



T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YAYLA KEKİĞİ BİTKİ EKSTRAKTI İLE ÇİNKO OKSİT
NANOPARTİKÜLÜNÜN YEŞİL YÖNTEM KULLANARAK
SENTEZİ VE SUBKLİNİK MASTİTİSLİ SÜTLERDEN İZOLE
EDİLEN *Staphylococcus aureus* ÜZERİNE ANTİMİKROBİYEL,
ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Vet. Hek. Mehmet Ali BOZKURT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman
Doç. Dr. Erhan KEYVAN
II. Danışman
Doç. Dr. Soner DÖNMEZ

BURDUR-2021

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YAYLA KEKİĞİ BİTKİ EKSTRAKTI İLE ÇİNKO OKSİT
NANOPARTİKÜLÜNÜN YEŞİL YÖNTEM KULLANARAK
SENTEZİ VE SUBKLİNİK MASTİTİSLİ SÜTLERDEN İZOLE
EDİLEN *Staphylococcus aureus* ÜZERİNE ANTİMİKROBİYEL,
ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Vet. Hek. Mehmet Ali BOZKURT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman
Doç. Dr. Erhan KEYVAN
II. Danışman
Doç. Dr. Soner DÖNMEZ

Bu Araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 0607-YL-19 proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR-2021

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	i
KABUL ve ONAY.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ETİK BEYAN	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER.....	vii
TABLolar.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 Sığırlarda Meme Yapısı.....	2
2.2 Memede Süt Oluşumu	3
2.3 Mastitis Hastalığı.....	4
2.3.1 Mastitis Hastalığının Tipleri.....	5
2.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.4.1 <i>S. aureus</i> Kaynaklı Mastitis	7
2.5 Mastitisin Ekonomik Etkileri.....	8
2.6 Mastitiste Tedavi, Korunma ve Kontrol.....	9
2.7 Yayla Kekiği	12
2.8 Çinko Oksit Nanopartikülü.....	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1 Subklinik mastitisli süt örneklerinin toplanması	16
3.2 Süt Örneklerinden <i>S. aureus</i> İzolasyonu	16
3.2.1 Gram Boyama	17
3.2.2 Katalaz Testi.....	18
3.2.3 Koagülaz Testi.....	18
3.2.3.1 Lamda Koagülaz Testi	18
3.2.1.2 Tüpte Koagülaz Testi	18
3.2.4 DNase Testi.....	19
3.2.5 Anaerobik Mannitol Testi.....	19
3.3 <i>S. aureus</i> İzolatlarının Moleküler Tiplendirmesi	19
3.3.1 DNA ekstraksiyonu	19

3.3.2 <i>nuc</i> Gen Tespiti	20
3.3.3 <i>coa</i> Gen Tespiti.....	21
3.4 İzolatlarda Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi	21
3.5 Yayla Kekığı Kullanarak ZnO NP Sentezi	22
3.5.1 Karakterizasyon	23
3.5.2 Antioksidan Aktivitenin Değerlendirilmesi.....	23
3.6 <i>S. aureus</i> İzolatlarında ZnO NP Antibakteriyel Etkisinin MİK Yöntemi ile Tespiti:	24
4. BULGULAR.....	25
4.1 Subklinik Mastitis Bulguları	25
4.2 Karakterizasyon Sonuçları.....	27
4.3 Antibiyotik Test Sonuçları	30
4.4 MİK Sonuçları.....	34
5. TARTIŞMA.....	43
6. SONUÇ	48
KAYNAKLAR.....	49

ŞEKİLLER

Şekil 2.1: Meme Yapısı: a: Süt üretimini gösteren boyuna bir kesit	3
Şekil 2.2: Beşeri hekimlik ve çalışmada kullanılan bazı antibiyotik dirençlilik oranlarının yüzdelik karşılaştırılması	12
Şekil 2.3: ZnO-NP'lerin Zn+2 dönüşümü	15
Şekil 3.1: Kanlı agarda izole edilen <i>S. aureus</i> şüpheli koloniler	17
Şekil 3.2: İzolatlarda antibiyotik direncinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi.	22
Şekil 3.3: ZNO NP'nin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi	24
Şekil 4.1: ZnO NP'lerin UV-görünür bölge spektrumu	28
Şekil 4.2: (a) ZnO NP'lerin SEM görüntüleri (b) ZnO NP'lerin EDS spektrumu	29
Şekil 4.3: ZnO fazına ait pik değerleri.	29
Şekil 4.4: Farklı ZnO derişimlerinin DPPH ile 30 dakika inhibisyonu sonucu renk değişimi	31
Şekil 4.5: ZnO derişimine karşı IC ₅₀ değeri.	31
Şekil 4.6: Yayla Kekiği ile sentezlenen ZnO NP'nin <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) ve <i>S. aureus</i> (ATCC 43300) üzerine etkisinin belirlenmesi	35
Şekil 4.7: Yayla Kekiği ile sentezlenen ZnO NP'nin çalışma kapsamında elde edilen 100Ab, 118d, 100Aa ve 88a izolatları üzerine etkisinin belirlenmesi	36
Şekil 4.8: Yayla Kekiği ile sentezlenen ZnO NP'nin çalışma kapsamında elde edilen 52d ve 122c izolatları üzerine etkisinin belirlenmesi	36
Şekil 4.9: Yayla Kekiği ile sentezlenen ZnO NP'nin çalışma kapsamında elde edilen 17a, 44d, 53d ve 100d izolatları üzerine etkisinin belirlenmesi	37
Şekil 4.10: Yayla Kekiği ile sentezlenen ZnO NP'nin çalışma kapsamında elde edilen 110a ve 132d izolatları üzerine etkisinin belirlenmesi	37
Şekil 4.11: Yayla Kekiği ile sentezlenen ZnO NP'nin çalışma kapsamında elde edilen 19b, 21b, 111a ve 132d izolatları üzerine etkisinin belirlenmesi	38
Şekil 4.12: Yayla Kekiği ile sentezlenen ZnO NP'nin çalışma kapsamında elde edilen 3b, 119c, ve 125a izolatları üzerine etkisinin belirlenmesi	38
Şekil 4.13: Yayla Kekiği ile sentezlenen ZnO NP'nin çalışma kapsamında elde edilen 112a, ve 128d izolatları üzerine etkisinin belirlenmesi	39
Şekil 4.14: Yayla Kekiği ile sentezlenen ZnO NP'nin çalışma kapsamında elde edilen 12c, 13c, 47b izolatları üzerine etkisinin belirlenmesi	39
Şekil 4.15: Yayla Kekiği ile sentezlenen ZnO NP'nin çalışma kapsamında elde edilen 13d, 38d, 132a, 132b izolatları üzerine etkisinin belirlenmesi	40
Şekil 4.16: Yayla Kekiği ile sentezlenen ZnO NP'nin çalışma kapsamında elde edilen 15c, 32a izolatları üzerine etkisinin belirlenmesi	40
Şekil 4.17: Yayla Kekiği ile sentezlenen ZnO NP'nin çalışma kapsamında elde edilen 14b, 19a, 84d, 131c izolatları üzerine etkisinin belirlenmesi	41
Şekil 4.18: Yayla Kekiği ile sentezlenen ZnO NP'nin çalışma kapsamında elde edilen tüm izolatlar üzerine etkisinin belirlenmesi	42

TABLÖLAR

Tablo 2.1: Bazı ölkelere ait subklinik mastitis oranları.	6
Tablo 4.1: Çalışma kapsamında subklinik mastitis yönünden taranan hayvan sayıları	26
Tablo 4.2: Klasik kültür ve moleküler doğrulamalar ile elde edilen izolatlara ait bazı bilgiler	26
Tablo 4.3: Sağım sistemi ve subklinik mastitis ilişkisi	27
Tablo 4.4: Mastitis aşılama durumuna göre CMT pozitiflik oranı	28
Tablo 4.5: ZnO NP'lerin ortalama kristal boyutunun hesaplanmasında kullanılan parametreler.	30
Tablo 4.6: İzolatlarda çoklu antibiyotik direnç oranları	32
Tablo 4.7: İzolatlarda antibiyotik direnç seviyeleri	32
Tablo 4.8: İzolatlarda antibiyotiklere karşı direnç düzeyleri	33
Tablo 4.9: Yayla Kekiğı ile sentezlenen ZnO NP'nin çalışma kapsamında elde edilen izolatlar üzerindeki MİK değerleri (µg/ml).	43

SİMGELER VE KISALTMALAR

\$	Amerika Birleşik Devletleri Doları
€	Euro
₺	Türk Lirası
°C	Santigrad Derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Nanometre
a _w	Su Aktivitesi
cl _f A	Clumping Factor Geni
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DPPH	1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil
IC ₅₀	İnhibisyon Konsantrasyonu
IgG	İmmüoglobulin
IL-2	İnterlökin İki
INF-C	İnterferon C
Kd	Kilo Dalton
KNS	Koagülaz Negatif Stafilokok
LPS	Lipopolisakkarid
Mm	Milimetre
mM	Milimolar
MRSA	Metisiline Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
N	Normal
nm	Nanometre
pH	Power of Hydrogen
PMN	Polimorfonükler Nötrofil Lökositler
SE	Stafilokokal Enteretoksinler
SEI	Stafilokokal Enterotoksin Benzeri Toksinler
SHS	Somatik Hücre Sayısı
TNFA	Tümör Nekroz Faktörü
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
ZnO NP	Çinko Oksit Nanopartikülü

ÖZET

Yayla Kekiği Bitki Ekstraktı ile Çinko Oksit Nanopartikülünün Yeşil Yöntem Kullanarak Sentezi ve Subklinik Mastitisli Sütlerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Üzerine Antimikrobiyel, Antioksidan Etkilerinin Araştırılması

Süt tüm canlılar için en önemli protein kaynağıdır. Mastitis hastalığı süt hayvanlarında meme dokusunu etkileyen bir hastalıktır. Tedavi giderleri ile birlikte süt bileşiminde meydana gelen değişiklikler sütte kalite kaybına yol açar. Mastitis mücadelesinde antibiyotiklerin kullanılması kaçınılmazdır. Ancak mastitis etkenlerine karşı meydana gelen direnç süt endüstrisinin önemli bir sorunu haline gelmiştir. Klinik mastitis süt hayvanlarını dünya çapında en sık etkileyen bir hastalıktır. Klinik mastitisin süt miktar kaybı, tedavi masrafları, veteriner hizmetleri, süt hayvanlarının ölümü gibi olumsuz etkileri bulunmaktadır. Subklinik mastitis memede klinik belirti olmadan meydana gelmektedir. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp. gibi etkenler subklinik mastitisin majör patojenleridir. *S. aureus*, insan ve hayvanlar için patojen bir tür olup, dünyadaki gıda kaynaklı intoksikasyonların ve mastitisin en önemli nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Antibiyotiklere karşı meydana gelen direnç sebebiyle bakteriler ile mücadelede yeni stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır. Kaliforniya mastitis testi ile Burdur Merkez ve ilçelerine ait toplam 350 süt hayvanının taraması yapılmıştır. Elde edilen subklinik mastitisli süt örneklerinden *S. aureus*'un izolasyonu ve identifikasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolatların inaktivasyonu için yayla kekiği (*Origanum minutiflorum* O. Schwarz et. H. Davis) ile ekolojik olarak sentezlenen çinko oksit nanopartikülünün (ZnO NP) etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda ZnO NP sentezi Yayla Kekiği kullanarak sentezlenmiş ve karakterizasyonu sağlanmıştır. Subklinik mastitis açısından gerçekleştirilen değerlendirme ile taraması yapılan hayvanların %41,14 pozitif olarak tespit edilmiştir. Elde edilen izolatlar için yapılan identifikasyon testleri sonucunda ise 34 (%14,70) adet izolat *S. aureus* olarak belirlenmiştir. Subklinik mastitis yönünden pozitif hayvanların 29'u (%20,13) *S. aureus* açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir. İzolatlar çeşitli antibiyotiklere karşı dirençli oldukları bulunmuştur. Yayla kekiği kaynaklı ZnO NP tüm izolatlar üzerine antimikrobiyel etki göstermiştir. Antimikrobiyel etkinin meydana geldiği etki değeri ise 62,5 µg/ml ile 2000 µg/ml arasında olduğu tespit edilmiştir. Sentezi gerçekleştirilen yayla kekiği kaynaklı ZnO NP'nin antimikrobiyel etkisi ile tüm izolatlar üzerinde farklı MİK değerleri ile inaktivasyon tespit edilerek antibiyotik alternatif maddelere yönelik önemli bir ürün sentezi sağlanmıştır. İzolatlardaki antibiyotik direnç seviyesi yüksek düzeyde olması sebebiyle antibiyotik alternatif maddelere yönelik daha fazla çalışma planlanmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Mastitis, Subklinik, Süt *Staphylococcus aureus*, Yayla Kekiği

ABSTRACT

Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using *Origanum minutiflorum* Plant Extract and Their Antibacterial, Antioxidant Activities on *Staphylococcus aureus* Isolated from Subclinical Mastitis

Milk is the essential protein source for all living things. Mastitis is a disease that affects the mammary tissue of dairy animals. Changes in milk composition together with treatment costs lead to loss of quality in milk. The use of antibiotics is inevitable in the fight against mastitis. However, resistance to mastitis agents has become an important problem of the dairy industry. Clinical mastitis is the most common disease affecting dairy animals worldwide. Clinical mastitis has adverse effects such as loss of milk quantity, treatment costs, veterinary services, and death of dairy animals. Subclinical mastitis occurs in the breast without clinical manifestations. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp. are the major pathogens of subclinical mastitis. *S. aureus* is a pathogenic species for humans and animals and is considered one of the most important causes of foodborne intoxications and mastitis in the world. New strategies are needed to combat bacteria due to resistance to antibiotics. A total of 350 dairy animals belonging to Burdur Center and its districts were screened with the California Mastitis Test. Isolation and identification of *S. aureus* were performed from the obtained milk samples with subclinical mastitis. The effect of *Origanum minutiflorum* and ecologically synthesized zinc oxide nanoparticle (ZnO NP) for inactivation of the isolates was investigated. As a result of the study, ZnO NP synthesis was synthesized and characterized using *Origanum minutiflorum*. With the evaluation performed for subclinical mastitis, 41.14% of the animals screened were positive. As a result of the identification tests performed for the isolates obtained, 34 (14.70%) isolates were identified as *S. aureus*. Twenty nine (20.13%) of the animals positive for subclinical mastitis were evaluated as positive for *S. aureus*. Isolates were found to be resistant to various antibiotics. *Origanum minutiflorum* derived ZnO NP showed antimicrobial effect on all isolates. The effect value at which the antimicrobial effect occurred was between 62.5 µg/ml and 2000 µg/ml. With the antimicrobial effect of *Origanum minutiflorum* -derived ZnO NP, which was synthesized, inactivation was detected with different MIC values on all isolates, and a critical product synthesis was achieved for alternative antibiotic substances. Due to the high level of antibiotic resistance in isolates, more studies on antibiotic alternatives should be planned.

Keywords: Mastitis Milk, Subclinical, *Staphylococcus aureus*, Thyme,

1. GİRİŞ

Süt, insan beslenmesinde en önemli hayvansal protein kaynaklarından biridir. Türkiye’de yıllık süt üretimi 2017 yılında 20,7 milyon ton olarak gerçekleşmiştir. Kişi başı içme sütü tüketimi dünyada ortalama 108 litre iken bu oran Türkiye’de 25 litre civarındadır (IDF, 2014; TÜİK, 2016). Türkiye’de bulunan sağmal inek sayısı 2019 yılında 6.337.907 iken Burdur’da 98.641’dir (TÜİK, 2020). Türkiye sağmal inek varlığının % 1,55’i Burdur’da bulunmasına rağmen süt üretiminin yapıldığı önemli iller arasında bulunmaktadır. Bölge illeri arasında yapılan değerlendirmede ise yıllık yaklaşık 396 bin ton süt üretimi ile ilk sırada yer almaktadır (TÜİK, 2020).

Mastitis, süt üretim çiftliklerinde önemli maliyet ve verim kaybına yol açan bir hastalıktır. Tedavi giderleri ile birlikte süt bileşiminde meydana gelen değişiklikler süt kalite kaybına yol açar. Mastitis mücadelesinde en etkili yol antibiyotik uygulamasıdır. Ancak direnç geliştiren bakteriler sebebiyle mastitis sağaltımı oldukça zor bir hastalık olarak süt endüstrisinin önemli bir problemi olarak görülmektedir.

Tez çalışması konusunun temelini oluşturan *Staphylococcus aureus*, insan ve hayvanlar için patojen bir tür olup, dünyadaki gıda kaynaklı intoksikasyonların ve mastitisin en önemli nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. *S. aureus*’un değişik gıdalarda varlığı üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır. Ancak yapılan literatür taramalarında Türkiye’de subklinik mastitisli sütlerde *S. aureus* inaktivasyonuna yönelik yenilikçi teknolojiler alanında önemli bir eksiklik olduğu anlaşılmıştır. Bu kapsamda çalışmanın temel konusu, subklinik mastitisin en önemli etkeni olan *Staphylococcus aureus*’un Burdur bölgesindeki çiftliklerden izolasyonu ve elde edilen izolatların inaktivasyonuna yönelik bitkisel özüt ile ekolojik olarak sentezlenen çinko oksit nanopartikülünün (ZnO NP) etkisinin araştırılarak antibiyotiklere alternatif maddelerin sentezlenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

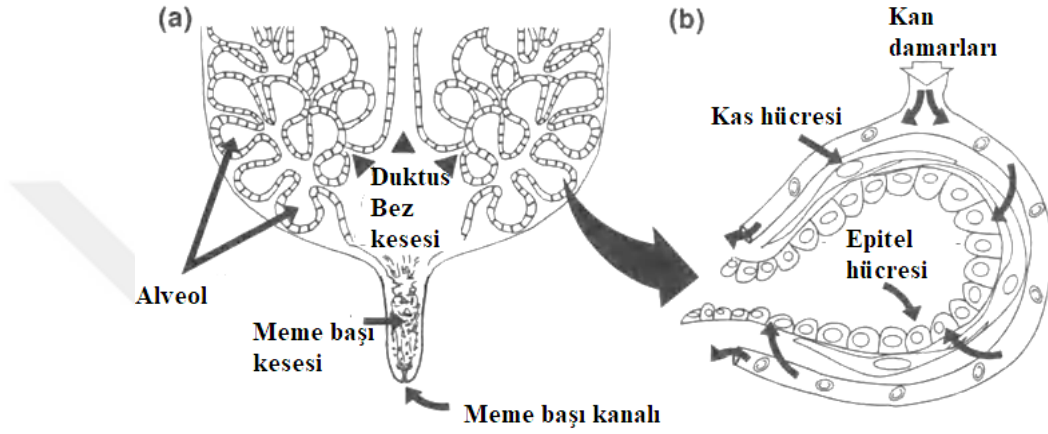
2.1 Sığırlarda Meme Yapısı

Süt ineklerinin meme bezi süt salgılayan biyolojik bir fabrikadır. Meme dokusunda 1 kg süt sentezi için 500 litre kan akışı sağlanması gereklidir (Kaartinen, 1995). Kan akışı, sütün temel bileşenlerini glandüler parankime taşımaya yanı sıra, immünoglobulinleri (IgG1 ve IgG2) ve tamamlayıcı proteinleri de sağlar. Aynı zamanda etkileri parankimden yayılmasını sağlayan ilacın memeye getirilmesinde bir taşıyıcı görevi görür (Gruet ve ark., 2001).

Meme dokusunu etkileyen bir enfeksiyon bulunmadığı durumlarda sütte bulunan hücre sayısı 50.000 / ml civarındadır. Baskın hücre tipleri makrofajlar (% 35-79), B ve T lenfositler (% 10-24), polimorfonükleer nötrofil lökositler (PMN,% 3-26) ve epitel hücreleridir (% 2-15). Meme dokusunu etkileyen enfeksiyon durumlarında, bakteri veya bakteriyel ürünlerin (lipopolisakkarit toksinler, vb.) varlığı, endojen inflamasyon araçlarının (örneğin tamamlayıcı bileşen C5a, çeşitli lipopolisakkaridler (LPS), lökotrien B4, interlökinler-1, 2, 6 ve -8, ve tümör nekroz faktörü alfa) kandan ve diyapedezden PMN alımını tetikler. PMN daha sonra tüm hücrelerin % 100'ünü oluşturabilir ve somatik hücre sayısı (SHS) mililitrede milyonlarca hücreye yükselir. Bu basamak, memenin ilk savunma hattıdır ve bakteriyel büyümeyi sınırlamaya yardımcı olur ancak nadiren patojenleri tamamen ortadan kaldırır (Paape, 1981).

Süt ineklerinin meme yapısı her biri iki çift çıkış kanalı ile dışarı açılan iki çift meme bezinden oluşmaktadır. Toplam dört adet meme birbirinden bağımsız olarak işlev görmektedir. Histolojik olarak değerlendirildiğinde süt salgılayan bir meme genişlemiş alveollere sahip lobüle bir ekzokrin bezdir. Salgı hücreleri, tepelerinde sıkı bağlantılarla yakından bağlantılıdır. Bu oluşum büyük ölçüde kan-süt bariyerinden ve her iki bölme arasında ilaçların seçici difüzyonundan sorumludur. Süt bileşenlerinin sentezi ve salınımı gerileme basıncı tarafından geçici olarak askıya alınana kadar sürekli (Gruet ve ark., 2001).

