CANAN KENAR

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LISANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2020

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

TİCARİ VE HALK ELİNDE BESLENEN TAVUKLARDA ENTERİK LAKTOBASİLLERİN DAĞILIMI VE MAKROLİDE-LİNCOSAMİDE-STREPTOGRAMİN (MLS) ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇ PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

CANAN KENAR

DANIŞMAN
PROF.DR.SERKAN İKİZ

VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI
MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2020

TEZ ONAYI

Bu çalışma 02.12.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Mikrobiyoloji Aabilim Dalı, Mikrobiyoloji Doktora Programı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Prof.Dr. Seyyal AK
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD

Prof.Dr. Ömer ÇETİN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi
Besin Hijyeni ve Teknolojisi ABD

Prof.Dr. Mustafa NİZAMLIOĞLU
İstanbul Gelişim Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Fakültesi
Beslenme ve Diyetetik Bölümü

Prof.Dr.Uçkun Sait UÇAN
Selçuk Üniversitesi
Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Canan KENAR

İTHAF

Bu tez çalışmamı, bu günlere gelmemde sonsuz emek ve özveri sahibi olan aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, yardımlarını hiçbir zaman eksik etmeyen, deneyimleri ve çabalarıyla çalışmama katkıda bulunan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Serkan İKİZ'e,

Doktora çalışmam süresince bilgi ve önerileriyle bana destek olan başta Anabilim Dalı Başkanımız Sn.Prof. Dr. Seyyal AK'a, Sn.Prof. Dr. N. Yakut ÖZGÜR'e, Sn.Prof. Dr. Funda BAĞCIGİL'e, Sn.Doç. Dr. Kemal METİNER'e, Sn.Doç. Dr. Beren BAŞARAN KAHRAMAN'a, Sn.Doç. Dr. Belgi DİREN SIĞIRCI'ya, Sn.Dr. Baran ÇELİK'e, Sn.Araş.Gör.Barış HALAÇ'a, Sn.Araş.Gör. A.Ilgın Kekeç'e ve teknisyenimiz Sn.Gülten KARAKUZ'a; istatistiksel analiz çalışmalarında yardımcı olan Zootekni Anabilim Dalı'ndan Sn.Prof. Dr. Bülent EKİZ'e, pozitif kontrol olarak kullanmış olduğum suşları temin ettiğim Sn.Prof.Dr. Bülent BOZDOĞAN'a ve her türlü desteği benden esirgemeyen çok değerli Dr.Öğr.Üyesi Arzu ÖZGEN'e içtenlikle teşekkür ederim.

En başından beri tez çalışmamın her aşamasında beni motive eden ve desteklerini daima hissettiren annem HATİCE AYŞIN KENAR, babam TURGUT KENAR ve nişanlım CEM NİZAMLIOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 29115

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİ
ÖZET ..... XİV
ABSTRACT XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Probiyotiklerin Tarihçesi 3
2.2. Probiyotik 4
2.2.1. Probiyotiklerin Sınıflandırılması 4
2.2.2. Probiyotiklerin Etki Mekanizmaları 5
2.3. Kanatlılarda Bağırsak Florası 8
2.3.1. Probiyotiklerin Kanatlılar Üzerinde Etkileri 12
2.3.2. Kanatlı Sektöründe Probiyotiklerin Seçiminde Kriterler 15
2.4. Laktik Asit Bakterileri 17
2.4.1. *Lactobacillu*s Türü 20
2.4.2. İzolasyon ve İdentifikasyonda Kullanılan Yöntemler 22
2.5. Laktobasillerin Güvenilirliği / Probiyotiklerle İlişkili Riskler 27
2.5.1. Antimikrobiyal Direnç Gelişimi 28
2.5.2. Laktobasillerde Antibiyotik Duyarlılık Testi Uygulamaları 32
2.5.3. Laktobasillerde Antibiyotiklere Direnç ve Makrolide-Lincosamide-Streptogramin Direnci 34

