., Testa, F., Scaccabarozzi, L., March, R., Zalduendo, D., Guix, R., Moroni, P. ve Ruegg, P.L. (2014). Efficacy of a *Staphylococcus aureus* vaccine to reduce new intramammary infections and

clinical mastitis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 97(1), 427-438. doi:10.3168/jds.2013-6883

Secchi, G., Bisutti, V., Toscano, A., Pegolo, S., Giannuzzi, D., Cecchinato, A., Bittante, G. ve Franciosi, E. (2025). Changes in the milk and fecal microbiota in Holstein cows with subclinical intramammary infection. *Journal of Dairy Science*, 108, 10220-10236. doi:10.3168/jds.2024-XXXXX

Silva, S.R., Araujo, J.P., Guedes, C., Silva, F., Almeida, M. ve Cerqueira, J. (2021). Precision technologies to address dairy cattle welfare: Focus on lameness, mastitis and body condition. *Animals*, 11, 2253.

Skowron, K., Sękowska, A., Kaczmarek, A., Grudlewska, K., Budzyńska, A., Białucha, A. ve Gospodarek-Komkowska, E. (2019). Comparison of the effectiveness of dipping agents on bacteria causing mastitis in cattle. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 26, 39-45. doi:10.26444/aaem/93817

Slobodanka, V., Pavlović, M., Pavlović, V. ve Sonja, O. (2008). Immunoprophylaxis of *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows. *Acta Veterinaria (Beograd)*, 58, 221-230.

Steinberg, R.S., Silva e Silva, L.C., Souza, M.R., Reis, R.B., Silva, P.C.L., Lacorte, G.A., Nicoli, J.R., Neumann, E. ve Nunes, A.V. (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. doi:10.1007/s10123-022-00267-4

Tanćin, V. ve Uhrinćat, M. (2014). The effect of somatic cell on milk yield and milk flow at quarter level. *Veterinarija Ir Zootehnika*, 66, 69-72.

Tashakkori, N., Khoramian, B., Farhoodi, M.M., Moghadam, M., Heidarpour, M., Mashayekhi, K. ve Farzaneh, N. (2019). Evaluating the effectiveness of two bovine mastitis vaccines and their influences on oxidant and antioxidant capacities of milk. *Tropical Animal Health and Production*, 52, 1493-1501. doi:10.1007/s11250-019-02156-x

Urrutia-Angulo, L., Ocejó, M., Oporto, B., Aduriz, G., Lavín, J.L. ve Hurtado, A. (2024). Unravelling the complexity of bovine milk microbiome: Insights into mastitis through enterotyping using full-length 16S-metabarcoding. *Animal Microbiome*, 6, 58. doi:10.1186/s42523-024-00315-7

Velázquez-Ordoñez, V., Valladares-Carranza, B., Tenorio-Borroto, E., Talavera-Rojas, M., Varela-Guerrero, J.A., Acosta-Dibarrat, J., Puigvert, F., Grille, L., González Revello, Á. ve Pareja, L. (2019). Microbial contamination in milk quality and health risk of the consumers of raw milk and dairy products. *Nutrition in Health and Disease—Our Challenges Now and Forthcoming Time*. doi:10.5772/intechopen.86182

Wilson, D.J. ve González, R.N. (2003). Vaccination strategies for reducing clinical severity of coliform mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 19, 187-197.

Wilson, D.J., Mallard, B.A., Burton, J.L., Schukken, Y.H. ve Grohn, Y.T. (2009). Association of *Escherichia coli* J5-specific serum antibody responses with clinical mastitis outcome for J5 vaccinated and control dairy cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16, 209-217. doi:10.1128/CVI.00356-08

Yang, J., Wu, N., Xiong, Y., Nobrega, D.B., Barkema, H.W., Han, B. ve Gao, J. (2025). Differences in milk microbiota between healthy cows and those with recurring *Klebsiella* mastitis. *One Health Advances*, 3, 33. doi:10.1186/s44280-025-00033-0

Zhu, H., Miao, R., Tao, X., Wu, J., Liu, L., Qu, J., Liu, H., Sun, Y., Li, L. ve Qu, Y. (2023). Longitudinal changes in milk microorganisms in the first two months of lactation of primiparous and multiparous cows. *Animals*, 13, 1923. doi:10.3390/ani13121923

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

“Mastitis Aşısı Yapılan İneklerin Süt Mikrobiyomu Üzerindeki Değişikliklerinin Belirlenmesi” 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.

Evrin BEYDİLİ

15/06/2026

ÖZ GEÇMİŞ

Soyadı, Adı : BEYDİLİ Evrim
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : İzmir/ 03.07.1995
Telefon : 0553 010 91 61
E-posta : donmezevrim95@gmail.com
Yabancı dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Veterinerlik Mikrobiyolojisi (Dr)	
Y. Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Veterinerlik Mikrobiyolojisi (Y1) (Tezli)	31.08.2020
Y. Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü/İş Sağlığı Ve Güvenliği (Y1) (Tezsiz)	07.08.2019
Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi/Mühendislik Fakültesi/Gıda Mühendisliği (İngilizce)	25.06.2018

BURSLAR ve ÖDÜLLER

Doktora Bursu (100/2000) – Aşı Çalışmaları

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2023-	VS Andros Tarım Gıda Sanayi	Kıdemli Arge Uzmanı

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

Xxx

2. PROJELER

Xxx

3. BİLDİRİLER