Meme bezi yapısındaki süt salgılayan parankim doku kanallar veya tüpler ile toplama boşluklarına veya duktuslara boşaltılan milyonlarca küçük küresel yapıdan (alveoller) oluşur. Her alveolün içi tek bir salgı epitel hücresi katmanıyla kaplıdır. Süt bileşeni öncülleri, bu epitelyal hücreler tarafından alveollere bitişik kan kılcal damarlarından emilir ve süt proteini, laktoz, yağ ve sağım arasında saklama için lümen veya alveolün içine salınan diğer bileşenlere dönüştürülür (Nickerson, 1995).



Şekil 2.1. Meme Yapısı a: Süt üretimini gösteren boyuna bir kesit, b: Süt salgılayan hücrelerin detaylı yapısı (Nickerson, 1995).

2.2 Memede Süt Oluşumu

Alveolar epitel hücreleri, kandan emilen prekürsörleri süt bileşenlerine dönüştürmek için gerekli mekanizma veya organelleri içermektedir. Emziren bir sığıra ait meme bezinin tipik bir süt üreten hücresinin bir örneği Şekil 2.1’de gösterilmektedir. Çoğunluğu kazein olan süt proteini, alveolar hücreler tarafından kandan alınan amino asitlerden oluşur. Kazein, tüp benzeri kaba endoplazmik retikulum içinde sentezlenir. Bu bölgeden kazein, hücreden dışarı salgılanmak üzere salgı veziküllerinde yoğunlaştığı golgi organeline taşınır. Laktoz, golgi organeline sentezlenir ve kazeini taşıyan aynı veziküllerdeki hücreden salgılanır. Kalsiyum, magnezyum ve diğer iyonlar da golgi organeline kaynaklanan salgı kesecikleri yoluyla salgılanır. Yağ, sert endoplazmik retikulum tarafından işgal edilen sitoplazma alanlarında sentezlenir. Salgılama sırasında damlacıklar hücre zarından geçer ve sıkışarak alveolar lümen içine salınır. Apikal plazma membranına dik olarak

yönlendirilmiş mikrotübüller salgılama için salgı ürünlerinin akışını alveolar lümene doğru yönlendirir (Nickerson, 1995).

2.3 Mastitis Hastalığı

Mastitis, meme dokusunun bir yangısı olarak tanımlanabilir. Mastitisin çiftçiler tarafından fark edilmesi çoğunlukla sütte meydana gelen değişim ile tespit edilmektedir. Ancak bazı durumlarda klinik belirtiler görünmeden de mastitis varlığı görülmektedir. Mastitis süt hayvanlarını etkileyerek önemli kayıplar oluşturmaktadır. Süt sağımı sırasında meme lobları çeşitli bulaşıcı mikroorganizmalara maruz kalmaktadır (Ruegg, 2017). Meme lobu enfeksiyonundan sorumlu bakteriler streptokoklar (*Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*), koagulaz pozitif stafilokoklar (*Staphylococcus aureus*), koagulaz negatif stafilokoklar (KNS) ve *Corynebacterium bovis*'dir (Gruet ve ark., 2001).

Araştırmacılar uzun yıllardır *Streptococcus agalactiae* ve *Staphylococcus aureus*'un neden olduğu mastiti kontrol etmek için etkili stratejiler belirlemek için çalışmaktadır. Başarılı kontrol programlarının meydana getirilmesi için mastitis enfeksiyon mekanizmalarını tanımlanmalı, hastalığın klinik ve subklinik durumlarını belirlenerek uygun tarama testlerini ile olası maruziyet noktalarını belirlemelidir. Daha sonra patojene özgü özellikler tanımlamalı ve makineli sağım için etkili prosedürler geliştirmelidir (Keefe, 2012). Etkili çalışmalar sonucunda mastitis kontrolünün sağlıklı ineklerde yeni enfeksiyonların oluşmasını önlemeye ve ineklerin enfekte kalma süresini kısaltmaya dayandığını belirlenmiştir. Sağım sonrası meme ucunu daldırmayı, hijyenik sağım prosedürlerini ve kuru dönemde stratejik antibiyotik tedavisinin kullanımını içeren bir kontrol programının geliştirilmesi bulaşıcı patojenlerin yaygın kontrolüyle sonuçlanmıştır (Robert ve ark., 2006). Sürü yönetimi değiştikçe, araştırmacılar çevresel kaynaklardan kaynaklanan fırsatçı patojenlerin neden olduğu mastitisin kontrolünü amaçlamıştır. Mastitis patojenleri gelişim gösterdiği süreçte araştırmacılar, gereksiz antimikrobiyel kullanımı en aza indirirken hayvanların sağlığını koruyacak önlemlere yoğunlaşmıştır. Geçen yüzyılda, mastitis kontrolünde muazzam önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Ancak değişen sürü yapısı ve patojenler mastitisin gelecekte de önemli bir sorun olacağını göstermektedir (Ruegg, 2017).

2.3.1 Mastitis Hastalığının Tipleri

2.3.1.1 Klinik Mastitis

Klinik mastitis süt hayvanlarını dünya çapında en sık etkileyen bir hastalıktır. Çeşitli ülkelerde görülme sıklığı yılda 13-40/100 hayvan olarak bildirilmiştir. Klinik mastitisin süt miktar kaybı, tedavi masrafları, veteriner hizmetleri, süt hayvanlarının ölümü gibi olumsuz etkileri bulunmaktadır (Jamali ve ark., 2018). Heringstad ve ark. (2003) Norveç’de yapmış oldukları çalışmada klinik mastitis insidansının birinci laktasyonda 0.15, ikinci laktasyonda 0.19, üç ve üzeri laktasyonlarda ise 0.24 olarak hesaplamışlardır. Çalışmada en yükdek frekansı 1-3 laktasyonun 1. ile 30. Günleri arasında elde etmişlerdir.

2.3.1.2 Subklinik Mastitis

Subklinik mastitis meydana geldiği durumlarda ise memede klinik belirti meydana gelmeden sütte bulaşma olabilir. Subklinik mastitisin meydana gelmesinde *S. aureus*, *E. coli*, *Streptococcus* spp. gibi majör patojenler etkilidir. *S. aureus* süt hayvanlarında subklinik mastitis meydana getiren en önemli patojenlerdendir ve antimikrobiyel tedavi uygulanmasının temel nedenleri arasında bulunmaktadır. Subklinik mastitis, ineğin yaşamı veya üretme yeteneği için acil bir tehdit oluşturmaz. Temel belirti ise yetiştirici için ekonomik kayıplar oluşturan artan somatik hücre sayısıdır. Zorunlu bir meme patojeni olan *S. agalactiae* sürünün tamamının antimikrobiyallerle tedavi edildiği "Blitz" terapisi ile kontrol edilebilir. Diğer streptokoklar, birçok antibiyotiğe nispeten duyarlı olduklarından genellikle bireysel tedavilerle kontrol edilebilir. *S. aureus*'un neden olduğu mastitin tedavisi zordur çünkü sıklıkla derin yerleşimli apselerle sonuçlanır. Bu patojen fagositozdan sonra hücre içi bölmede, dolayısıyla antibiyotik konsantrasyonlarının daha düşük olduğu bir yerde hayatta kalabilir. *S. aureus* çoğu antimikrobiyale (özellikle β -laktamlara) dirençlidir ve memenin doğal savunmasını bozan toksinleri salgılar. Sonuç olarak bakteriyolojik iyileşme oranları çok düşüktür ve tedaviler laktasyon döneminde uygulandığında sıklıkla nüks meydana gelmektedir. Uzun etkili antibiyotik preparatlarıyla kuru dönemdeki tedaviler daha etkili olduğu bildirilmektedir (Roberson ve ark., 1998;

Gruet ve ark., 2001; Peles ve ark., 2007; Olde Riekerink ve ark., 2008; Barkema ve ark., 2009; Gomes ve ark., 2016; Ramya ve ark., 2017).

Tablo 2.1. Bazı ülkelere ait subklinik mastitis oranları.

Ülke	Yüzdelik %	Kaynak
Hollanda	32	Rougoor ve ark., 1999
Fransa	29	Longo ve ark., 2001
Çek Cumhuriyeti	35	Wolfova ve ark., 2006
Finlandiya	30,6	Pitkälä ve ark., 2001

2.4 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus cinsi 50'den fazla türü içermektedir. *Staphylococcus aureus* gram pozitif, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz, katalaz pozitif, 0.5-1.5 µm çapında bakterilerdir. Optimal olarak üreme sıcaklığı 35-37 °C, pH 6,0-7,1, a_w 0,83-0,86, %20 tuz konsantrasyonunda üreyebilir ve en fazla %10 tuz konsantrasyonunda toksin üretebilir (Erol, 2007). Bu bakteriler çevrede yaygın olarak bulunabildiği gibi insan ve hayvanların normal deri ve mukozalarında da doğal olarak bulunabilmektedir. *Staphylococcus aureus* insanlarda deri enfeksiyonları sepsis ile gıda kaynaklı hastalığa neden olabilir. Hayvanlar için de önemli bir patojen olan bu bakteri süt ineklerinde mastitis, kanatlılarda kemik ve eklem lezyonları meydana getirebilir. Köpekler, kediler ve atlar gibi evcil hayvanlar da *S. aureus* bulaşında bir rol oynayabilir ve bu enfeksiyonlarına karşı da hassastır (Bierowiec, 2016; Grace ve Fetsch, 2018).

Stafilokoklar ilk olarak 1880 yılında İskoç cerrah Alexander Ogston tarafından insanda irinli bir dokudan izole edilerek mikroskobik görünümünden dolayı *staphyle* (üzüm salkımı) *kokkos* (dut) olarak isimlendirilmiştir (Licitra, 2013). *S. aureus* Alman cerrah Anton J. Rosenbach tarafından koloni formasyonu sebebiyle *aureus* (altın renkli) olarak adlandırılmıştır (Rosenbach, 1884). Bakterilerde bazı antiniyotiklere karşı şekillenen antibiyotik direnci önemli bir halk sorunu halini almaya başlamıştır. Günümüzde metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) önemli bir problem teşkil etmektedir (Vestergaard ve ark., 2019). Çiftlik hayvanları ile ilişkili MRSA (livestock-associated/LA-MRSA) çiğ et gibi gıdalarda bulunarak insanlarda enfeksiyonlara yol

açması da gelecekte geniş çaplı endimik ve epidemik salgınlara yol açabileceği endişesini oluşturmaktadır (Köck ve ark., 2013; Kinross ve ark., 2017).

S. aureus geniş çaplı enfeksiyonlar, gıda zehirlenmeleri ve toksik şok sendroma neden olur. Bu hastalıkların meydana getirilmesinde çeşitli virülens faktörleri etkili olmaktadır. Patojen antijenler, yüzey proteinleri, membran hasarı oluşturan toksinler, toksik şok sendrom toksini gibi virülens faktörleri ile stafilokokkal enterotoksinler de hastalıkların meydana getirilmesinde etkili olmaktadır (Tong ve ark, 2015). Stafilokokkal enterotoksinler (SE) 19-29 kD moleküler büyüklüğü be yaklaşık 168-261 amino asitten oluşmaktadır. Stafilokokkal enterotoksinler insanlar ve hayvanlarda mide bulantısı, kusma ve karın kümelerini uyaran önemli toksinlerdir. Günümüzde stafilokokkal enterotoksin ve stafilokokkal enteretoksin benzeri toksinler (Sel) 23 farklı alt tipe ayrılarak sınıflandırılmıştır. Stafilokokkal enterotoksinler, SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SES, SET olarak isimlendirilmiştir. Stafilokokkal enterotoksin benzeri toksinler ise SEIU, SEIV, SEIW, SEIX, SEIY şeklinde adlandırılmıştır (Hu ve ark., 2018). Stafilokkal enterotoksinlerin biyokimyasal ve yapısal özellikleri sebebiyle ısıya dirençleri yüksektir. Proteolitik enzimelere dirençlidir ve sindirim sisteminde aktivitesini sürdürebilir (Pinchuk ve ark., 2010). Stafilokokkal gıda zehirlenmelerinin meydana gelişinde stafilokkal enterotoksinler ile kontamine olmuş gıdaların tüketilmesi önemli bir yer tutmaktadır (Le Loir, 2003). Hastalığa ilişkin mide bulantısı, kusma, abdominal kramp, diyare gibi semptomlar genellikle hızlı bir şekilde başlar (2-8 saat) (Tranter, 1990; Balaban ve Rasooly, 2000; Murray, 2005; Argudin ve ark., 2010). Semptomlar içerisinde ishal olmadığı durumlarda da mide bulantısı ve şiddetli kusmayı bulunmaktadır. Hastalık genellikle yumuşak seyirlidir ve nadir olarak hastanede tedavi gerektirmektedir (Argudin ve ark., 2010).

2.4.1 *S. aureus* Kaynaklı Mastitis

Stafilokok enfeksiyonları hem klinik hem de subklinik mastite neden olur ve dünya çapındaki süt işletmelerinde mastitise bağlı ekonomik kayıpların büyük bir kısmından sorumludur (Moroni ve ark., 2006; Oliveira ve ark., 2012; Jamali ve ark., 2014). Stafilokokkal patojenler, kaynağına göre (bulaşıcı veya fırsatçı) ve koagülaz

pozitif veya koagülaz negatif laboratuvar tanımlamasına göre ikiye ayrılır. Koagülaz pozitif stafilokokal bir patojen olan *S. aureus*, inekten ineğe yayılan bulaşıcı bir patojen olduğu için diğer stafilokoklardan farklıdır. Süt sürülerinde en yaygın bulaşıcı patojendir ve süt kaybına, süt kalitesinin düşmesine ve kronik enfeksiyonlara katkıda bulunur. Koagülaz-negatif stafilokoklar genellikle meme ucunun deri yüzeylerine kolonize olan, meme bezine giriş sağlayıp, meme içi enfeksiyon üreten fırsatçılar olarak kabul edilir. Bu stafilokoklar patojenite açısından farklılık gösterir ve genellikle klinik değildir, ancak bazen klinik belirtiler oluşturur. Bununla birlikte, sürüdeki yaygınlık yüksekse, enfeksiyonlu inekler, inekten ineğe yayılan bakterilerin ana kaynağı haline gelir. Patojenite seviyesi, farklı *Staphylococcus* türleri ve sürü duyarlılığına göre değişir (Sears ve McCarthy, 2003).

2.5 Mastitisin Ekonomik Etkileri

Mastitis, süt hayvanlarında neden olduğu tedavi giderleri nedeniyle ekonomik açıdan önemli bir hastalıktır (Duarte ve ark., 2015). Ayrıca meme bezlerinde oluşturduğu fonksiyon bozukluğu sebebiyle süt bileşiminde de değişiklikler meydana gelir (Korhonen ve Kaartinen, 1995). Mastitis hastalığının hayvan başına 61-97 € civarında bir maliyet oluşturduğu tahmin edilmektedir. Bu maliyetin oluşmasında düşen süt verimi, veteriner hizmetleri, tanı giderleri, ilaç uygulamaları, imha edilen süt, ürünlerde kalite düşüklüğü, aynı veya yeni hastalıkların oluşma riski gibi faktörler etkili olmaktadır (Halasa ve ark., 2007; Hogeveen ve ark., 2011). Subklinik mastitisin süt verimine etkisine yönelik yapılan bir çalışmada ortalama %17,2 bir azalma meydana getirdiği bildirilmiştir (Mungube ve ark., 2005).

Wolfová ve ark. (2006) yapmış oldukları çalışmada klinik vaka başına maliyet ortalama 62,2 € olarak hesaplamışlardır. Fransa'da bir mastitis tedavisinin hayvan başına 144-218 \$ arasında bir maliyete neden olduğu, laktasyon döneminde süt kaybindan kaynaklanan ekonomik kaybın 29,1-66,6 dolar olduğunu araştırmalar ortaya koymuştur (Longo ve ark., 2001; Mungube ve ark., 2005). Türkiye de 2019 yılı cari fiyatları üzerinden yapılan bir incelemede hafifi orta seyirli bir vakada 528,4 ₺, şiddetli vakalarda 1.207,6 ₺ kaybın olduğunu hesaplamıştır. Ülke genelinde ise toplamda 1.385.856.000 ₺ kaybın olduğu tahmin edilmektedir (Sarıözkan, 2019).

2.6 Mastitiste Tedavi, Korunma ve Kontrol

Mastitis hastalığı süt endüstrisini ekonomik açıdan etkileyen önemli bir hastalıktır. Bu hastalığın yaygın olarak seyretmesinde etkili faktörlerden ilki karma etkenlerin oluşturduğu hastalığa karşı etkili bir aşılama seçeneğinin olmaması ile birlikte diğer faktör ise antibiyotiklerin ilgili etiyolik ajanlara karşı geliştirmiş olduğu dirençtir (Tiwari ve ark., 2013).

Bakteriler tarafından antibiyotiklere karşı oluşturulan direnç, tüm dünyada önemli bir halk sağlığı problemi halini almıştır. Antibiyotiklerin tarım, hayvancılık ve tıp alanında yoğun kullanımı sonucu bakteriler antibiyotiklere karşı direnç kazanmıştır. Antibiyotiklerin özellikle gıda üretimi amacıyla üretilen hayvanlara tedavi amacıyla ve gelişim artırıcı olarak yoğun bir şekilde kullanılması insan sağlığı açısından da önemli bir risk oluşturmaktadır (Normanno ve ark., 2007). Mastitis tedavi stratejisinde antibiyotikler, son 40 yıl içerisinde yoğun bir şekilde kullanılmıştır (Tiwari ve ark., 2013). Süt ineklerinde profilaktik ve mastitis tedavisi amacıyla β laktam grubu antibiyotiklerin yaygın olarak kullanılması; süt ve süt ürünlerini MRSA açısından riskli hale getirmektedir (Sawant ve ark., 2005). Ayrıca MRSA süt ineklerinde mastitis meydana getirebilir (Haran ve ark., 2012). MRSA'nın mastitisli sütlerde varlığını bildiren araştırmalardan Guimaraes ve ark., (2017) % 48,3; Wang ve ark., (2015) % 15,5; Jamali ve ark., (2014) % 11,6; Moon ve ark., (2007) % 2,5 oranlarını bildirmiştir. MRSA sütlerde herhangi bir değişiklik meydana getirmeden gıda zincirine dahil olabilir (Parisi ve ark., 2016). Mastitiste *S. aureus*' a karşı kullanılan antibiyotik terapisi başarı oranının düşük düzeylerde olduğu bildirilmiştir (Gruet ve ark., 2001). Bu durumun oluşmasında ısrarlı bir şekilde seyreden biofilme bağımlı bir direnç durumunun söz konusu olabileceği bildirilmektedir (Babra ve ark., 2013).

Antibiyotik tedavisinin meydana getirdiği bazı olumsuz etkiler sebebiyle klinik ve subklinik mastitisin tedavisi için yeni seçenekler geliştirilmiştir. Bu alternatif tedavi yöntemlerinden birisi spesifik bakteriyel etkene karşı kullanılan bakteriyofaj tedavisidir (Tiwari ve ark., 2013). Fajların veteriner uygulamaları için yeni antimikrobiyal ajanlar olarak önemli olduğu gösterilmiştir. Faj K, litik ve

antimikrobiyal etkiye sahip bir anti-stafilokok fajıdır ve *S. aureus*'un neden olduğu enfeksiyonlarda profilaktik önlem olarak kullanılmıştır. Ancak mastitis için tedavi stratejisi olarak kullanılması için sığır meme bezinde ve çiğ sütle temas halindeyken aktif olması gereklidir. Bu durum, doğal süt ve meme salgısı tarafından inhibe edilen faj K'nin dezavantajını oluşturmaktadır (O'Flaherty ve ark., 2005). Sığır orijinli stafilokok tiplerine karşı litik etkili bir spektrum sunan yeni virulent faj (MSA6) ile mastitis hastalığında potansiyel kullanım olanakları sağlanabileceği ifade edilmiştir (Kwiatek ve ark., 2012). Bazı sınırlamalara rağmen bakteriyof tedavisi gelecekte antibiyotik kullanımına alternatif olarak değerlendirilebilecektir (Gomes ve Henriques, 2016).

Mastitis hastalığının tedavisinde etkili yöntemlerden birisi aşılama değildir. *S. aureus*'a karşı çeşitli mekanizmaları içeren aşılar geliştirilmiştir ancak etki düzeyleri sınırlı olarak kalmıştır (Tiwari ve ark., 2013). Uygun olmayan bağışıklama programları, etkisiz adjuvan formülasyonu ve sınırlı koruma aralığı gibi faktörler aşı etkisizliklerinin nedenlerinden bazılarıdır. Bir sürüde ve tek bir inekte birden fazla suş bulunabileceğinden çok çeşitli suşlara karşı koruma sağlayabilecek bir aşı bulmak mastitis hastalığı ile mücadelede kritik bir aşamadır (Bannerman ve ark., 2005; Gomes ve Henriques, 2016). Aşı uygulamasının etkisine yönelik gerçekleştirilen bir çalışmada; *E. coli* etkenine karşı aşılama yapılan grubun yapılmayanlara göre daha fazla yarar elde edildiği bildirilmiştir (Seegers ve ark., 2003).

Son yıllarda nanopartikül kullanarak antimikrobiyel ajanların geliştirilmesi ilgi çekici bir alan olarak mastitis hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Gümüş nanopartikülün subklinik mastitisten izole edilen *S. aureus* etkenlerine karşı etkili olduğu tespit edilmiştir (Dehkordi ve ark., 2011). Wang ve ark. (2012) kullandıkları nanopartikül içerikli antimikrobiyel ajanın *S. aureus* üzerine etkili olduğunu bildirmiştir. Violacein nanopartikülü kullanarak elde edilen kuvvetli antimikrobiyel etki mastitis hastalığında *S. aureus*'a karşı değerlendirilebileceği belirtilmiştir (Berni ve ark., 2013).