3. GEREÇ VE YÖNTEM 38
3.1. Gereç 38
3.2. Örnekler 38
3.2.1. Besiyerleri 45
3.2.1.1. MRS agar (de MAN, ROGOSA and SHARPE) 45
3.2.1.2. MRS broth (de MAN, ROGOSA and SHARPE) 45
3.2.1.3. Iso-Sensitest broth 45
3.2.1.4. Biyokimyasal Test ve Ayıraçlar 45
3.2.2. Antibiyotikler 46
3.2.3. Standart Suşlar 46
3.2.4. Diğer gereçler 46
3.2.5. Polimerase Chain Reaction (PCR) 46
3.2.5.1. Ekstraksiyon 46
3.2.5.2. Amplifikasyon 46
3.2.5.3. DNA Elektroforezi 47
3.2.5.4. Diğer Gereçler 47
3.3. Yöntem 48
3.3.1. İzolasyon 48
3.3.2. İdentifikasyon 49
3.3.3. İzolatların Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemiyle Eritromisin, Klindamisin, Linkomisin, Tylosin ve Virjinamisin MİK Değerlerinin Belirlenmesi 49
3.3.4. İzolatların Makrolide-Lincosamide-Streptogramin Antibiyotiklere Dirençten Sorumlu Erm Genlerinin Genotipik Yöntemle Belirlenmesi 51
3.3.4.1. DNA Ekstraksiyonu 51
3.3.4.2. DNA Amplifikasyonu 52
3.3.4.3. Agaroz Jel Elektroforezi 55
3.3.5. İstatiksel Analiz 55
4. BULGULAR 56
4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları 56
4.2. MLS Antibiyotik Direnci Fenotip Bulguları 60
4.3. MLS Antibiyotik Direnci Genotip Bulguları 70
4.4. İstatistiksel Analiz Sonuçları 72

5. TARTIŞMA 74
KAYNAKLAR 87
HAM VERİLER 111
FORMLAR 114
ETİK KURUL KARARI 115
PATENT HAKKI İZNİ 116
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 117
ÖZGEÇMİŞ 118

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Tavukların farklı gastrointestinal sistem bölümlerinde en sıklıkla bulunan yerleşik bakterilerin özeti 10
Tablo 2-2: Tavukların bağırsaklarında bulunan *Lactobacillus* türleri 11
Tablo 2-3: Salvetti ve ark. (2012) göre, Laktobasillerin filogenetik grupları ve her gruba Laktobasillus türleri örneği.....22
Tablo 2-4: Laktobasillus ve ilişkili cinslerde (LLPW grup-*Lactobacillus, Leuconostoc* ve *Pediococcus, Weissella*) kullanılan seçici besiyerleri 23
Tablo 3-1: Farklı yetiştirme şekillerinden örneklerin toplandığı çiftliklerin lokasyonu ve tavuğa ait bilgiler.....38
Tablo 3-2: Çalışmada kullanılan primerler, hedef bölgeleri ve bant uzunlukları.....53
Tablo 4-1: Tüm izolatlara ait saptanan puan değerleri (log score) 60
Tablo 4-2: Yetiştiricilik şekline göre fenotipik dirençli izolat sayısı.....62
Tablo 4-3: Halk elinde beslenen tavuklara ait MİK bulgular 63
Tablo 4-4: Broyler tavuklara ait MİK bulguları.....65
Tablo 4-5: Yumurtacı tavuklara ait MİK bulguları.....67
Tablo 4-6: İzolatların genotipik direnç oranları.....70

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Kanatlı sektöründe probiyotiklerin seçim diyagramı 16
Şekil 2-2: Lactobacillales Filogenetik Ağacı 18
Şekil 2-3: Bakterilerde antibiyotiklere karşı görülen direnç mekanizmaları 30
Şekil 4-1: Lactobacillus spp. sırasıyla mikroskopta (100X) ve MRS agar kültüründe görünümü 56
Şekil 4-2: Maldi Tof cihazıyla gerçekleştirilen identifikasyona ait örnek 57
Şekil 4-3: Halk elinde beslenen tavuklara ait izolatların türlere göre dağılımı 58
Şekil 4-4: Yumurtacı tavuklara ait izolatların türlere göre dağılımı 58
Şekil 4-5: Broyler tavuklara ait izolatların türlere göre dağılımı 59
Şekil 4-6: Yetiştiriciliklerin tümünden izole edilen bütün izolatların türlere göre dağılımı 59
Şekil 4-7: Yumurtacı tavuğa ait broth mikrodilusyon testi 61
Şekil 4-8: Broyler tavuğa ait broth mikrodilusyon testi 61
Şekil 4-9: PCR sonucunda *Lactobacillus* türlerinin erm (A) geni jel elektroforez görüntüleri 71
Şekil 4-10: PCR sonucunda *Lactobacillus* türlerinin erm (B) geni jel elektroforez görüntüleri 71
Şekil 4-11: PCR sonucunda *Lactobacillus* türlerinin erm (C) geni jel elektroforez görüntüleri 72