Mastitis hastalığının tedavisi amacıyla rekombinat sitokinlerin ümmunteropatik kullanımları değerlendirilebilir. Sitokinler küçük yapıli proteinlerdir

ve hücre iletişimde önemli bir rolleri bulunmaktadır. Bazı sitokinlerin (IL-2, IFN-c ve TNF-a gibi rekombinant sığır sitokinleri), meme bezinde doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklığı uyarmaktan sorumlu olduğu gösterilmiştir. Ancak bu yöntem sığır mastitisini önlemek veya tedavi etmek için yeterli olmayabilir (Alluwaimi, 2004).

2.6 Antibiyotik Dirençliliği

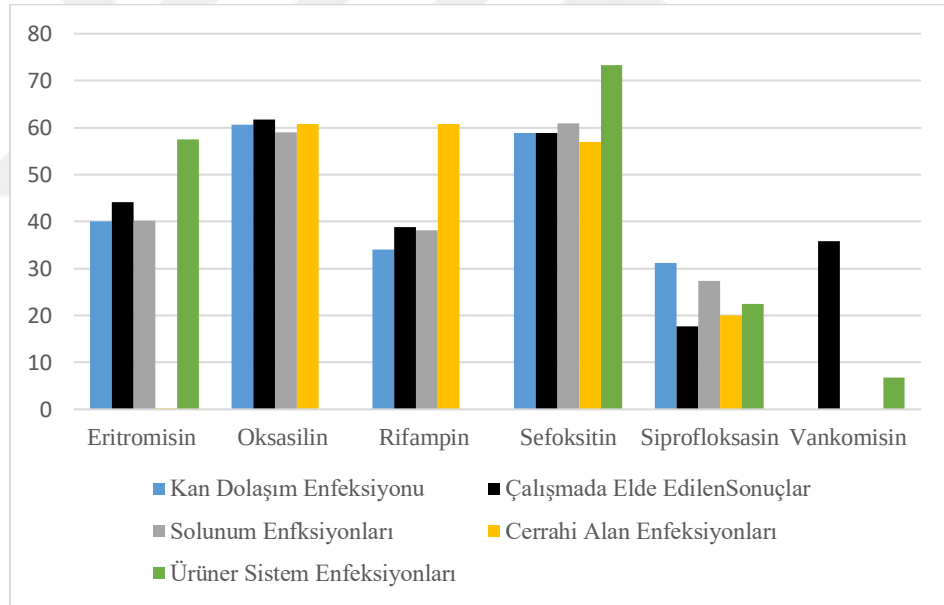
Antimikrobiyal direnç; mikrobiyolojik direnç, doğal, kazanılmış, çapraz, çoklu antibiyotik direnci olarak sınıflandırılmaktadır. Klinik direnç, bakteriyel enfeksiyonlarda uygulanan tedaviye cevap alınamamasıdır. Doğal direnç bakterilerinin doğal yapılarına ve antibiyotiklerin etki mekanizmalarının uyumsuzluğudur. Örneğin çok katmanlı peptoglikan hücre duvarına sahip gram negatif bakterilerin olmaları sebebiyle vankomisin ve metisiline, dirençli olması, hücre duvarı bulunmayan mikroorganizmaların penisiline dirençli olması örnek olarak gösterilebilir. Kazanılmış direnç ise bir süre duyarlılığı bulunan maddeye bir noktadan sonra dayanıklı hale gelmesine olarak tanımlanmaktadır. Kromozal kazanılmış direnç mikroorganizmanın protein ve enzim gibi moleküllerin sentezinden sorumlu olan bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu meydana gelmektedir. Ekstrakromozal (aktarılabılır) kazanılmış direnç, kromozom harici plazmid, transpozon, integresyon ve gen kasetleri gibi diğer genetik metetyallerin konjugasyon, transformasyon ve transpozisyon ile diğer bakterilere transfer edilmesidir (Aslan, 2017).

Livermore ve ark. (2001) batı Galler kırsalında bahar aylarında toplanan saksağanlar ve tavşanlarda incelemelerde bulunmuşlardır. 1999 yılında toplanan 20 saksağan örneğinin sekizinde 2000 yılında 17 saksağanın bir tanesinde, birden fazla antibiyotiğe dirençli *Escherichia coli* izolatlarını tespit etmişlerdir. 13 tavşanın bağırsak bakterilerinden ise sadece bir tanesinde antibiyotiğe dirençli *Escherichia coli* izolatı tespit edilmiş ve sadece tetrasikline karşı direnç özelliği göstermiştir. Yine başka bir çalışmada elektrik bulunmayan tek odalı bir amazon kulübesinde yaşayan, Peru'nun Alto Amazonas eyaletinde bulunan, Chayahuita Kızılderililerinin çok uzak bir insan topluluğu olan ve tarım, avcılık ve hayvancılık(kümes hayvanları, sığır ve domuz) faaliyeti olan içme suyu ihtiyaçlarını 6 saatlik yürüyüş mesafesindeki nehir

yada yağmur suyu ile ihtiyaçlarını karşılayan, son 12 ay içerisinde 19 (%21) kişinin seyahat öyküsü bulunan Angaiza sakinlerinde yapılan çalışmada 89 kişinin 82'inde antibiyotiğe dirençli *Escherichia coli* izolatların tespit dildiğini bildirmiştir(Bartoloni, 2009).

Türkiye’de nozokomiyal infeksiyonlarda en sık direnç sorunu yaşanan mikroorganizmalar; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, Koagülaz Negatif Stafilokoklar, *Enterobacter* spp, Enterokoklar, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp.’dir (Erbay ve İdil, 2009; Keyik, 2013; Kayış, 2019).

Bu çalışmalar ışığında, bu çalışmada elde edilen sonuçların Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü’nün yayınlamış olduğu antibiyotik dirençlilik oranları karşılaştırması Şekil 2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Beşeri hekimlik ve çalışmada kullanılan bazı antibiyotik dirençlilik oranlarının yüzdelik karşılaştırılması.

2.7 Yayla Kekiği

Dünyada, ‘Sütçüler kekiği’ ve ‘Tota kekiği’ olarak bilinen Yayla kekiği (*Origanum minutiflorum* O. Schwarz et. H. Davis) ülkemizde sadece Isparta ilinin Sütçüler yöresinde yabani olarak yetişen ve toplanarak ihraç edilen endemik bir türdür

(Baydar, 2005). *Origanum minutiflorum* diğer *Origanum* türleri ile kıyaslandığında karvakrol içeriği en yüksek olan türdür ve esansiyel yağında karvakrol oranı yüzde 90 üzeri bulunmuştur (Başer, 2008). Başer ve ark. (1993) Sütçülerden topladıkları yayla kekiği örneklerinde %2,5 oranında uçucu yağ bulmuşlar ve bu yağın en önemli bileşeninin karvakrol olduğunu saptamışlardır. Uçucu yağların kimyasal bileşimi iklimsel, mevsimsel ve coğrafi koşullara, hasat süresine ve damıtma tekniğine bağlıdır (Baydar ve ark., 2004). Yapılan bir çalışmada, yayla kekiğinde de güz (Eylül sonu ve Ekim) kekiklerine göre yaz (Ağustos ve Eylül başı) kekiklerinden daha yüksek uçucu yağ oranı, daha yüksek karvakrol oranı, daha düşük psimen ve timol oranları elde edilmiştir. Sonuç olarak, *Origanum minutiflorum* bitkisinin yaprak oranının fazla, toz oranının düşük olması için çiçeklenme öncesinde yapılacak erken toplamalarda ve tohum dökümüne izin vermek için çiçeklenmeden sonra yapılacak geç toplamalarda yayla kekiğinin uçucu yağ oranı ve kalitesi düşmektedir. Yayla kekiğinde yüksek uçucu yağ verimi için çiçeklenme başı veya en geç tam çiçeklenme dönemleri, yüksek uçucu yağ kalitesi için ise çiçeklenme sonu beklenmesi gerektiği rapor edilmiştir (Baydar, 2005).

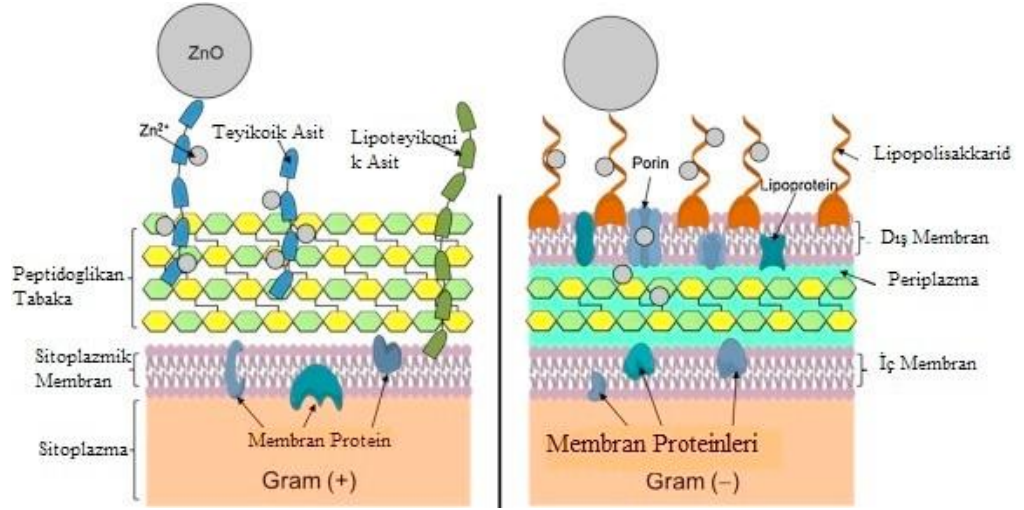
Yayla kekiğinde, karvakrolün yanı sıra p-cymene (% 7.7) ve γ -terpinen (% 2.2) ana bileşen olarak belirlenmiştir (Özkum ve ark., 2010). Yayla kekiğinde başlıca fenolik bileşikler, karvakrol, rutin, rosmarinik asit, eriodictiol ve luteolin bulunmuştur. Ayrıca, kuersetin, naringenin, vitexin ve apigenin tanımlanmıştır (Askun ve ark., 2009). Yapılan bir çalışmada, Tricosan1-ol, (8E, 16E) -tetrakos-8,16-dien-1,24-diol, azepan-2-on, 3,4-dihidroksibenzoik asit, apigenin, eriodictyol, globoidnan-A, luteolin, rosmarinik asit, apigenin-7-O-glukuronid ve vicenin-2 biyoaktif bileşikleri izole edilmiş ve bu izole edilen biyoaktif maddelerden 3,4-Dihidroksi benzoik asit, eriodictyol, luteolin ve rosmarinik asitin önemli antioksidan aktivitelerinin olduğu bildirilmiştir (Elmastas ve ark., 2018).

2.8 Çinko Oksit Nanopartikülü

Mikrobiyolojik güvenliğin sağlanmasında kullanılan stratejiler arasında kimyasal koruyucular, pastörizasyon gibi ısı işlemler, dehidratasyon ve ışınlama gibi diğer fiziksel yöntemler ile yüksek hidrostatik basınç gibi yeni muhafaza işlemleri

bulunmaktadır (Gonzalez ve Barrett, 2010). Nanopartikül metal oksitleri geliştirilmekte olan yeni bir takım araştırma ve sağlıkla ilgili uygulamaları kapsamaktadır. Yüksek derecede iyonik metal oksitler, sadece çok çeşitli fiziksel ve kimyasal özellikleri ile değil aynı zamanda antibakteriyel etkinlikleri için de ilgi çekici bir alan olmuştur (Jones ve ark., 2008). Nanoteknolojinin çoğu alanda kullanılan önemli avantajları ile birlikte nanopartikül olarak hazırlanan çeşitli formülasyonları bakteriler üzerine inaktivasyon meydana getirmiştir (Thill ve ark., 2006).

Çinko oksit (ZnO), inorganik bir bileşik olarak birçok alanda kullanılmaktadır. ZnO, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından kullanımı güvenli (Generally Recognized as Safe/GRAS) olarak sınıflandırılmıştır. Nanoteknoloji alanında meydana gelen gelişmelere paralel olarak materyallere yeni özellikler kazandırılabilir (Espitia ve ark., 2012). Nanopartiküller (NPS) organizmalarda antibiyotik direnci meydana getirmeden yaygın bulaşıcı ajanlara karşı güvenli ve etkili alternatif bir tedavi olduğu bildirilmektedir (Liu ve ark., 2009; Losasso ve ark., 2014). ZnO-NP'lerin besin takviyesi olarak kullandıklarında broylerlerde ve süt ineklerinde bağışıklık sistemini güçlendirdikleri ve süt ineklerinde süt üretimini arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca, ZnO-NP'lerin, memeli hücrelerine düşük toksisite ile insan ve hayvanlar için çok çeşitli patojenik bakterilerine karşı antibakteriyel etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir. ZnO-NP'lerin bakteriyel hücrelere tahrip edici oksidatif strese neden olan reaktif oksijen türleri ürettiği bildirilmiştir (Sahoo ve ark., 2014; Beyth ve ark., 2015). ZnO-NP'lerin hücreye nasıl bağlandıkları ve Zn^{+2} iyonuna dönüştüğü sitoplazmaya nasıl transfekte edildiği hala net değildir. Gram pozitif bakterilerin peptoglikan katmanlarında bulunan Teyikoyik asit ve lipoteiyikonik asidin bulunması diğer taraftan gram negatif bakterde negatif yüklü hücre duvarıda polifosfat iyonlarından zengin olması ZnO-NP'lerin sitoplazmaya girişlerinde katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Gross ve ark., 2001; Djurišić ve ark., 2015). Sonuç olarakda teichoic asit ve lipoteichoic asidin ZnO-NP'lerin ve Zn^{+2} dönüşümünü kolaylaştırdığı sanılmaktadır. Joe ve ark. yaptıkları çalışmada ZnO-NP'nin etkisinin transfeksiyondan değil de bakteriye tutunmasından kaynaklandığını öngörmektedir (Joe ve ark., 2017).



Şekil 2.3. ZnO-NP'lerin Zn²⁺ dönüşümü.

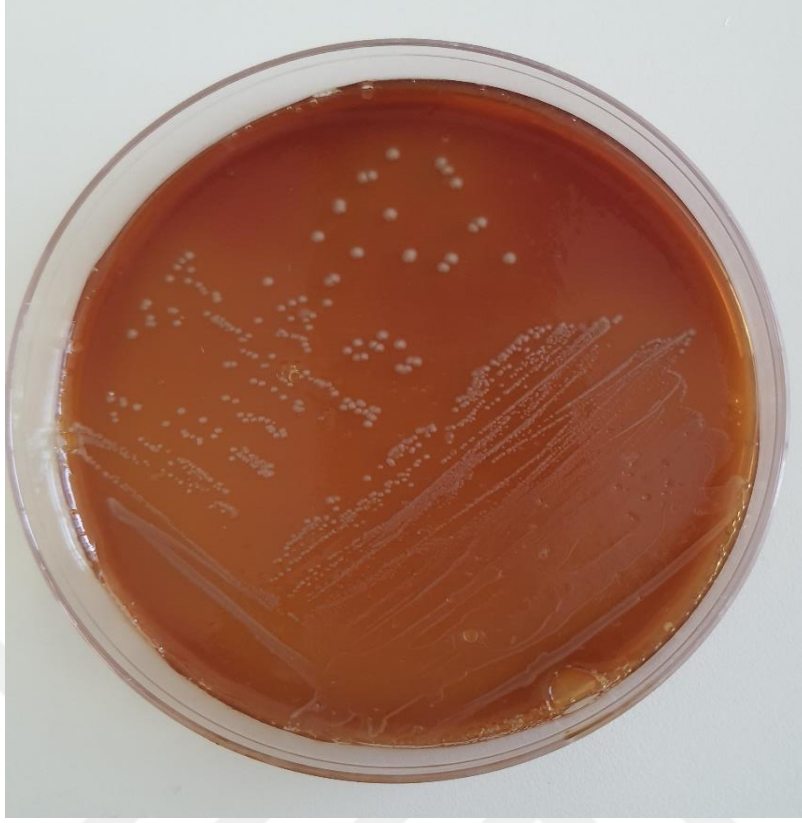
3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Subklinik mastitisli süt örneklerinin toplanması

Burdur merkez ve tüm ilçelerini temsil edecek bir şekilde ≥ 30 ve üzeri kapasiteye sahip farklı çiftliklerde bulunan toplam 350 süt ineğine ait bilgiler kaydedilmiştir. Sağlıklı olarak görünen her bir meme başı antiseptik solüsyon ile dezenfekte edildikten sonra, ilk süt damlaları atılarak meme başlarından elde edilen sütlere Kaliforniya Mastitis Testi (KMT) uygulanmıştır (Schalm ve Noorlander, 1957). Skorlanan (I, II, III ve IV) test sonucunda; III ve IV pozitif (300.000 SHS/ml) olarak belirlenen 144 hayvana ait meme başından toplam 230 süt örneği, 100 ml olarak mikrobiyolojik analiz amacıyla soğuk zincir altında laboratuvara transfer edilmiştir (Buyukcangaz ve ark., 2013). İlgili örneklerin toplanmasında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 18.09.2019 tarihli ve 541 sayılı kararı gereği hayvana yönelik bir müdahale olmadığı ve sadece süt örneği toplanacak olması sebebiyle etik kurul kararı gereği olmadığına dair onay alınmıştır.

3.2 Süt Örneklerinden *S. aureus* İzolasyonu

Kaliforniya mastitis testi pozitif meme başlarından alınan süt örneklerinden 0,1 ml süt örneği %5 koyun kanı içeren kanlı Columbia agarda (Oxoid, CM0331) 37°C'de 72 saate kadar inkübe edilmiştir. Kanlı agarda üreyen gri-beyaz kolonilere morfolojik olarak Gram boyama, hemolitik özellik, katalaz, koagülaz, DNase, anaerobik mannitol aktivitesine yönelik testler yapılmıştır (NMC, 1999; ISO, 2003; Wang ve ark., 2015). Elde edilen şüpheli izolatlar Brain Heart Infusion (BHI) broth içerisinde zenginleştirdikten sonra %20 gliserol ile -20°C'de muhafaza altına alınmıştır.



Şekil 3.1: Kanlı agarda izole edilen *S. aureus* şüpheli koloniler.

3.2.1 Gram Boyama

Gram boyama için taze kültür (18-24 sa) hazırlandı. Temiz bir lam üzerine alınan taze kültür kuruduktan sonra bek alevinde tespit edildi. Preparat üzerine kristal viyole dökülerek 1 dk boyunca boyandı. Boya uzaklaştırdıktan sonra preparat üzerine Gram İyodin solüsyonu dökülerek 1 dk beklendi. Dekolorizasyon işlemi %96'lık etil alkol ile renk giderilinceye kadar yapıldı. Etil alkolün uzaklaştırılması için preparat distile su ile yıkandı. Son olarak preparat sulu fuksin ile 30 sn boyunca boyandı ve tekrar distile su ile yıkanarak boya giderildi. En sonunda preparat kurumaya bırakıldı. Preparatın incelenmesi için üzerine immersiyon yağı ilave edilerek 100X objektifte büyütülerek incelendi. Mor renkli, tek, ikili ya da üzüm salkımı şeklinde düzensiz görünen mikroorganizmalar *Staphylococcus* spp. olarak değerlendirildi (Procop ve ark., 2017).

3.2.2 Katalaz Testi

Katalaz testi için Koyun Kanlı Agar'da üreyen saf kolonilerden biri steril öze yardımıyla seçilerek temiz bir lam üzerine konuldu. Koloni üzerine 1-2 damla % 3 'lük H_2O_2 ilave edilerek gaz kabarcıklarının görülmesi beklendi. Test sonucu gaz kabarcıkları oluştuğunda katalaz pozitif, gaz kabarcıkları oluşmadığında katalaz negatif olarak değerlendirildi (Procop ve ark., 2017).

3.2.3 Koagulaz Testi

3.2.3.1 Lamda Koagulaz Testi

Steril öze yardımıyla bir öze dolusu steril fizyolojik tuzlu su lam üzerine kondu. Steril öze yardımıyla Koyun Kanlı Agar'daki saf kolonilerden bir adet seçilip fizyolojik tuzlu su ile karıştırıldı. Daha sonra EDTA'lı tavşan plazması ile yavaşça karıştırıldı ve 10 sn boyunca kümelenme olup olmadığı gözlemlendi. Aglütinasyonun gözlemlenmesi testin pozitif olduğunu göstermektedir. Lamda koagulaz testi için *S. aureus* ATCC 25923 pozitif kontrol olarak kullanıldı (UMS, 2015).

3.2.1.2 Tüpte Koagulaz Testi

Lamda koagulaz testinde şüpheli olarak görülen sonuçlar için tüpte koagulaz testi yapıldı. Tüpte koagulaz testi için seçilen koloniler Brain Heart Infusion Broth'a (Oxoid, CM0225) inokule edilerek 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan çıktıktan sonra Bactident® Coagulase (113306, Merck)'ın belirttiği direktiflere göre tüpte koagulaz testi yapıldı. Öncelikle dondurularak kurutulmuş EDTA-tavşan plazması 3 ml distile su içinde çözülde. Sulandırıldıktan sonra tüplerin her birine 0,3 ml EDTA-tavşan plazması dağıtıldı. Daha sonra plazmanın üstüne Brain Heart Infusion Broth'da zenginleşen kültürden 0,1 ml ilave edildi. Tüpler 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Her yarım saate bir çalkalamadan hafifçe yana yatırarak tüp içeriği koagülasyon açısından kontrol edildi. Test 4-6 saat sonra negatif çıkan ya da kısmi pıhtılaşma görülen tüpler inkübasyonda bırakıldı ve 24 saat sonra son bir değerlendirme yapıldı. Pıhtılaşma oranları +1, +2, +3, +4 olarak değerlendirildi ve

yalnızca tüp eğildiğinde veya ters çevrildiğinde yerinde kalan sıkı ve tam pıhtı bu test için pozitif olarak kabul edildi. Tüpte koagülaz testi için *S. aureus* ATCC 25923 pozitif kontrol olarak kullanıldı (FDA, 2016).

3.2.4 DNase Testi

Dnase testi *S. aureus*'u diğer stafilokoklardan ayırmada deoksiribonükleaz (DNase) enzimi varlığını saptamak için DNA içeren DNase agar kullanılmaktadır. Bu amaçla BHI Broth kültürden 1-2 öze dolusu alınarak DNase Agar'a çizme plak yöntemiyle ekimler gerçekleştirilerek 37°C'de 24 saat inkübasyona kaldırıldı. İnkübasyon sonrasında üreyen koloniler üzerine besiyerini tamamen kaplayacak şekilde 1 N HCl (Merck 1.00317) asit çözeltisi ilave edildi. Kolonilerin etrafında oluşan şeffaf zonlar pozitif; opak alanlar ise negatif olarak değerlendirildi (Jeffries ve ark., 1957; UKSMI, 2014).

3.2.5 Anaerobik Mannitol Testi

S. aureus'un mannitolü anaerob ortamda fermente etmesi diğer *Staphylococcus* türlerinden ayırmada önemli bir parametredir. Brain Heart Infusion Broth'da 37°C'de 18-24 saat zenginleşen kültürden 1-2 öze dolusu alınarak mannitol ilave edilmiş Phenol Red Broth Base bulunan tüplere ilave edildi. Anaerob ortam yaratılması için üzeri en az 25 mm kalınlığında steril parafin ile kapatıldı. İnkübasyona 37°C'de 5 gün süreyle bırakıldı. Daha sonrasında besi yerindeki kırmızı rengin sarıya dönmesi test sonucu pozitif olarak değerlendirildi (FDA, 2016).

3.3 *S. aureus* İzolatlarının Moleküler Tiplendirmesi

3.3.1 DNA ekstraksiyonu

Fenotipik olarak *S. aureus* olarak saptanan suşlar, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği ile doğrulanmıştır. Bu amaçla öncelikle Akineden ve ark. (2008) uyguladığı yönteme göre, izolatlar 18 µl lizostafin (Sigma–Aldrich, USA) içeren 180

µl TE buffer (10 mmol Tris HCL/l, 1 mmol EDTA/l, pH 8.0) içerisinde hücreler süspansiyon edilerek 37°C’de 1 saat süre ile inkübasyona bırakıldı ve enzimatik olarak GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, K0721) ile DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Bu kapsamda, mikrosantrifüj tüpleri içerisine Brain Heart Infusion (Oxoid, CM1135) sıvısında 37°C’de 24 saat zenginleştirilen kültürden 1.5 ml ilave edildi. Daha sonra 5.000 g.’de 10 dk. santrifüj işlemi uygulandı, sıvı kısım atıldı. Temiz bir pellet elde edilmesi amacıyla fizyolojik tuzlu su ile tekrar bir santrifüj işlemi yapıldı. Tris EDTA (Sigma-Aldrich, 93283) çözeltisinden 180 µl alınarak 18 µl lizostafin (Sigma, L7386) ile karıştırıldı ve bakteriyel pellet üzerine eklendi. İnkübasyon için 37°C’de 60 dk. bekletildi. İnkübasyon işleminden sonra karışım üzerine 200 µl lizis solüsyonu ve 20 µl proteinaz K ilave edilerek pipetasyon yapıldı. Hücrelerin lizisi amacıyla 56°C su banyosunda 30 dk. bekletildi.

Su banyosunda bulunan karışım üzerine 20 µl RNase solüsyonu eklendi ve karıştırıldıktan sonra 10 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. Hazırlanan lizat GeneJET DNA izolasyon kolonu içerisine aktarıldı ve birikim tüpü takıldı, 6.000 g.’de 1 dk. santrifüj işlemi yapıldı. Birikim tüpünde biriken sıvı ile birlikte birikim tüpü atılarak kolona yeni bir tüp takıldı. Kolon üzerine 500 µl buffer I eklendi ve 8.000 g.’de 1 dk. santrifüj işlemi uygulandı. Birikim tüpü içerisindeki sıvı dökülerek tüp tekrar kolona takıldı. Kolon üzerine 500 µl buffer II eklendi ve 12.000 g.’de 3 dk. santrifüj yapıldı. Birikim tüpleri atılarak kolona DNA’nın muhafaza edileceği mikrosantrifüj tüpleri takıldı. Mikrosantrifüj tüpleri üzerine ortalama 100 µl elution buffer ilave edilerek oda sıcaklığında 2 dk. bekletildi. Kolon üzerindeki DNA’nın buffer ile birlikte muhafaza tüpüne aktarılması için 8.000 g.’de 1 dk. santrifüj işlemi uygulandı. Elde edilen DNA moleküler çalışmalarda kullanılmak amacıyla -20°C’de saklandı.

3.3.2 *nuc* Gen Tespiti

İzolatlarda *S. aureus*’a spesifik termonükleaz (*nuc* gen) geni doğrulaması PCR yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Mehrotra ve ark. (2000) ile Keyvan ve Ozdemir (2016) tarafından bildirilen yöntemlere göre çalışma tamamlandı. Standart PCR işlemi Lem ve ark., (2001) tarafından bildirilen primer çiftleri kullanarak (5’-ATA GGG ATG GCT ATC AGT AAT GT -3’/ 5’-GAC CTG AAT CAG CGT TGT CTT

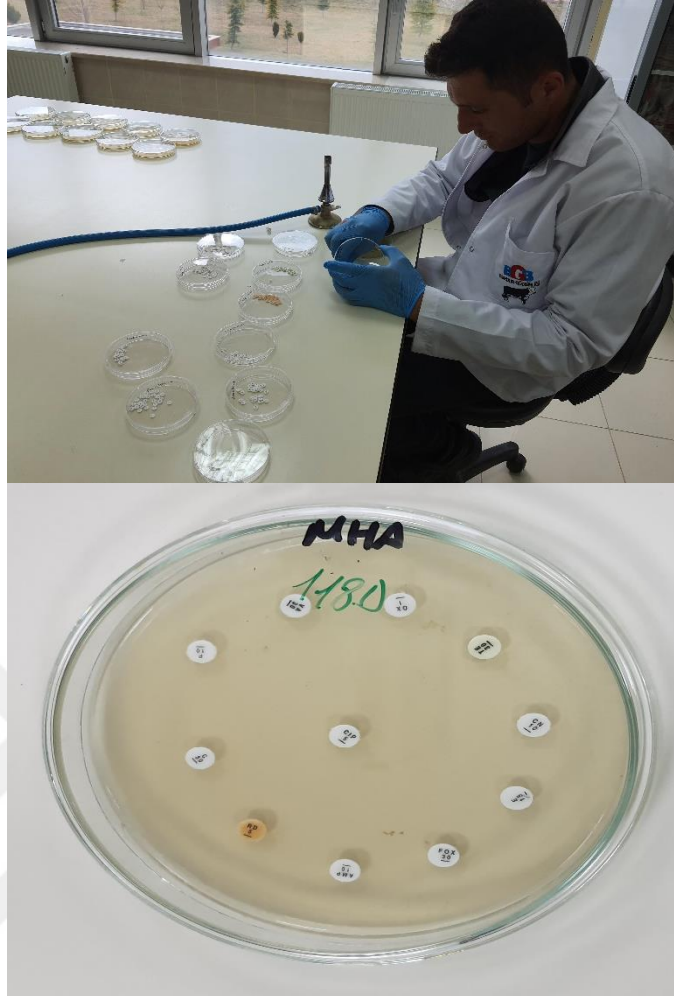
C- 3') 20 µl toplam hacimde 5x FIREPol® Master Mix (Solis Biodyne, Tartu, Estonia) kullanarak 95°C 4 dk ön denatürasyonu takiben, 30 siklus olacak şekilde; 95°C'de 40 s, 55°C'de 30 s, 72°C'de 40 s ve son olarak 72°C'de 10 dk koşullarında uygulanmıştır.

3.3.3 *coa* Gen Tespiti

İzolatlarda koagulaz geni (*coa*) Goh vd. (1992) tarafından bildirilen COAG2 (5'-CGA GAC CAA GAT TCA ACA AG-3') ve COAG3 (5'-AAA GAA AAC CAC TCA CAT CA-3') primer çiftleri kullanarak Aras vd. (2012) tarafından bildirilen PCR amplifikasyon koşullarına göre tespit edildi. Amplifiye PCR ürünleri %1,5'lik agar jelde elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra görüntülendi.

3.4 İzolatlarda Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi

İzolatlarda antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi Kirby-Baur disk difüzyon yöntemine göre yapılmıştır (Hudzicki, 2009). Antibiyotiklerin seçiminde Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından önerilen antibiyotik tipleri kullanılmıştır. Bu antibiyotikler: penisilin (10 IU / disk), oksasilin (1 µg / disk), tetrasiklin (30 µg / disk), gentamisin (10 µg / disk), ampisilin (10 µg / disk), vankomisin (30 µg / disk), sefoksitin (30 µg / disk), kloramfenikol (30 µg / disk), eritromisin (15 µg / disk), siprofloksasin (5 µg / disk) ve rifampin (5 µg / disk)'dir .



Şekil 3.2. İzolatlarda antibiyotik direncinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi.

3.5 Yayla Kekiği Kullanarak ZnO NP Sentezi

Yayla kekiği (*Origanum minutiflorum*) birkaç defa deiyonize su ile yıkanarak toz parçacıklarından arındırıldı. 2,5 gram yayla kekiği tartılarak 200 mL deiyonize su içerisine eklendi. Karışım 30 dakika boyunca kaynatıldı ve oda sıcaklığında soğutulmaya bırakıldı. Hazırlanan ekstrakt Whatman filtre kağıdı ile süzüldü. 1,0 gram Çinko asetat dihidrat ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 50 ml deiyonize suda çözünüp 50 mL yayla kekiği ekstraktı ile karıştırıldı. Karışımın pH'sı 10'a ayarlanarak 80°C'de beyazımsı ZnO NP'ler oluşuncaya kadar manyetik karıştırıcıda bekletildi. Daha sonra reaksiyon karışımı 10.000 rpm hızında 10 dakika santrifüj işlemine tabi tutulduktan sonra pellet kısımları toplandı. ZnO NP'ler önce birkaç defa deiyonize su ile daha

sonra ise etil alkol ile yıkandı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Oluşan ZnO NP 400 °C'ye ayarlanmış fırında 1 saat boyunca kalsinasyona bırakıldı (Janaki ve ark., 2015).

3.5.1 Karakterizasyon

ZnO NP'lerinin karakterizasyonunda taramalı elektron mikroskobu SEM-EDS (JEOL JSM-7100F) , UV-Görünür bölge spektrofotometresi (Pg instrument, T60) ve X-Işını Difraktometresi (XRD) (PANalytical Empyrean) kullanılmıştır (Ramesh ve ark., 2015).

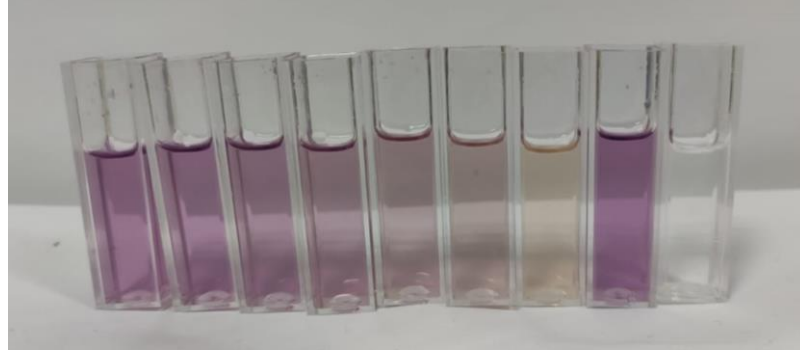
3.5.2 Antioksidan Aktivitenin Değerlendirilmesi

Antioksidan aktivite DPPH metodu ile gerçekleştirilmiştir. 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (yükseltgenmiş form) mor renkli stabil bir serbest radikaldir. Bir elektronu DPPH radikallerine verebilen bir antioksidan varlığında bozulur ve 517 nm'deki absorbans değişiklikleri spektrofotometrik olarak ölçülebilir. ZnO NP'ler 0,03125-4,0 mg/ml arasındaki artan derişimlerde metanol içerisinde çözüldü. Spektrofotometre kuvvetlerine her bir ZnO örneğinden 750 µl alınarak üzerine 0.1 mM DPPH eklendi ve karanlık ortamda 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Numunelerin absorbansı, inkübasyon süresinin sonunda UV-görünür bölge spektrofotometresi ile 517 nm'de ölçülmüştür. Her bir derişime ait örneğin (n=3), DPPH radikalini inhibe oranları (%inhibisyon) aşağıda verilen eşitliğe göre hesaplanmıştır. Elde edilen % inhibisyon değerleri grafiğe geçirilerek IC₅₀ değeri hesaplanmıştır (Nethravathi ve ark., 2015).

$$\text{DPPH İnhibisyonu (\%)} = [(Ac-As)/Ac \times 100]$$

Ac; kontrol absorbansı,

As; örneklerin absorbansı



Şekil 3.3: ZNO NP'nin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi.

3.6 *S. aureus* İzolatlarında ZnO NP Antibakteriyel Etkisinin MİK Yöntemi ile Tespiti:

Subklinik mastitisli sütlerden izole edilen *S. aureus* izolatlarında ZnO NP MİK değeri CLSI tarafından önerilen tüpte mikrodilüsyon yöntemine göre belirlendi. Bu amaçla; ZnO NP dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma, 472301) içerisinde çözündürüldü. DMSO antimikrobiyel etkisine yönelik MİK denemesi yapılmış ve bakteriyel üremenin olmadığı konsantrasyon ile ZnO NP çözücü etki sağlanmıştır. Böylece DMSO'nun deneme grupları üzerindeki antimikrobiyel etki oluşturmaması sağlanarak olası hatalı verilerin meydana gelmesi engellenmiştir. Ayrıca ek bir grup olarak bitkisel ekstrakt içermeyen ZnO NP antimikrobiyel etkisi incelenmiştir. ZnO NP konsantrasyonu 2000 µg/µl konsantrasyondan başlamak üzere iki kat oranında Mueller Hinton broth (MHB, Oxoid, CM0405B) içerisinde seyreltilerek 8 farklı dilüsyon elde edilmiştir. Her kuyucukta 200 µl dilüsyon olacak şekilde steril mikropalakalar içerisine aktarılmıştır. Bakteri süspansiyonu 0,5 McFarland olarak ayarlandıktan sonra 20 µl olarak her kuyucuğa ve kontrol kuyucuğuna eklenmiştir. Mikropalakalar 37±2°C'de 24±2 saat inkübe edilecek ve mikrobiyel üreme oranları 600 nm mikropalaka okuyucu (Epoch, BioTek) ile belirlenmiştir (Keyvan ve Tutun, 2019). İzolatlar ve referans suş üçlü tekrarlı olacak şekilde MİK değerleri tespit edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Subklinik Mastitis Bulguları

Çalışma kapsamında Burdur merkez ve ilçelerini kapsayacak bir tarama stratejisi ile birlikte toplam 350 adet holştayn ve simental ırkı süt hayvanı subklinik mastitis açısından taranmıştır. Subklinik mastitis açısından gerçekleştirilen değerlendirme sonucunda; toplam 144 adet (%41,14) hayvan pozitif olarak tespit edilmiştir. Subklinik mastitis pozitif olarak tespit edilen bu hayvanlarda toplam 230 adet örnek toplanmıştır. Bu örneklerin 119'u (%51,74) *S. aureus* şüpheli olarak ayrılmıştır. Elde edilen izolatlaraya yönelik olarak yapılan identifikasyon testleri sonucunda ise 34 (%14.70) adet izolat *S. aureus* olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre; subklinik mastitis yönünden pozitif hayvanların 29'u (%20,13) *S. aureus* açısından pozitif olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.1. Çalışma kapsamında subklinik mastitis yönünden taranan hayvan sayıları.

Taranan Hayvan Sayısı	Subklinik Mastitis Pozitif Hayvan Sayısı (%)	Örnek Sayısı	<i>S. aureus</i> şüpheli örnek sayısı	<i>S. aureus</i> Pozitif Hayvan Sayısı	<i>S. aureus</i> İzolat Sayısı
350	144 (%41,14)	230	119 (%51,74)	29 (%20,13)	34 (%14.70)

Tablo 4.2. Klasik kültür ve moleküler doğrulamalar ile elde edilen izolatlaraya ait bazı bilgiler.

Örnek no	Yaş (Ay)	CMT Pozitif meme lobu sayısı
3b	44,5	3
12c	75,6	2
13c	40	2
13d	40	2
14b	40	4
15c	146,6	1
17a	47,7	1

Tablo 4.2. (Devam)

19a	58,9	4
19b	58,9	4
21b	46,6	2
32a	54,4	1
33b	126,8	1
38d	52,6	3
44d	45,9	2
47b	85,1	1
52d	102,7	2
53d	102,7	2
84d	40,7	3
88a	77,1	2
100Aa	*	
100Ab	*	
100d	*	
110a	69,1	1
111a	147,1	2
112a	70,1	2
118d	33,2	1
119c	33,1	2
122c	52,1	3
125a	98,3	1
128d	*	2
131c	*	1
132a	*	3
132b	*	3
132d	*	3
135a	*	1

Çalışma kapsamında subklinik mastitis açısından taranan süt hayvanlarında sağım amaçlı kullanılan sistemler gözlemlenmiştir. Subklinik mastitis açısından otomatik sağım sistemi kullanan işletmeler ile diğer sistemlerin kullnıldığı birimler arasındaki ilişki Tablo 4.3’de gösterilmektedir.

Tablo 4.3. Sağım sistemi ve subklinik mastitis ilişkisi.

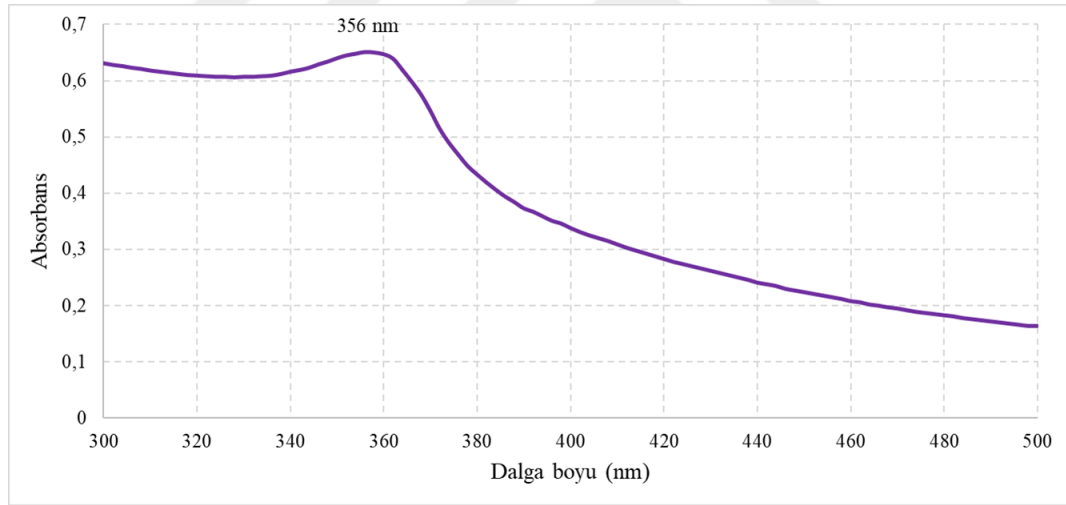
Sağım Makinası	Taranan hayvan Sayısı	CMT Pozitiflik Yüzdesi (%)
Taşınabilir makine sistemi	46	53,3
Otomatik sağım sistemi	170	39,1
Yemlik arkası sağım sistemi	114	48,1

Tablo 4.4. Mastitis aşılama durumuna göre CMT pozitiflik oranı.

Aşılama Durumu	%
Aşılı	47,75
Aşısız	43,18

4.2 Karakterizasyon Sonuçları

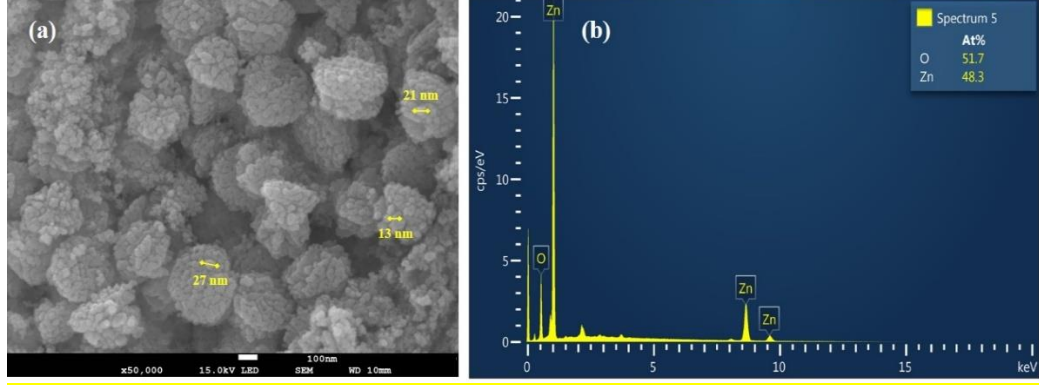
Yeşil sentez yöntem ile yayla kekiğinden sentezlenen ZnO NP'lere ait UV-Görünür bölge spektrumu Şekil 4.1'de görülmektedir. ZnO NP'lere ait karakteristik pik 356 nm dalga boyunda görülmektedir. Lingaraju ve ark. (2016) sedef otu (*Ruta graveolens*) kullanarak sentezledikleri ZnO NP'lerin absorpsiyon pikini 355 nm'de, Chen ve ark. (2019) *Scutellaria baicalensis* bitkisi kullanılarak, Safawo ve ark. (2018) ise *Crambe abyssinica* bitkisini kullanarak sentezledikleri ZnO NP'lerin 360 nm dalga boyunda pik verdiği görülmektedir. Literatürdeki bu çalışmalar bizim elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir.



Şekil 4.1. ZnO NP'lerin UV-görünür bölge spektrumu.

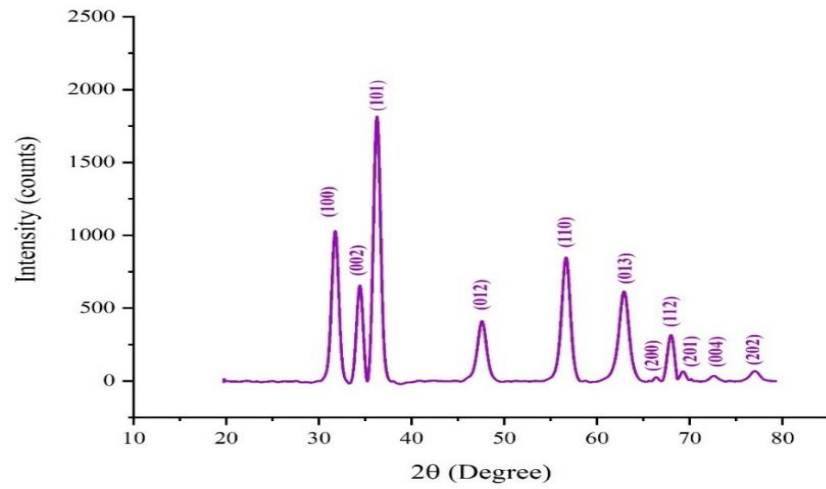
Yeşil sentezlenmiş ZnO NP'lerin morfolojisi, SEM-EDS analizi ile gerçekleştirildi. Şekil 4.2' (a) da görüldüğü üzere nanoparçacıklar 13-27 nm arasında değişen boyutlarda birleşerek küresel bir şekil oluşturmuştur. ZnO NP'lere ait EDS analizinde ise çinko ve oksijene ait keskin pikler elde edilmiştir (Şekil 4.2 b). ZnO NP'ların atomik yüzdeleri çinko için % 48,3 ve oksijen için % 51,7'dir. Elde edilen

SEM-EDS sonuçları, Bala ve ark. (2015) tarafından sentezlenen ZnO NP'lere ait sonuçlar ile benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.2. (a) ZnO NP'lerin SEM görüntüleri (b) ZnO NP'lerin EDS spektrumu.

Nanoparçacıkların kristal yapısını karakterize etmek için XRD analizi kullanıldı. XRD kırınım deseninden, 96-230-0114 numaralı COD kartından alınan verilerle karşılaştırıldığında altıgen faz (wurtzite yapısı) ile çok iyi eşleşir. Kırınım desenleri incelendiğinde elde edilen fazın hekzagonal wurtzite kristal yapısında Zincite (ZnO) fazında (96-900-4179) olduğu tespit edilmiştir. ZnO fazına ait 31,7°, 34,4°, 36,3°, 47,6°, 56,6°, 62,9°, 66,4°, 68,0°, 69,3°, 72,6° ve 77,0° 2θ karakteristik piklerinin sırasıyla (100), (002), (101), (012), (110), (013), (200), (112), (201), (004) ve (202) düzlemlerine karşılık geldiği belirlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. ZnO fazına ait pik değerleri.

Sentezlenen ZnO nanopartiküller için kristal boyutu ölçümü Debye-Scherrer eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır.

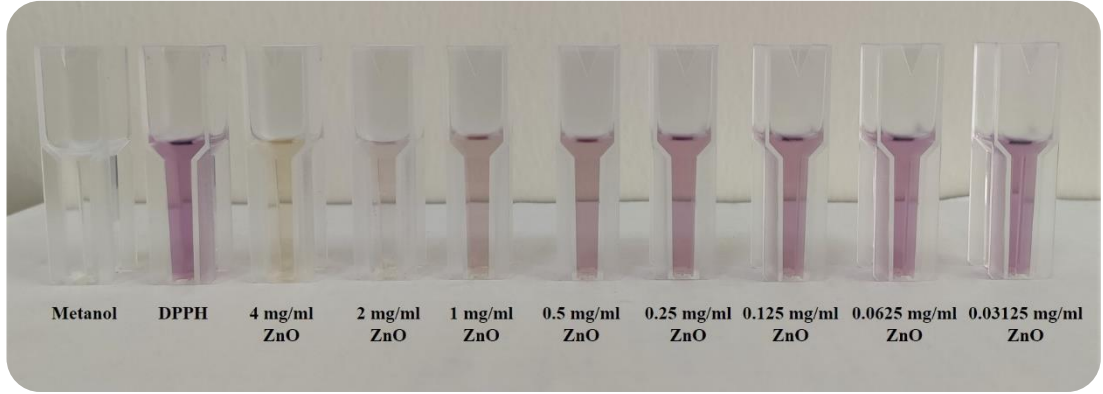
$$D = \frac{0,94 \lambda}{\beta \cos \theta}$$

Yukarıdaki formülde, D: kristal boyutu, λ : CuK α radyasyonu (1,54 Å), β : maksimum pikin yarı uzunluk genişliği (FWHM), θ : XRD kırınım desenindeki maksimum pikin 2θ değerinden elde edilen Bragg açısı değeridir. Eşitlikte ilgili değerler yerine konduğu zaman ZnO NP'nin ortalama kristal boyutu 9,9 nm olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. ZnO NP'lerin ortalama kristal boyutunun hesaplanmasında kullanılan parametreler.

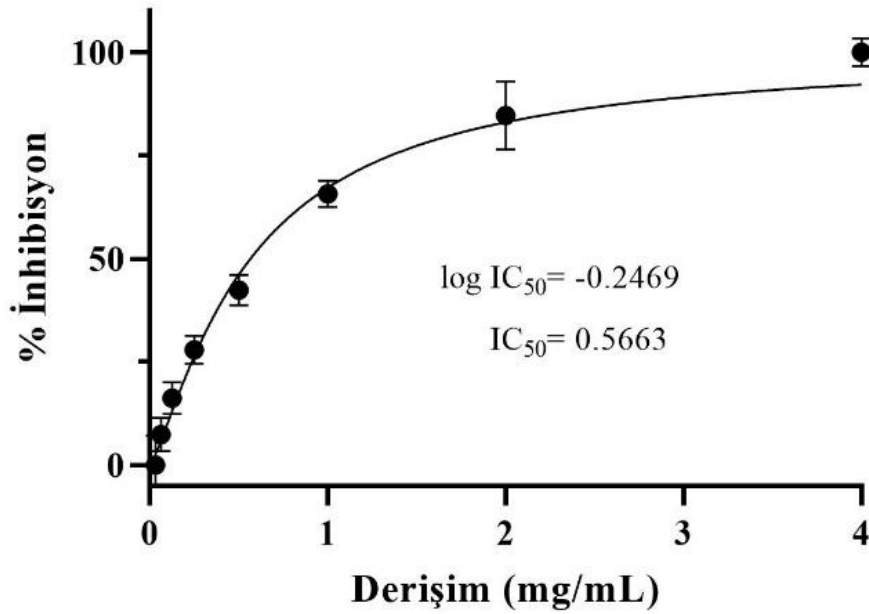
2θ (°)	FWHM (β)	Kristal boyutu (nm)
31,7	0,80	10,31
34,4	0,95	8,76
36,3	0,86	9,68
47,6	1,01	8,61
56,6	0,94	9,56
62,9	1,22	7,65
66,4	0,62	15,23
68,0	1,12	8,56
69,3	0,71	13,54
72,6	0,99	9,97
77,0	1,27	7,99
		Ortalama 9,99

DPPH antioksidan kapasitenin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan yöntemlerden bir tanesidir. DPPH serbest radikal kaynağı olarak işlev görür ve yeşil sentezlenmiş ZnO NP'ler ortama salınan serbest radikali temizler. Koyu mor renkli bir radikal olan olan DPPH, 517 nm'de maksimum absorbans verir ve ortamda antioksidan varlığında indirgenip rengi açılarak (açık sarı) indirgenmiş DPPH molekülüne dönüşür (Bayram ve ark., 2019).



Şekil 4.4. Farklı ZnO derişimlerinin DPPH ile 30 dakika inhibisyonu sonucu renk değişimi.

Her bir ZnO derişimine karşı % inhibisyon değerleri grafiğe geğirildiğinde IC_{50} değeri 0,5663 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.5. ZnO derişimine karşı IC_{50} değeri.

4.3 Antibiyotik Test Sonuçları

Bu çalışmada izolatların antibiyotik direnç seviyeleri incelendiğinde ampisiline %85,29, penisiline %82,35, oksasiline %61,76, sefoksitine %58,82, eritromisine, %44,11, vankomisine %35,29, rifampine %38,23, tetrasikline %26,47,

siprofloksasine %17,64, gentamisine %17,64 oranında direnç tespit edilmiştir (Tablo 4.6/4.7).

Tablo 4.6. İzolatlarda çoklu antibiyotik direnç oranları.

Antibiyotik Direnci	Adet	Yüzdelik Oranı (%)
Yalnızca bir antibiyotiğe dirençli olan	2	5,88
İki antibiyotiğe dirençli olan	3	8,82
Üç antibiyotiğe dirençli olan	1	2,94
Dört ve üzeri antibiyotiğe dirençli olan	25	73,53
Duyarlı	3	8,82
Toplam	34	100

Tablo 4.7. İzolatlarda antibiyotiklere karşı direnç seviyeleri.

Antibiyotik	Dirençli Sayısı		Orta Derecede Duyarlı Sayısı		Duyarlı Sayısı	
Penisilin	28	%82,35	0	%0,00	6	%17,64
Oksasilin	21	%61,764	0	%0,00	13	%38,23
Sefeksitin	20	%58,82	0	%0,00	14	%41,17
Gentamisin	6	%17,647	12	%40,8	15	%44,11
Eritromisin	15	%44,11	10	%29,41	6	%17,64
Tetrasiklin	9	%26,47	4	%11,76	21	%61,76
Siproflaksasin	6	%17,64	13	%38,23	15	%44,11
Ampisilin	29	%85,29	0	%0,00	5	%14,70
Rifampin	13	%38,23	1	%2,94	20	%58,82
Kloramfenikol	0	%0,00	0	%0,00	34	%100,00
Vankomisin	12	%35,29	0	%0,00	22	%64,70

Tablo 4.8. İzolatlarda antibiyotik direnç düzeyleri.

Kodu	Penisilin	Oksasilin	Sefoksitin	Gentamisin	Eritromisin	Tetrasiklin	Siprofoksasin	Ampisilin	Rifampin	Kloramfenikol	Vankomisin
100D	R	R	R	I	R	S	I	R	R	S	S
19A	R	R	R	R	I	R	I	R	R	S	S
14B	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
112A	R	S	S	I	I	S	I	R	S	S	R
132B	R	S	R	I	I	I	I	R	S	S	R
100Aa	R	R	R	I	R	S	I	R	R	S	R
32A	R	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S
21B	R	S	S	S	I	I	S	R	S	S	S
110A	R	S	S	S	R	S	I	R	S	S	R
118D	R	R	R	I	R	S	S	R	R	S	R
84D	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S
125A	R	R	R	S	R	S	S	R	R	S	S
52D	R	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S
13C	R	R	R	S	S	I	R	R	R	S	S
47B	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S
53D	R	R	R	S	I	S	I	R	S	S	S
100Ab	R	R	R	S	I	S	I	R	S	S	R
19B	R	R	R	S	I	S	R	R	R	S	R
135A	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
119C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
88A	R	R	R	I	R	R	I	R	R	S	R
122C	R	R	R	S	R	S	S	R	I	S	S
132D	R	R	R	S	I	S	I	R	R	S	S
128D	R	R	R	I	R	R	S	R	R	S	R
15C	R	R	S	R	I	S	R	R	S	S	R
131C	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S

*R: Dirençli, S: Duyarlı, I: Orta düzeyde dirençli

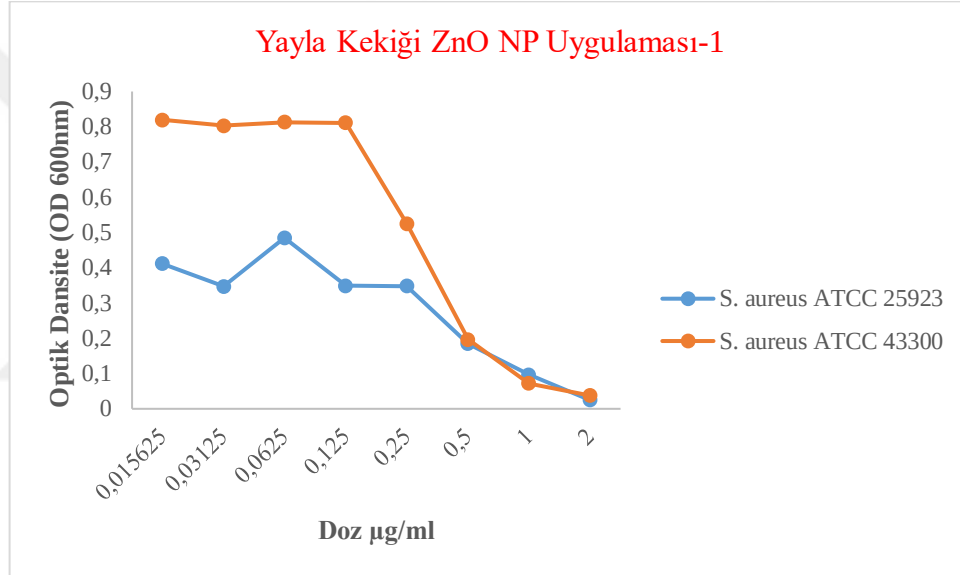
Tablo 4.8. (Devam)

Kodu	Penisilin	Oksasilin	Sefoksitin	Gentamisin	Eritromisin	Tetrasiklin	Siprofoksasin	Ampisilin	Rifampin	Kloramfenikol	Vankomisin
13D	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S
44D	R	R	R	I	R	S	I	R	R	S	S
12C	R	S	S	S	S	I	S	R	S	S	S
3B	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
111A	R	R	R	I	I	R	R	R	S	S	S
17A	S	S	S	S	I	S	R	S	S	S	R
38D	R	S	S	R	I	S	S	R	S	S	R
132A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

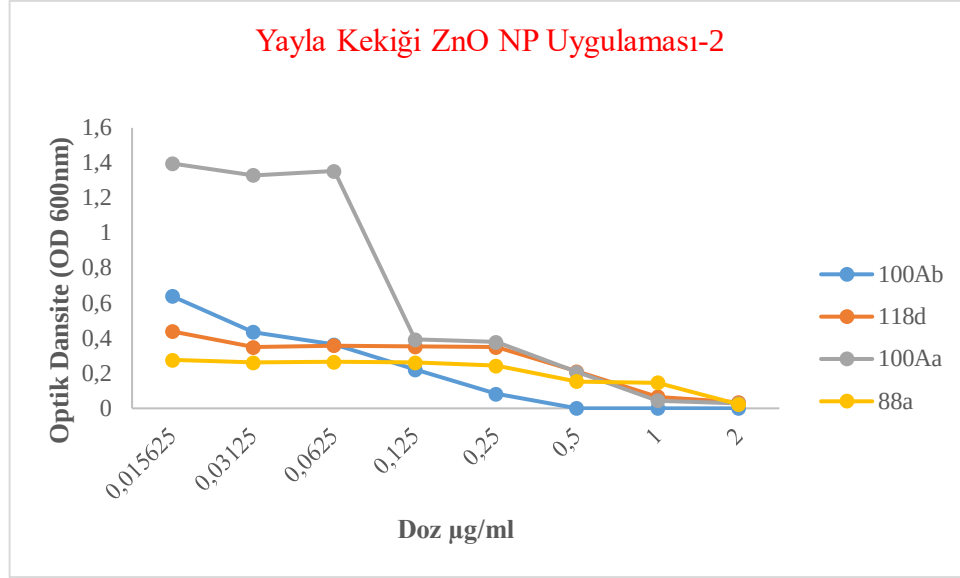
*R: Dirençli, S: Duyarlı, I: Orta düzeyde dirençli. Vankomisin CLSI (2007) raporuna göre değerlendirilmiştir. Ampisilin ise CLSI (2011) raporuna göre değerlendirilmiştir.

4.4 MİK Sonuçları

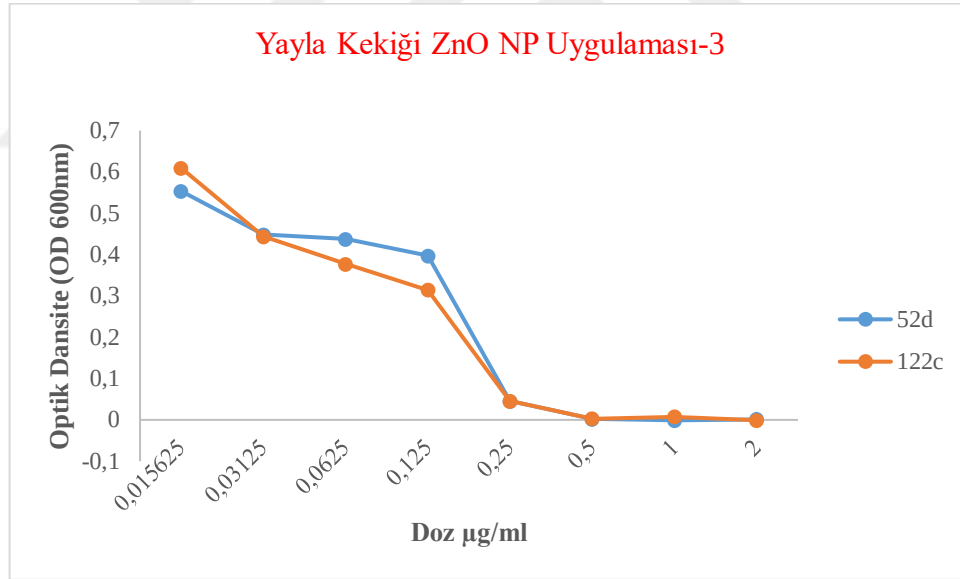
Planlanan deney grupları ile gerçekleştirilen çalışmalar 96'lık mikrolateler içerisinde tamamlanmıştır. Mikroplakalar $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 24 ± 2 saat inkübe edildi ve mikrobiyel üreme oranları 600 nm mikrolaka okuyucu (Epoch, BioTek) ile belirlenerek her bir deneme grubunda bulunan izolatlar için aşağıdaki grafikler elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ile sentezi yapılan yayla kekiği kaynaklı ZnO NP tüm izolatlar üzerine antimikrobiyel etki göstermiştir. Antimikrobiyel etkinin meydana geldiği etki değeri ise $62,5\text{ }\mu\text{g/ml}$ ile $2000\text{ }\mu\text{g/ml}$ arasında olduğu belirlenmiştir.



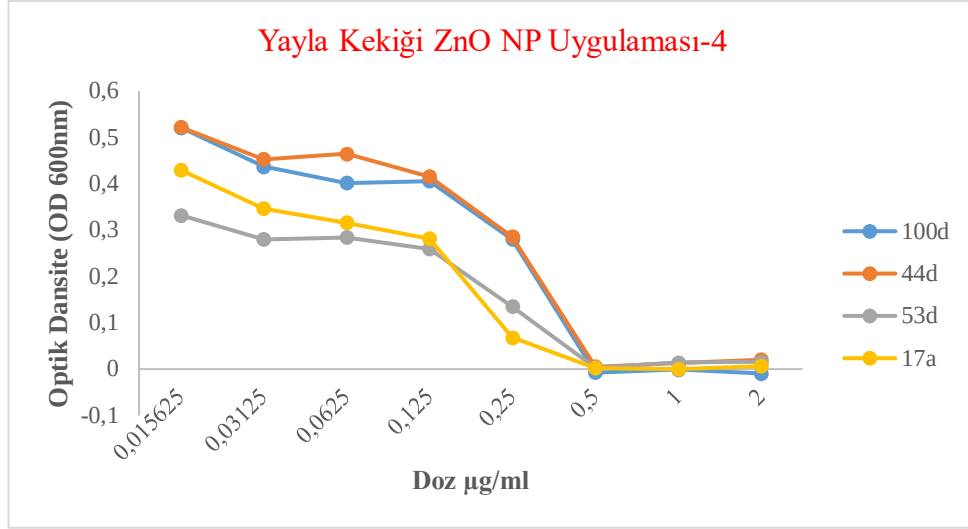
Şekil 4.6. Yayla Kekiki ile sentezlenen ZnO NP'nin *S. aureus* (ATCC 25923) ve *S. aureus* (ATCC 43300) üzerine etkisinin belirlenmesi.



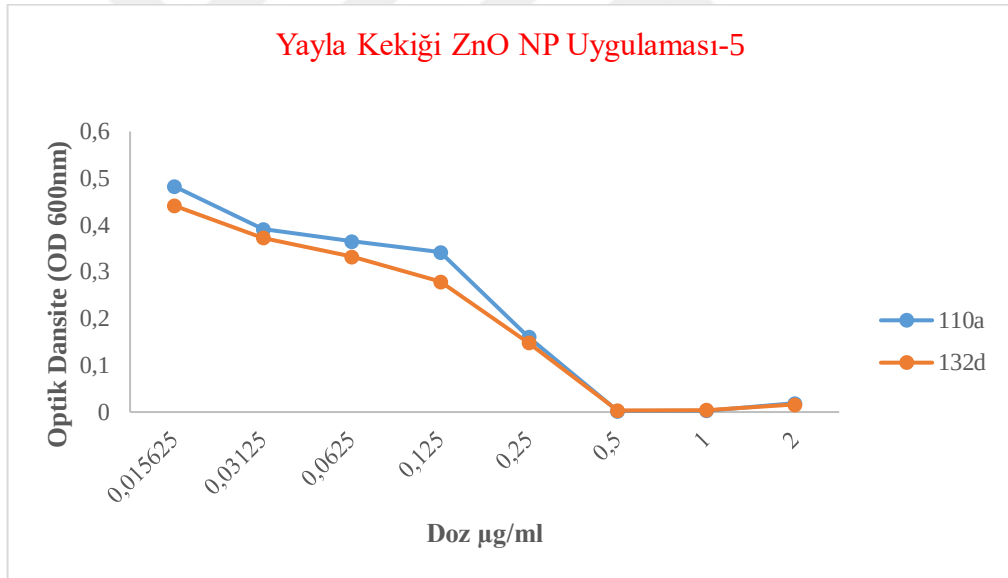
Şekil 4.7. Yayla Kekiği ile sentezlenen ZnO NP'nin çalışma kapsamında elde edilen 100Ab, 118d, 100Aa ve 88a izolatları üzerine etkisinin belirlenmesi.



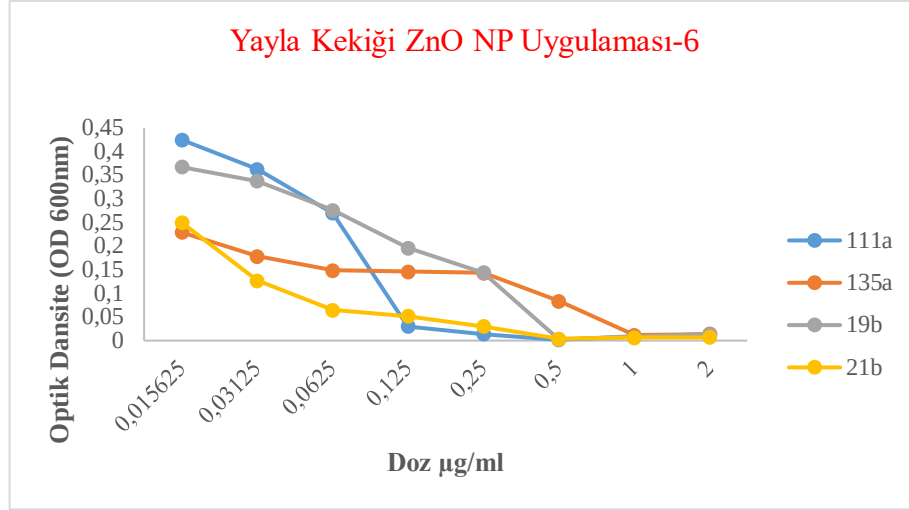
Şekil 4.8. Yayla Kekiği ile sentezlenen ZnO NP'nin çalışma kapsamında elde edilen 52d ve 122c izolatları üzerine etkisinin belirlenmesi.



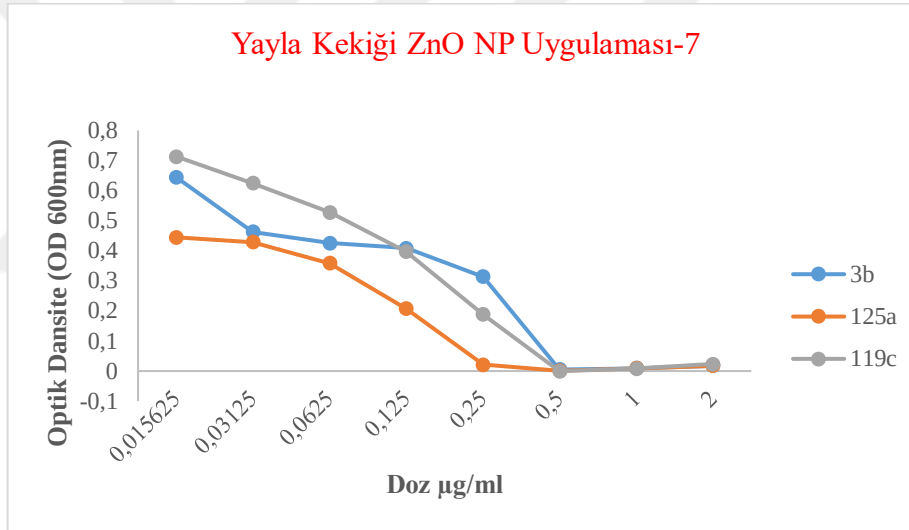
Şekil 4.9. Yayla Kekiği ile sentezlenen ZnO NP'nin çalışma kapsamında elde edilen 17a, 44d, 53d ve 100d izolatları üzerine etkisinin belirlenmesi.



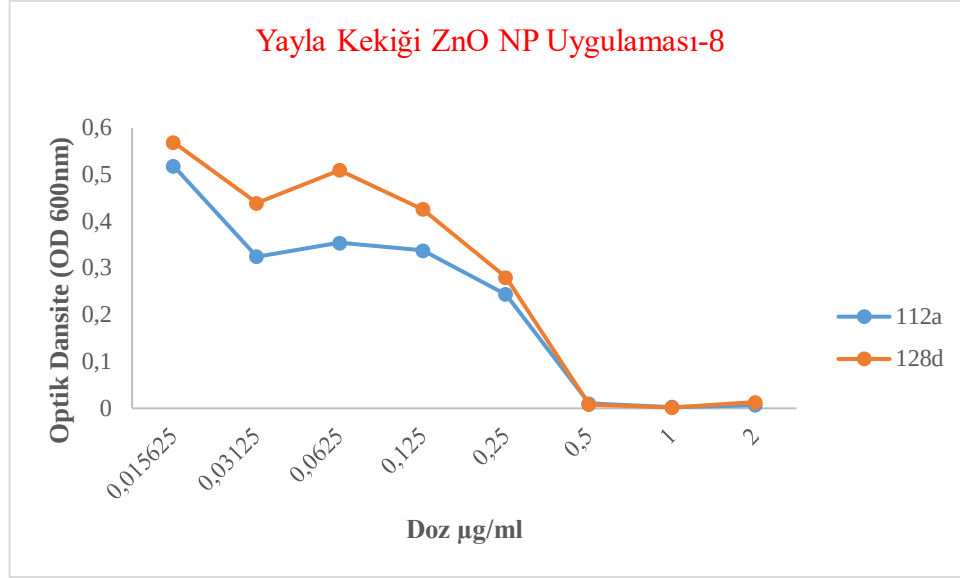
Şekil 4.10. Yayla Kekiği ile sentezlenen ZnO NP'nin çalışma kapsamında elde edilen 110a ve 132d izolatları üzerine etkisinin belirlenmesi.



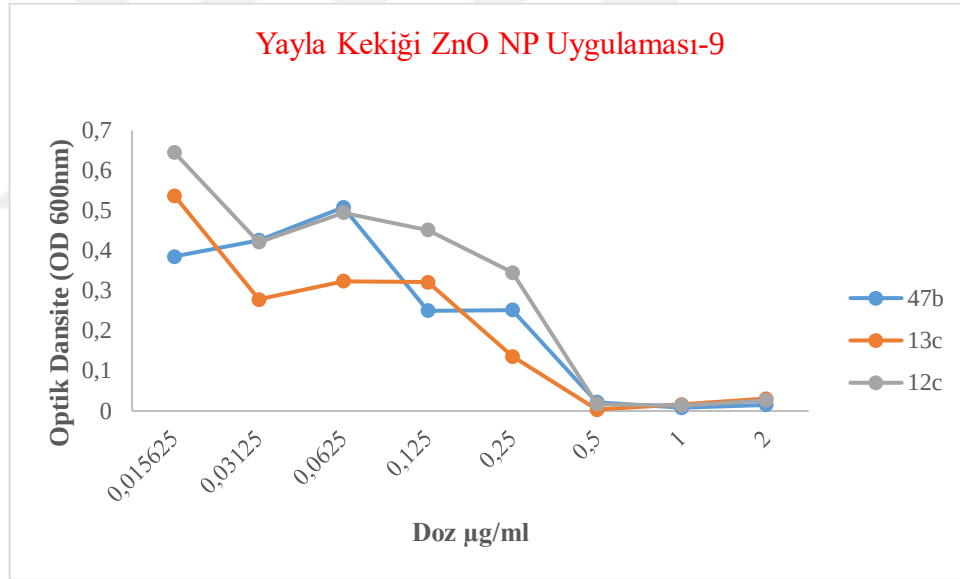
Şekil 4.11. Yayla Kekiği ile sentezlenen ZnO NP'nin çalışma kapsamında elde edilen 19b, 21b, 111a ve 132d izolatları üzerine etkisinin belirlenmesi.



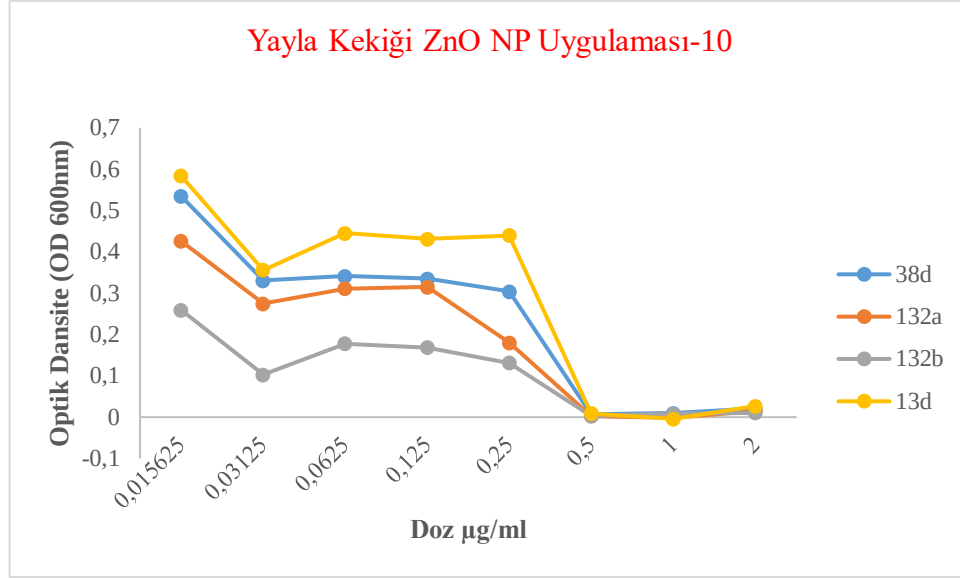
Şekil 4.12. Yayla Kekiği ile sentezlenen ZnO NP'nin çalışma kapsamında elde edilen 3b, 119c, ve 125a izolatları üzerine etkisinin belirlenmesi.



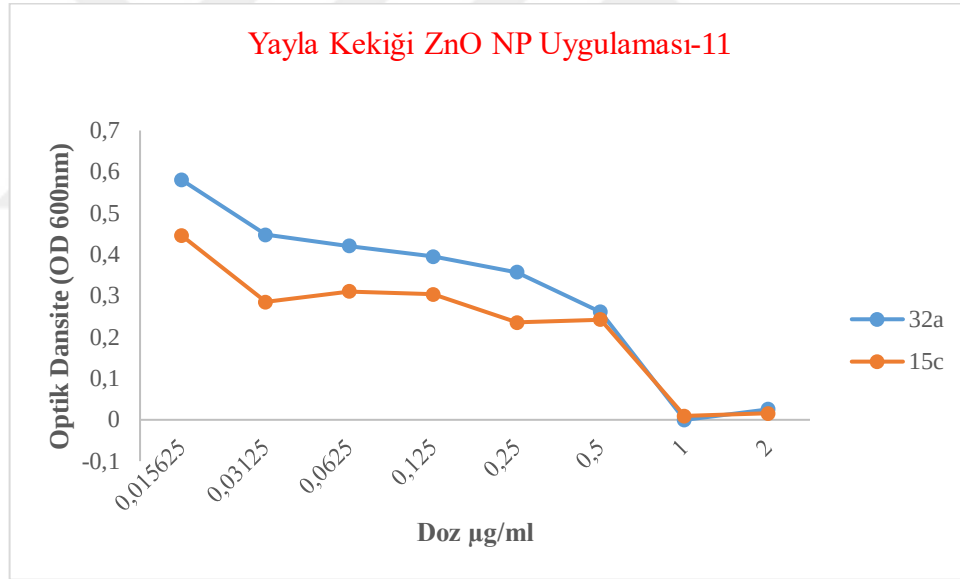
Şekil 4.13. Yayla Kekiği ile sentezlenen ZnO NP'nin çalışma kapsamında elde edilen 112a, ve 128d izolatları üzerine etkisinin belirlenmesi.



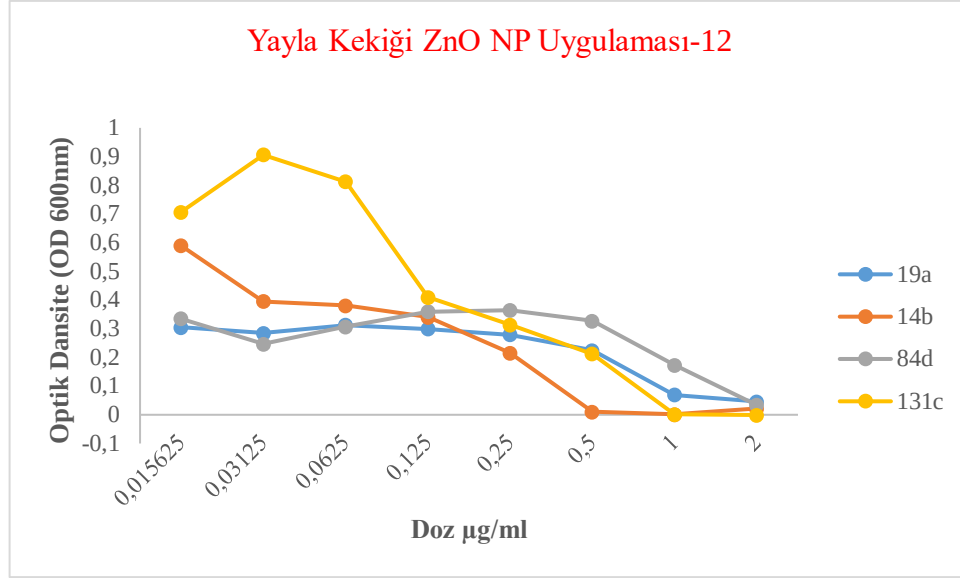
Şekil 4.14. Yayla Kekiği ile sentezlenen ZnO NP'nin çalışma kapsamında elde edilen 12c, 13c, 47b izolatları üzerine etkisinin belirlenmesi.



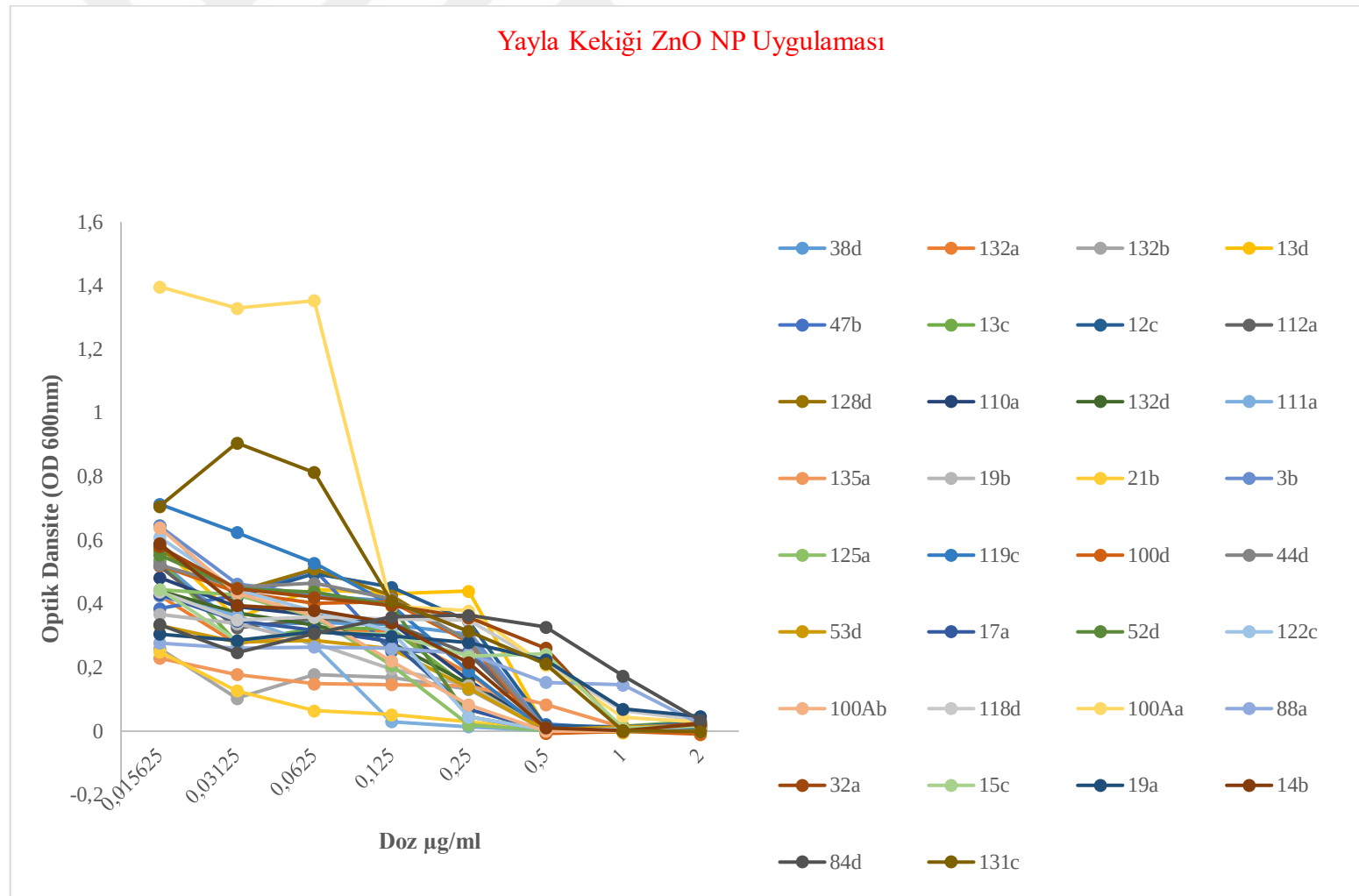
Şekil 4.15. Yayla Kekiği ile sentezlenen ZnO NP'nin çalışma kapsamında elde edilen 13d, 38d, 132a, 132b izolatları üzerine etkisinin belirlenmesi.



Şekil 4.16. Yayla Kekiği ile sentezlenen ZnO NP'nin çalışma kapsamında elde edilen 15c, 32a izolatları üzerine etkisinin belirlenmesi.



Şekil 4.17. Yayla Kekiği ile sentezlenen ZnO NP'nin çalışma kapsamında elde edilen 14b, 19a, 84d, 131c izolatları üzerine etkisinin belirlenmesi.



Şekil 4.18. Yayla Kekiği ile sentezlenen ZnO NP'nin çalışma kapsamında elde edilen tüm izolatlar üzerine etkisinin belirlenmesi.

Tablo 4.9. Yayla Kekiği ile sentezlenen ZnO NP'nin çalışma kapsamında elde edilen izolatlar üzerindeki MİK değerleri (µg/ml).

İzolat no	Mik Değeri µg/ml
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1000
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	1000
3b	500
12c	500
13c	500
13d	500
14b	500
15c	1000
17a	250
19a	500
19b	1000
21b	62,5
32a	1000
38d	500
44d	500
47b	500
52d	250
53d	500
84d	2000
88a	500
100Aa	1000
100Ab	250
100d	500
110a	500
111a	125
112a	500
118d	1000
119c	500
122c	250
125a	250
128d	500
131c	1000
132a	500
132b	500
132d	500
135a	500

5. TARTIŞMA

Mastitisin Türkiye’de varlığı üzerine yapılan çalışmaların incelenmesi ile Van’da 480 subklinik mastitisli süt örneğinden 106 tanesi *S. aureus* yönünden pozitif olarak bildirilmiştir. İzolatların %25,5’i enterotoksijenik özellikte olduğu belirlenmiştir (Boynukara ve ark., 2008). Kars ilinde 400 süt ineğinin subklinik mastitis yönünden taranması sonucunda 96 (%24) hayvan pozitif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif hayvanlardan elde edilen 235 süt örneğinin incelenmesi sonucunda 76’sı (%64,95) *S. aureus* olarak doğrulanmıştır (Sağlam ve ark., 2017). Orta Batı Anadolu’dan 463 subklinik mastitisli süt örneğinden yapılan analiz ile 83 *S. aureus* pozitif izolat elde edilmiştir. Bu izolatların 82’si (%98,8) en az bir antibiyotiğe dirençli olarak belirlenmiştir. İzolatların antibiyotiklere direnç oranlarının incelenmesi sonucunda ise penisiline (%63,8), trimetoprim / sülfametoksazol (%61,5) ampisilin (%61,5), eritromisin (%48,2), tetrasiklin (%34,9), siproflaksasin (%21,6), klindamisin (%19,3), kloramfenikol (%15,6), gentamisin (%9,6) sefoksitin (%4,9), vankomisin (%3,6), sephalotin (%2,4) nafsilin (%1,2) (Kenar ve ark., 2017). Aydın ilinde *S. aureus* ve koagulaz negatif stafilokok antimikrobiyel duyarlılığının tespiti amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada 300 mastitisli süt örneği materyal olarak kullanılmıştır. Mastitisli süt örneklerinin 85’i (%28,3) *S. aureus* olarak izole edilirken 30’u (%20) koagulaz negatif stafilokok olarak (20 (%33,33) *S. hyicus*, 16 (26.66%) *S. chromogenes*, 9 (15.00%) *S. epidermidis*, 5 (8.33%) *S. haemolyticus*, 4 (6.66%) *S. sciuri*, 3 (5.00%) *S. lentis* ve 3 (5.00%) *S. cohnii* subsp. *cohnii*.) tespit edilmiştir. *S. aureus*’un antimikrobiyel ajanlara direnç analizinde ise penisilin ve oksasiline direnç belirlenmiştir (Kırkan ve ark., 2005). Bu çalışmada izolatların antibiyotik direnç seviyeleri incelendiğinde ampisiline %85,29, penisiline %82,35, oksasiline %61,76, sefoksitine %58,82, eritromisine, %44,11, vankomisine %35,29, rifampine %38,23, tetrasikline %26,47, siprofloksasine %17,64, gentamisine %17,64 oranında direnç tespit edilmiştir. Bu durum süt hayvanlarında yüksek düzeyde antibiyotik dirençli izolatlar bulunduğunu göstermektedir. Antibiyotik alternatifi direnç kazanılmamış maddelerin geliştirilmesinin gerekli olduğu öngörülmektedir.

Türkiye’de Güney ve Doğu bölgelerdeki subklinik mastitisli hayvanlardan toplanan 700 süt örneğinin incelenmesi sonucunda 200’ü (%28,6) *S. aureus* olarak doğrulanmıştır. Çalışmada bu izolatların 161’i (%80,5) *coa* gen pozitif olarak değerlendirilerek polimorfizmi yapıları da incelenmiştir (Karahana ve ark., 2007). Elazığ ve çevresinden toplam 400 subklinik mastitisli süt ineğinden 92 *coa* pozitif *S. aureus* tespit edilmiştir. *S. aureus* izolatlarının 84’ü (%91,3) virülens faktörlerinden “clumping factor” geni olan *clfA* pozitif olarak değerlendirilmiştir (Karahana ve ark., 2011). Marmara bölgesinde bulaşıcı mastitis etkenlerinin varlığı ve antibiyotik direncine yönelik yapılan çalışmada; 270 subklinik mastitisli süt örneği toplanmıştır. Bu örneklerden 12’si *S. aureus* olarak tespit edilmiştir. Tüm *S. aureus* izolatlarının seftiofura dirençli olduğu tespit edilmiştir (İkiz ve ark., 2013).

İran’da gerçekleştirilen bir çalışmada toplam 111 *S. aureus* izolatu elde edilmiştir. *S. aureus* izolatlarının tamamı siprofloksasin, gentamisin, imipenem, minosiklin, oksasilin ve vankomisine duyarlı olarak belirlenmiştir. Direnç olanlarının incelenmesi ile ampisilin (%64), penisilin (%56), klindamisin (%22), tetrasiklin (%22), doksisiklin (%19), teikoplanin (%13), rifampin (%2) ve trimetoprim-sülfametoksazole (%2) şeklinde tespit edilmiştir. İzolatların %15’i üç veya daha fazla antibiyotik sınıfına çoklu dirençli olarak belirlenmiştir (Sahebkhia ve ark., 2011). Brezilya’da 107 *S. aureus* izolatının disk difüzyon yöntemi ile gerçekleştirilen antimikrobiyel duyarlılık test sonuçları değerlendirilmiştir. Çalışma ile 59 (%55,1) izolatının en az bir antibiyotik grubuna karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. İzolatlarda ampisilin (%55,1), eritromisin (% 2,8), penisilin (% 55,1) ve tetrasikline (% 7,4) karşı dirençler belirlendi (Rabello ve ark., 2005).

S. aureus’un subklinik ve klinik mastitiste varlığına yönelik çeşitli ülkelerde çalışmalar yapılmıştır. Tayland’da 224 süt hayvanının subklinik mastitis açısından taranması ile 132 (%52) süt hayvanının pozitif olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen 229 izolatın 24’ü *S. aureus* olarak doğrulanmıştır (Pumipuntu ve ark., 2019). Çin’de yapılan bir çalışmada incelenen 1153 süt örneğinin 773 (%67,4) örnek subklinik mastitis pozitif olarak değerlendirilmiştir. *S. aureus* oranı %6,24 olarak tespit edilmiştir (Song ve ark., 2020). Olivares-Perez ve ark. (2015) Meksika’da yaptıkları bir çalışmada 259 süt hayvanında subklinik mastitis oranını %20,5 olarak belirlemiştir.

Pakistan’da gerçekleştirilen çalışmada ise 500 süt hayvanının taranması sonucunda subklinik mastitis oranı %36 olarak bildirilmiştir (Bachaya ve ark., 2011). Uruguay’da sekiz yıllık bir periyodu kapsayarak yapılan bir çalışmada, yıllık *S. aureus* oranı subklinik mastitiste %78, klinik mastitiste ise %22 olarak bildirilmiştir (Santos ve ark., 2017). Wang ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada mastitisli süt ineklerinden 219 *S. aureus* izolatu elde edilmiştir. İzolatların 34’ ise MRSA olarak bildirilmiştir. Arjantin’de yapılan bir çalışmada toplam 829 mastitisli süt rneği incelenerek *S. aureus* oranı %28,1 olarak tespit edilmiştir (Srednik ve ark., 2018). Jamali ve ark. (2014) İran’da yaptıkları alışamada *S. aureus* oranını mastitisli sütlerde %20,1 olarak gözlemlemiş ve izolatların bazı antibiyotiklere karşı dirençli olduklarını gözlemlemiştir. in’de yapılan bir çalışmada 84 subklinik mastitisli süt örneğinden 65’i *S. aureus* pozitif olarak tespit edilmiştir (Ren ve ark., 2020). Mısır’da yapılan bir çalışmada 60 süt ineğinden toplanan süt örneğinin analizleri ile 48 örnek (%80) subklinik mastitis açısından pozitif olarak belirlenmiştir. Subklinik mastitis pozitif örneklerin 46’sı (%95,83) ise *S. aureus* varlığı tespit edilmiştir (Ewida ve ark., 2020). Brezilya’da yapılan bir çalışmada sağlıklı süt inekleri ile subklinik mastitis pozitif hayvanlardaki *Staphylococcus* spp. varlığı tespiti amaçlanmıştır. Subklinik mastitis pozitif 73 hayvandan elde edilen 292 süt örneğinin analizleri ile 14 rnek (%17,5) *S. aureus* açısından pozitif olarak belirlenirken sağlıklı hayvanlarda sadece 1 örnek (%1,6) pozitif olarak tespit edilmiştir. Sağlıklı ve subklinik mastitis pozitif hayvanlarda *S. epidermidis* varlığı sırasıyla %17,5 ve %13,8 olarak bildirilmiştir (Rall ve ark., 2014).

S. aureus kaynaklı subklinik mastitisin yaygınlığı ve meydana getirdiği kayıplara ilşkin yapılan bir çalışma ile 217 örneğin %16,7’si *S. aureus* pozitif olarak değerlendirilmiştir. *S. aureus* kaynaklı subklinik mastitis varlığında; süt ineği başına toplam verim kaybı %6,8 olarak tahmin edilmiştir. Kayıpların büyük ölçekli işletmelerde daha fazla olduğu belirlenmiştir. Laktasyon başına her bir süt ineği için küçük ölçekli işletmelerde mali kayıp 78,65 \$, büyük ölçekli işletmelerde ise 150,35 \$ olarak bildirilerek mastitis kontrol programlarının önemine vurgu yapılmıştır (Tesfaye ve ark., 2010).

Yuvakkumar ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada; yenilikçi yeşil sentez yöntemi ile rambutan (*Nephelium lappaceum L.*) kabuk ekstraktı kullanarak ZnO eldesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ZnO'nun *E. coli* ve *S. aureus* üzerine antibakteriyel bir etki meydana getirdiği tespit edilmiştir. *Solanum nigrum* (köpek üzümü) yaprağı ekstraktı kullanarak yeşil yöntem ile sentezi gerçekleştirilen ZnO NP'nin antimikrobiyel aktivitesi, UV spektrumu ve FE-SEM yöntemi ile karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Uv-Vis DRS analizi ile sentezlenen maddenin ışık spektumu 402, 447, 469 and 483 nm, 529 nm aralıklarında etkili olduğu bildirilmiştir.

Raghupathi ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada ZnO NP'nin antibakteriyel etkisinin hem reaktif oksijen türlerinin üretimi hem de nanopartüküllerin sitoplazmada ve hücre dışı zarında birikmesinden kaynaklanabileceğini bildirmiştir. Joe ve ark. (2017) yılında yaptıkları çalışmada ise ZnO NP'nin etkisinin çinko metallerinin sitoplazmaya girmesinden kaynaklanmadığını; etkisinin Zn^{+2} hücreye bağlanmasından kaynaklandığı tespit etmiştir. Genel olarak antibakteriyel etkinliğin çinko iyonunun hücre zarına tutunması ve hücre zarının bozulması, DNA bozulmasına neden olan reaktif oksijen türlerinin oluşması, protein oksidasyonu, lipid peroksidasyonundan kaynaklandığını düşünülmektedir (Agarwal ve ark., 2018). ZnO NP'nin *S. aureus* üzerine antimikrobiyel aktivitesinin belirlenmesinde disk difüzyon testi sonuçlarında 18 mm çapında bir zon tespit edilerek antibakteriyel etki varlığı belirlenmiştir (Ramesh ve ark., 2015). Janaki ve ark. (2015), zencefil kökü özütü kullanarak gerçekleştirdikleri ZnO NP'nin *S. aureus* üzerine etkisini 1000 µg konsantrasyonda 10 mm, 500 µg konsantrasyonda 9 mm, 250 µg konsantrasyonda 9mm, 125 µg konsantrasyonda 9 mm, 62,5 µg konsantrasyonda 9 mm olarak bildirmiştir. Çalışma sonucunda sentezlenen ZnO NP'nin *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* ve *Penicillium notatum* üzerine antimikrobiyel etkili olduğu bildirilmiştir. Coptidis rhizoma kullanarak çevre dostu yöntemle sentezlenen ZnO NP'nin Gram pozitif (*Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus* ve *Bacillus cereus*) ve Gram negatif (*E. coli*) bakteriler üzerine antibakteriyel bir etki meydana getirdiği gözlemlenmiştir. En yüksek antibakteriyel etki *E. coli* (11 mm) ve en düşük antibakteriyel etkinin ise *B. megaterium* (10 mm), *B. pumilus* (9 mm) ve *B. cereus* (9 mm) şeklinde olduğu tespit

edilmiştir. Ayrıca çalışma ile sentezlenen maddenin antioksidan aktiviteye sahip olduğu, RAW 264.7 hücre hattında herhangi bir toksik etki meydana getirmediği gözlemlenmemiştir (Nagajyothi ve ark., 2014). Dehkordi ve ark. (2011) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada gümüş nanopartikülün *S. aureus* üzerine MİK değeri 1,25-10 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Ansari ve ark. (2020) tarafından tarçın çiçeği kullanarak sentezlenen ZnO np'nin *E. coli* ve *S. aureus* üzerine sırasıyla 125 µg/ml ile 62,5 µg/ml düzeyinde etkili olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen veriler ile yapılan karşılaştırmada 21b izolatu ile benzer sonuçlar olduğu gözlemlenmiştir. *Azadirachta indica* (L.) bitkisi kullanarak sentezlenen ZnO NP'nin *S. aureus* üzerine 200 µg/ml / 100 µg/ml ve 50 µg/ml dozunda ölçülen zon çapı sırasıyla 23/19 ve 14,4 olarak belirlenmiştir. MİK değerleri ise 6,25 ve 50 µg/ml arasında belirlenmiştir (Elumalai ve ark., 2015). Spirulina (*Arthrospira platensis*) kullanarak elde edilen ZnO NP'nin *S. aureus* üzerindeki MİK değeri 50 ppm olarak tespit edilmiştir (El-Belely ve ark., 2021). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar arasındaki farklılığın kullanılan izolat ve farklı bitki ekstraktı kaynaklı olduğu söylenebilir.

6. SONUÇ

Subklinik mastitis açısından yapılan tarama sonucunda yüksek oranda pozitif bir değer elde edilmiştir. Bu durum subklinik mastitisin hala süt endüstrisinin önemli bir problemi olduğunu göstermektedir. Subklinik mastitisli sütlerden yapılan analizler sonucunda *S. aureus*'un subklinik mastitisin meydana gelmesinde etkili bir patojen olduğunu göstermektedir. İzolatların antibiyotik direnç değerlendirilmesi ile çeşitli antibiyotiklere karşı yüksek oranda direnç belirlenmiştir. Sentezi gerçekleştirilen yayla kekiği kaynaklı ZnO NP'nin antimikrobiyel etkisi ile tüm izolatlar üzerinde farklı MİK değerleri ile inaktivasyon tespit edilerek antibiyotik alternatif maddelere yönelik önemli bir ürün sentezi sağlanmıştır.

Çalışma kapsamında sağım sistemleri ile subklinik mastitis ilişkisi incelendiğinde; otomatik sağım sistemi kullanan işletmelerde mastitis yoğunluğunun daha düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir. Bu durumun meydana gelmesinde sağım sürecindeki temizlik ve dezenfeksiyon uygulamalarındaki farklılıklardan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Bu kapsamda işletmelerin temizlik ve dezenfeksiyon önlemlerine tavizsiz bir şekilde uygulamaları gereklidir. Çalışma kapsamında elde edilen gözlemler sonucunda mastitis aşılarının kullanımı ile istenen oranda bir koruyuculuk sağlanamadığı belirlenmiştir. Uygulanan aşı ile hastalık meydana getiren etkenler arasında negatif bir ilişki olduğu söylenebilir. Bu nedenle etkene yönelik aşılama uygulamaları tercih edilmelidir. Elde edilen izolatlardaki antibiyotik direnç seviyesi yüksek düzeyde olması sebebiyle antibiyotik alternatif maddelere yönelik daha fazla çalışma planlanmalıdır.

KAYNAKLAR

- Agarwal H, Menon S, Kumar SV, Rajeshkumar S (2018).** Mechanistic study on antibacterial action of zinc oxide nanoparticles synthesized using green route. *Chem. Biol. Interact.*, **286**, 60-70.
- Akineden Ö, Hassan AA, Schneider E, Usleber E (2008).** Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, **124(2)**, (211-216).
- Alluwaimi AM (2004).** The cytokines of bovine mammary gland: prospects for diagnosis and therapy. *Res. Vet. Sci.*, **77(3)**, 211–222
- Ansari MA, Murali M, Prasad D, Alzohairy MA, Almatroudi A, Alomary MN, Niranjana SR (2020).** Cinnamomum verum bark extract mediated green synthesis of ZnO nanoparticles and their antibacterial potentiality. *Biomolecules*, **10(2)**, 336.
- Argudín MÁ, Mendoza MC, Rodicio MR (2010).** Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, **2(7)**, 1751-1773.
- Arslan E (2017).** Plazmid Aracılı Kinolon Direnci (*QnrsI* Ve *Aac (6')-Ib-Cr*) ve *Enrofloksasin İle Eliminasyonu*. Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa, Türkiye.
- Askun T, Tumen G, Satil F, Ates M (2009).** In vitro activity of methanol extracts of plants used as spices against *Mycobacterium tuberculosis* and other bacteria. *Food Chem.*, **116(1)**, 289-294.
- Babra C, Tiwari JG, Pier G, Thein TH, Sunagar R, Sundareshan S, Mukkur T, (2013).** The persistence of biofilm-associated antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical bovine mastitis cases in Australia. *Folia Microbiol.*, **58(6)**, 469-474.
- Bachaya HA, Raza MA, Murtaza S, Akbar IUR (2011).** Subclinical bovine mastitis in Muzaffar Garh district of Punjab (Pakistan). *J. Anim. Plant Sci.*, **21(1)**, 16-19.
- Bala N, Saha S, Chakraborty M, Maiti M, Das S, Basu R, Nandy P (2015).** Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Hibiscus subdariffa* leaf extract: effect of temperature on synthesis, anti-bacterial activity and anti-diabetic activity. *RSC Advances*, **5(7)**, 4993-5003.
- Balaban N, Rasooly A (2000).** *Staphylococcal* enterotoxins., *Int. J. Food Microbiol*, **61**, 1–10.
- Bannerman DD, Wall RJ (2005).** A novel strategy for the prevention of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in dairy cows., *Information Systems for Biotechnology (isb) news report*, 1–4.
- Barkema HW, Green M J, Bradley AJ, Zadoks RN (2009).** Invited review: The role of contagious disease in udder health. *Int. J. Dairy Sci.*, **92(10)**, 4717-4729.

Bartoloni A, Pallecchi L, Rodríguez H, Fernandez C, Mantella A, Bartalesi F, Rossolini GM (2009). Antibiotic resistance in a very remote Amazonas community. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, **33(2)**, 125-129.

Baser KHC (2008). Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Curr. Pharm. Des.*, **14(29)**, 3106-3119.

Baser KHC, Özek T, Tümen G, Sezik E (1993). Composition of the essential oils of Turkish Origanum species with commercial importance. *J. Essent. Oil Res*, **5(6)**, 619-623.

Baydar H (2005). Yayla kekiği (*Origanum minutiflorum* O. Schwarz et. PH Davis)'nde farklı toplama zamanlarının uçucu yağ içeriği ve uçucu yağ bileşenleri üzerine etkisi., *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, **18(2)**, 175-178.

Baydar H, Sağdıç O, Özkan G, Karadoğan T, (2004). Antibacterial activity and composition of essential oils from Origanum, Thymbra and Satureja species with commercial importance in Turkey. *Food control*, **15(3)**, 169-172.

Bayram Y, Torlak Y, Sağdıç O (2019). Üvez meyvesinin antioksidan aktivitesi. *EJOSAT*, **(16)**, 933-939.

Bergdoll MS, Lee Wong AC (2006). Staphylococcal intoxications. 523-562. *Foodborne Infections and Intoxications, Academic Press, Elsevier Inc., San Diego, California.*

Berni E, Marcato PD, Nakazato G, Kobayashi RKT, Vacchi FI, Umbuzeiro GA, Durán N (2013). Violacein/poly(ϵ -caprolactone)/chitosan nanoparticles against bovine mastitis: Antibacterial and ecotoxicity evaluation. *J. Phys.*, **429**, 012030.

Beyth N, Haddad Y, Domb A, Khan W, Hazan R (2015). Alternative antibacterial approach: Nano-antibacterial materials. *Evid.-based Complement. Altern. Med.*, vol. 2015.

Bierowiec K, Ploneczka-Janeczko K, Rypula K (2016). Is the colonisation of *Staphylococcus aureus* in pets associated with their close contact with owners?, *PLoS One.*, **11(5)**, e0156052.

Boynukara B, Gulhan T, Alisarli M, Gurturk K, Solmaz H, (2008). “Classical enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van”, Turkey. *Int. J. Food Microbiol.*, **125(2)**, 209-211.

Buyukcangaz E, Kahya S, Sen A, Seyrekintas K, Eyigor A, Temelli S, Carli K T (2013). MecA gene prevalence in *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows in Turkey”, *J Biodivers Environ Sci.*, **7(21)**, 183-190.

Chen L, Batjikh I, Hurh J, Han Y, Huo Y, Ali H, Yang DC (2019). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles from root extract of *Scutellaria baicalensis* and its photocatalytic degradation activity using methylene blue. *Optik*, **184**, 324-329.

Coffey S, Meaney AWJ, Fitzgerald GF, Ross RP (2005). Inhibition of bacteriophage K proliferation on *Staphylococcus aureus* in raw bovine milk., *Lett Appl. Microbiol.*, **41**, 274–279.

Dehkordi SH, Hosseinpour F, Kahrizangi AE (2011). An in vitro evaluation of antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Afr. J. biotechnol.*, **10(52)**, 10795-10797.

Djurišić AB, Leung YH, Ng AM, Xu XY, Lee PK, Degger N, Wu RSS (2015). Toxicity of metal oxide nanoparticles: mechanisms, characterization, and avoiding experimental artefacts. *Small*, **11(1)**, 26-44.

Duarte CM, Freitas PP, Bexiga R, (2015). Technological advances in bovine mastitis diagnosis: an overview. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **27(6)**, 665-672.

El-Belely EF, Farag M, Said HA, Amin AS, Azab E, Gobouri AA, Fouda A, (2021). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) using *Arthrospira platensis* (Class: Cyanophyceae) and evaluation of their biomedical activities. *J. Nanomater.*, **11(1)**, 95.

Elmastas M, Celik SM, Genc N, Aksit H, Erenler R, Gulcin İ (2018). Antioxidant activity of an Anatolian herbal tea, *Origanum minutiflorum*: isolation and characterization of its secondary metabolites. *Int. J. Food Prop.*, **21(1)**, 374-384.

Elumalai K, Velmurugan S (2015). Green synthesis, characterization and antimicrobial activities of zinc oxide nanoparticles from the leaf extract of *Azadirachta indica* (L.). *Appl. Surf. Sci.*, **345**, 329-336.

Erbay AY, İdil ATD (2009). *Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde hastaneden edinilmiş Acinetobacter baumannii bakteriyemilerinde fatalite hızı ve ilgili risk etmenleri* (Doctoral dissertation, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Halk Sağlığı Anabilim Dalı).

Erol İ (2007). *Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi*. Ankara: pozitif matbacılık s:135-137

Espitia PJP, Soares NDFF, dos Reis Coimbra JS, de Andrade NJ, Cruz RS, Medeiros EAA (2012). Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications. *Food Bioproc. Tech.*, **5(5)**, 1447-1464.

Ewida RM, Al-Hosary AA, (2020). Prevalence of enterotoxins and other virulence genes of *Staphylococcus aureus* caused subclinical mastitis in dairy cows. *Vet. World*, **13(6)**, 1193.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 12: *Staphylococcus aureus*. Silver Spring, MD: U.S. FDA; 2016. Available at https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-12_staphylococcus-aureus [accessed 29.01.21].

Goh SH, Byrne SK, Zhang JL, Chow AW, (1992). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.*, **30(7)**, 1642-1645.

Gomes F, Henriques M (2016). Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. *Curr. Microbiol.*, **72(4)**, 377-382.

Gonzalez ME, Barrett DM (2010). Thermal, high pressure, and electric field processing effects on plant cell membrane integrity and relevance to fruit and vegetable quality. *J. Food Sci.*, **75(7)**, 121-130.

- Grace D, Fetsch A (2018).** *Staphylococcus aureus*—A foodborne pathogen: Epidemiology, detection, characterization, prevention, and control: An overview., In *Staphylococcus aureus* (pp. 3-10). Academic Press.
- Gross M, Cramton SE, Götz F, Peschel A (2001).** Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect. Immun.* **69**(5), 3423-3426.
- Gruet P, Maincent P, Berthelot X, Kaltsatos V (2001).** Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **50**(3), 245-259.
- Guimaraes FF, Manzi MP, Joaquim SF, Richini-Pereira VB, Langoni H (2017).** Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-associated mastitis in a closed dairy herd. *Int. J. Dairy Sci.*, **100**(1), 726-730.
- Halasa T, Huijps K, Østerås O, Hogeveen H (2007).** Economic effects of bovine mastitis and mastitis management. A review. *Vet. Q.*, **29**(1), 18-31.
- Haran KP, Godden SM, Boxrud D, Jawahir S, Bender JB, Sreevatsan S (2012).** Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, isolated from bulk tank milk from Minnesota dairy farms. *J. Clin. Microbiol.*, **50**(3), 688-695.
- Heringstad B, Klemetsdal G, Steine T (2003).** Selection responses for clinical mastitis and protein yield in two Norwegian dairy cattle selection experiments. *Int. J. Dairy Sci.*, **86**(9), 2990-2999.
- Hogeveen H, Huijps K, Lam TJGM (2011).** Economic aspects of mastitis: new developments. *N. Z. Vet. J.*, **59**(1), 16-23.
- Hu DL, Wang L, Fang R, Okamura M, Ono HK (2018).** “*Staphylococcus aureus* enterotoxins., In *Staphylococcus aureus* (pp. 39-55). Academic Press.
- Hudzicki J (2009).** Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. <http://www.asmscience.org/docserver/fulltext/education/protocol/protocol.3189.pdf?expires=1548926604&id=id&accname=guest&checksum=1B7D54B8A0A0C58CFC7205DD63C3736D>, (31.01.2019)
- Ikiz S, Başaran B, Bingöl EB, Cetin Ö, Kaşıkçı G, Özgür NY, Sabuncu A (2013).** Presence and antibiotic susceptibility patterns of contagious mastitis agents (*Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*) isolated from milks of dairy cows with subclinical mastitis., *Turkish J. Vet. Anim. Sci.*, **37**(5), 569-574.
- International Dairy Federetaion-IDF** Facts and figures, International Organization for Standardization-ISO 2003: 6888-1: Microbiology of food and animal feedingstuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). (15.07.2021)
- Jamali H, Barkema HW, Jacques M, Lavallée-Bourget EM, Malouin F, Saini V, Dufour S (2018).** Invited review: Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows., *Int. J. Dairy Sci.*, **101**(6), 4729-4746.

- Jamali H, Radmehr B, Ismail S (2014).** Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis., *Int. J. Dairy Sci.*, **97(4)**, 2226-2230.
- Janaki AC, Sailatha E, Gunasekaran S (2015).** Synthesis, characteristics and antimicrobial activity of ZnO nanoparticles. *Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, **144**, 17-22.
- Jeffries CD, Holtman DF, Guse DG (1957).** Rapid method for determining the activity of microorgan-isms on nucleic acids. *J. Bacteriol. Res.*, **73(4)**, 590.
- Joe A, Park SH, Shim KD, Kim DJ, Jhee KH, Lee HW, Jang ES (2017).** Antibacterial mechanism of ZnO nanoparticles under dark conditions. *J. Ind. Eng. Chem.*, **45**, 430-439.
- Jones N, Ray B, Ranjit KT, Manna AC (2008).** Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.*, **279(1)**, 71-76.
- Kaartinen L (1995).** Physiology of the bovine udder., *The Bovine Udder and Mastitis. Gummerus Kirjapaino Oy Jyväskylä: University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine.*
- Karahan M, Acik MN, Cetinkaya B (2011).** Investigation of virulence genes by PCR in *Staphylococcus aureus* isolates originated from subclinical bovine mastitis in Turkey. *Pak. Vet. J.*, **31(3)**, 249-253.
- Karahan M, Çetinkaya B (2007).** Coagulase gene polymorphisms detected by PCR in *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey. *Vet. J.*, **174(2)**, 428-431.
- Kayış U (2019).** Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları. *Aydın Sağlık Dergisi*, **5(1)**, 1-12.
- Keefe G (2012).** Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis., *Vet. Clin. N. Am.-Food Anim.*, **28(2)**, 203-216.
- Kenar B, Bagcigil AF, Kuyucuoglu Y, Karaman BB, Konak S (2017).** Antimicrobial susceptibility profiles and coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis., *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, **23(4)**.
- Keyik Ş (2013).** *Acinetobacter baumannii* Suşlarında OXA-23 ve OXA-58 TipiGenişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Varlığının Araştırılması ve PFGE Yöntemiyle Klonal Yakınlığının İncelenmesi. Konya Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya, Türkiye
- Keyvan E, Özdemir H (2016).** Occurrence, enterotoxigenic properties and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* on beef carcasses. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.*, **63**, 17-23.
- Keyvan E, Tutun H (2019).** Effects of Carvacrol on *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank milk. *Med. Weter.*, **75(04)**, 238-241.

- Kinross P, Petersen A, Skov R, Van Hauwermeiren E, Pantosti A, Laurent F, Monnet DL (2017).** Livestock-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among human MRSA isolates, European Union/European Economic Area countries, 2013. *Eurosurveillance*, **22(44)**, 16-00696.
- Kirkan Ş, Göksoy EÖ, Kaya O (2005).** Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci from bovine mastitis in the Aydın region of Turkey. *Turk J. Vet. Anim. Sci.*, **29(3)**, 791-796.
- Köck R, Schaumburg F, Mellmann A, Köksal M, Jurke A, Becker K, Friedrich AW (2013).** Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as causes of human infection and colonization in Germany. *PLoS One*, **8(2)**, e55040.
- Korhonen H, Kaartinen L (1995).** Changes in the composition of milk induced by mastitis, in: Sandholm M, Honkanen-Buzalski T, Kaartinen L, Pyörälä S. (Eds.), The bovine udder and mastitis, Gummerus, Jyväskylä, Finland, pp. 76–82.
- Kwiatek M, Parasion S, Mizak L, Gryko R, Bartoszcze M, Kocik J (2012).** Characterization of a bacteriophage, isolated from a cow with mastitis, that is lytic against *Staphylococcus aureus* strains. *Arch. Virol.*, **157**, 225–234
- Le Loir Y, Baron F, Gautier M (2003).** *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.*, **2(1)**, 63-76.
- Licitra G (2013).** Etymologia: *Staphylococcus*. *Emerg. Infect. Dis.*, **19(9)**, 1553.
- Lingaraju K, Naika HR, Manjunath K, Basavaraj RB, Nagabhushana H, Nagaraju G, Suresh D (2016).** Biogenic synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Ruta graveolens* (L.) and their antibacterial and antioxidant activities. *Appl. Nanosci.* **6(5)**, 703-710.
- Liu Y, He L, Mustapha A, Li H, Hu Q Lin M (2009).** Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli* O157: H7. *J. Appl. Microbiol.*, **107(4)**, 1193-1201.
- Livermore DM, Warner M, Hall LM, Enne VI, Projan SJ, Dunman PM, Harrison G (2001).** Antibiotic resistance in bacteria from magpies (*Pica pica*) and rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from west Wales. *Environ. Microbiol.*, **3(10)**, 658-661.
- Longo F, Salat O, Van Gool F (2001).** Incidence of clinical mastitis in French dairy herds, epidemiological data and economic costs. *Folia Vet.*, **45(1)**,
- Losasso C, Belluco S, Cibir V, Zavagnin P, Mičetić I, Gallochio F, Zanella M, Bregoli L, Biancotto G, Ricci A (2014).** Antibacterial activity of silver nanoparticles: Sensitivity of different *Salmonella* serovars. *Front Microbiol.*, **5**, 227.
- Mehrotra M, Wang G, Johnson WM (2000).** Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 1032-1035.
- Meşe EA, Altun D, Yıldız SS, Hekimoğlu CH (2020).** Ulusal sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonlar sürveyans ağı (USHİESA) etken dağılımı ve antibiyotik direnç raporu 2019. Ankara, 2020 <https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Bulasici-hastaliklar->

[db/hastaliklar/SHIE/Raporlar/ETKEN DAGILIM VE DIRENC 2019.pdf](#) (Erişim Tarihi: 15.09.2021)

Moon JS, Lee AR, Kang HM, Lee ES, Kim MN, Paik YH, Koo HC (2007). Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant *staphylococci* isolated from bovine mastitis in Korea. *Int. J. Dairy Sci.*, **90(3)**, 1176-1185.

Moroni P, Pisoni G, Antonini M, Villa R, Boettcher P, Carli S (2006). Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Italy. *Int. J. Dairy Sci.*, **89(8)**, 2973-2976.

Mungube EO, Tenhagen BA, Regassa F, Kyule MN, Shiferaw Y, Kassa T, Baumann MPO (2005). Reduced milk production in udder quarters with subclinical mastitis and associated economic losses in crossbred dairy cows in Ethiopia. *Trop. Anim. Health Prod.*, **37(6)**, 503-512.

Murray RJ (2005). Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. *Intern. Med. J.*, **2**, S106–S119.

Nagajyothi PC, Sreekanth TVM, Tettey CO, Jun YI, Mook SH (2014). Characterization, antibacterial, antioxidant, and cytotoxic activities of ZnO nanoparticles using *Coptidis Rhizoma*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **24(17)**, 4298-4303.

National Mastitis Council-NMC. (1999). Laboratory Handbook on Bovine Mastitis., National Mastitis Council, Madison, WI.

Nethravathi PC, Kumar MP, Suresh D, Lingaraju K, Rajanaika H, Nagabhushana H, Sharma SC (2015). *Tinospora cordifolia* mediated facile green synthesis of cupric oxide nanoparticles and their photocatalytic, antioxidant and antibacterial properties. *Mater. Sci. Semicond. Process.*, **33**, 81-88.

Nickerson SC (1995). Milk production: Factors affecting milk composition. *In Milk quality* p: 3-24. Springer, Boston, MA.

Normanno G, Corrente M, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Parisi A, Greco G, Bellacicco AL, Virgilio S, Celano GV (2007). Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *Int. J. Food Microbiol.*, **115**, 290-296.

Olde Riekerink RGM, Barkema HW, Veenstra S, Poole DE, Dingwell RT, Keefe GP (2006). Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island., *Can. Vet. J.*, **47**, 567–572.

Olivares-Pérez J, Kholif AE, Rojas-Hernández S, Elghandour MMY, Salem AZM, Bastida AZ, DiLorenzo N (2015). Prevalence of bovine subclinical mastitis, its etiology and diagnosis of antibiotic resistance of dairy farms in four municipalities of a tropical region of Mexico. *Trop. Anim. Health Prod.*, **47(8)**, 1497-1504.

Oliveira L, Langoni H, Hulland C, Ruegg PL (2012). Minimum inhibitory concentrations of *Staphylococcus aureus* recovered from clinical and subclinical cases of bovine mastitis. *Int. J. Dairy Sci.*, **95(4)**, 1913-1920.

Özkum D, Kürkçüoğlu M, Başer KH, Tipirdamaz R (2010). Essential oils from wild and micropropagated plants of *Origanum minutiflorum* O. Schwarz et Davis. *J. Essent. Oil Res.*, **22(2)**, 135-137.

Paape MJ, Wergin WP, Guidry AJ, Schultze WD (1981). Phagocytic defense of the ruminant mammary gland. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **137**, 555.

Parisi A, Caruso M, Normanno G, Latorre L, Sottili R, Miccolupo A, Santagada G (2016). Prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bulk tank milk from southern Italy. *Food Microbiol.*, **58**, 36-42.

Peles F, Wagner M, Varga L, Hein I, Rieck P, Gutser K, Szabó A (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. *Int. J. Food Microbiol.*, **118(2)**, 186-193.

Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE (2010). *Staphylococcal* enterotoxins., *Toxins*, **2(8)**, 2177-2197.

Pitkälä A, Haveri M, Pyörälä S, Myllys V, Honkanen-Buzalski T (2004). Bovine mastitis in Finland 2001—prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *Int. J. Dairy Sci.*, **87(8)**, 2433-2441.

Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EE, Schreckenberger P, Woods GL., (2017). Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; p 670-732.

Pumipuntu N, Tunyong W, Chantratita N, Diraphat P, Pumirat P, Sookrung N, Indrawattana N (2019). *Staphylococcus spp.* associated with subclinical bovine mastitis in central and northeast provinces of Thailand. *PeerJ*, **7**, e6587.

Rabello RF, Souza CRVM, Duarte RS, Lopes RMM, Teixeira LM, Castro ACD (2005). Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. *Int. J. Dairy Sci.*, **88(9)**, 3211-3219.

Raghupathi KR, Koodali RT, Manna AC (2011). Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. *Langmuir*, **27(7)**, 4020-4028.

Rall VLM, Miranda ES, Castilho IG, Camargo CH, Langoni H, Guimarães FF, Júnior AF (2014). Diversity of *Staphylococcus* species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. *Int. J. Dairy Sci.*, **97(2)**, 829-837.

Ramesh M, Anbuvarannan M, Viruthagiri G (2015). Green synthesis of ZnO nanoparticles using *Solanum nigrum* leaf extract and their antibacterial activity. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. SPECTROCHIM ACTA A.*, **136**, 864-870.

Ramya P, Rajeshkumar S, Sujatha S, Venkateswara Rao L (2017). Prevalence of *Staphylococcus aureus* in raw milk samples. *Int. J. Chem. Stud.*, **5(5)**, 1351-1353.

- Ren Q, Liao G, Wu Z, Lv J, Chen W (2020).** Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from subclinical bovine mastitis in southern Xinjiang, China. *Int. J. Dairy Sci.*, **103(4)**, 3368-3380.
- Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Gay JM, Besser TE (1998).** Sources of intramammary infections from *Staphylococcus aureus* in dairy heifers at first parturition. *Int. J. Dairy Sci.*, **81(3)**, 687-693.
- Robert A, Seegers H, Bareille N (2006).** Incidence of intramammary infections during the dry period without or with antibiotic treatment in dairy cows—a quantitative analysis of published data. *Vet. Res.*, **37(1)**, 25-48.
- Rosenbach AJ (1884).** Mikro-Organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. J.F. Bergmann, Wiesbaden, p. 18.
- Rougeur CW, Hanekamp WJA, Dijkhuizen AA, Nielen M, Wilmink JBM (1999).** Relationships between dairy cow mastitis and fertility management and farm performance. *Prev. Vet. Med.*, **39(4)**, 247-264.
- Ruegg PL (2017).** A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Int. J. Dairy Sci.*, **100(12)**, 10381-10397.
- Ruegg PL (2017).** A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Int. J. Dairy Sci.*, **100(12)**, 10381-10397.
- Safawo T, Sandeep BV, Pola S, Tadesse A (2018).** Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using tuber extract of anchote (*Coccinia abyssinica* (Lam.) Cong.) for antimicrobial and antioxidant activity assessment. *OpenNano*, **3**, 56-63.
- Sağlam AG, Şahin M, Çelik E, Çelebi Ö, Akça D, Otlı S (2017).** The role of staphylococci in subclinical mastitis of cows and lytic phage isolation against to *Staphylococcus aureus*. *Vet. World*, **10(12)**, 1481.
- Sahebekhtiari N, Nochi Z, Eslampour M, Dabiri H, Bolfion M, Taherikalani M, Emaneini M (2011).** Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk of bovine subclinical mastitis in Tehran and Mashhad. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, **58(2)**, 113-121.
- Sahoo A, Swain K, Mishra K (2014).** Effect of inorganic, organic and nano zinc supplemented diets on bioavailability and immunity status of broilers. *Int. J. Curr. Adv. Res.*, **2(11)**, 828-837.
- Santos RI, Zunino PM, Gil AD, Laport A, Hirigoyen DJ (2017).** Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical and clinical mastitis in Uruguay during an eight-year period. *Austral J. Vet. Sci.*, **49(3)**, 191-194.
- Sarıözkan S (2019).** Türkiye’de Süt Sığırcılığı İşletmelerinde Mastitis Nedeniyle Oluşan Finansal Kayıpların Tahmin Edilmesi. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **8(2)**, 147-151.
- Sawant AA, Sordillo LM, Jayarao BM (2005).** A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. *Int. J. Dairy Sci.*, **88(8)**, 2991-2999.

- Schalm AW, Noorlander DO (1957).** Experiments and observations leading to developments and the California Mastitis Test. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **130(5)**, 199-207.
- Sears, PM, McCarthy KK (2003).** Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim.*, **19(1)**, 171-85.
- Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F, (2003).** Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.*, **34**, 475-491.
- Song X, Huang X, Xu H, Zhang C, Chen S, Liu F, Wu C (2020).** The prevalence of pathogens causing bovine mastitis and their associated risk factors in 15 large dairy farms in China: An observational study. *Vet. Microbiol.*, **247**, 108757.
- Srednik ME, Usongo V, Lépine S, Janvier X, Archambault M, Gentilini ER, (2018).** Characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from mastitis bovine milk in Argentina. *Res. J. Dairy Sci.*, **85(1)**, 57-63.
- Tesfaye GY, Regassa FG, Kelay B (2010).** Milk yield and associated economic losses in quarters with subclinical mastitis due to *Staphylococcus aureus* in Ethiopian crossbred dairy cows. *Trop. Anim. Health Prod.*, **42(5)**, 925-931.
- Thill A, Zeyons O, Spalla O, Chauvat F, Rose J, Auffan M, Flank AM (2006).** Cytotoxicity of CeO₂ nanoparticles for *Escherichia coli*. Physico-chemical insight of the cytotoxicity mechanism. *Environ. Sci. Technol.*, **40(19)**, 6151-6156.
- Tiwari JG, Babra C, Tiwari H, Williams V, De Wet S, Gibson J, Mukkur T, (2013).** Trends in therapeutic and prevention strategies for management of bovine mastitis: an overview. *Journal of Vaccines & Vaccination*, **4(1)**, 1-11.
- Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG (2015).** *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *J. Clin. Mikrobiol.*, **28(3)**, 603-661.
- Tranter HS (1990).** Foodborne staphylococcal illness. *Lancet (British edition)*, 336(8722), 1044-1046.
- Türkiye İstatistik Kurumu-TÜİK (2016).** Türkiye Sağlık Araştırması. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Turkiye-Saglik-Arastirmasi-2016-24573>
Erişim: 10.07.2019
- Türkiye İstatistik Kurumu-TÜİK (2020).** “Hayvansal Üretim İstatistikleri. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Hayvansal-Uretim-Istatistikleri-Aralik-2020-37207> Erişim:11.09.2021.
- Ulusal Mikrobiyoloji Standartları (UMS).** Koagulaz testi, Ankara, 2015.
- United Kingdom Standards for Microbiology Investigations. Deoxyribonuclease test-UK standards for microbiology investigation,** London, 2014.
- Vestergaard M, Frees D, Ingmer H (2019).** Antibiotic resistance and the MRSA problem. *Gram-Positive Pathogens*, 747-765.

Wang D, Wang Z, Yan Z, Wu J, Ali T, Li J, Han B (2015). Bovine mastitis *Staphylococcus aureus*: antibiotic susceptibility profile, resistance genes and molecular typing of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains in China. *Infection, Genetics and Evolution*, **31**, 9-16.

Wang XF, Zhang SL, Zhu LY, Xie SY, Dong Z, Wang Y, Zhou WZ (2012). Enhancement of antibacterial activity of tilmicosin against *Staphylococcus aureus* by solid lipid nanoparticles in vitro and in vivo. *Vet J.*, **191(1)**, 115-120.

Wayne PA (2013). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 23rd informational supplement. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100-S23*.

Wolfová M, Štípková M, Wolf, J. (2006). Incidence and economics of clinical mastitis in five Holstein herds in the Czech Republic. *Prev. Vet. Med*, **77(1-2)**, 48-64.

Yuvakkumar R, Suresh J, Nathanael AJ, Sundrarajan M, Hong SI (2014). Novel green synthetic strategy to prepare ZnO nanocrystals using rambutan (*Nephelium lappaceum L.*) peel extract and its antibacterial applications. *Mater. Sci. Eng. C*, **41**, 17-27.