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

a-cyano-4-hydroxycinnamic acid	HCCA
Amonyum sülfat	$(NH_4)_2SO_4$
Amplified Fragment Length Polymorphism	AFLP
Amplified rDNA Restriction Analysis	ARDRA
Analytical profile index	API
Antibiyotik direnci	AR
Base-pare	bp
Bovine serum albumin	BSA
Clinical and Laboratory Standards Institute	CLSI
Cluster of Differentiation	CD
Colony forming unit	cfu
Common (base 10) logarithm	log_{10}
DeMan Rogosa and Sharpe	MRS
Denatüre Gradiyen Jel Elektroforezi	DGGE
Deoksiribonükleaz	DNase
Deoksiribonükleik asit	DNA
Deoxynucleotide triphosphate	Dntp
Epidemiological cut-off values	ECOFF
Erytromycin-resistant-methylase	Erm
Etilendiamin tetraasetik asit	EDTA
European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing	EUCAST
European Food Safety Authority	EFSA
Food and Agriculture Organization	FAO
Food and Drug Administration	FDA
Gastrointestinal tract	GIT
Generally recognised as safe	GRAS
Genler Arası 16S-23S rRNA Ayırıcı Bölge	ISR 16S-23SrRNA
Gram	g
Hidrojen Disülfid	H_2S_2
Hidrojen peroksit	H_2O_2
International Organization of Standardization /International Dairy Federation	ISO/IDF

Immunoglobulin	Ig
LAB susceptibility test medium	LSM
Lactic Acid Bacteria	LAB
Lactobacillus Anaerobic MRS with Vancomycin and Bromocresol green	LAMVAB
Lactobacillus, *Leuconostoc, Pediococcus, Weissella*	LLPW
Macrolide-Lincosamide-Streptogramin	MLS
Magnezyum Sülfat	$MgSO_4$
Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon /iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi	MALDI-TOF MS
Mikrogram	µg
Mikrolitre	µl
Mikromolar	Mm
Miligram	mg
Mililitre	mL
Minimal inhibisyon konsantrasyonu	MİK
Nanometre	nm
Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed	FEEDAP
Polimeraz Zincir Reaksiyonu	PZR
Potasyum Klorür	KCl
Power of Hydrogen	pH
Pulsed Field Gel Electrophoresis	FGE
Qualified Presumption of Safety	QPS
Randomly Amplified Polymorphic DNA	RAPD
Repetitive Extragenic Palindrome PCR	Rep-PZR
Restriction Fragment Length Polymorphism	RFLP
Revolution Per Minute	rpm
Ribonükleaz	RNase
Ribozomal DNA	rDNA
Ribozomal RNA	rRNA
Subunit	S
Temperature Gradient Gel Electrophoresis	TGGE
Temporal Temperature Gradient Electrophoresis	TTGE
Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism	T-RFLP

Transfer RNA intergenic spacer length polymorphism analysis	tDNA-PCR
Trifluoro-acetic acid	TFA
Tris-acetate-EDTA	TAE
Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride	Tris-HCl
Ultraviolet	UV
Unit	U
Zamansal Sıcaklık Gradiyent Elektroforezi	TTGE
16S-23S İç Transkribe Edilen Ayırıcı Bölge	16S-23S ITS

ÖZET

Kenar, C. (2020) Ticari ve Halk Elinde Beslenen Tavuklarda Enterik Laktobasillerin Dağılımı ve Makrolide-Lincosamide-Streptogramin (MLS) Antibiyotiklere Direnç Profillerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi. İstanbul.

Bu çalışmada; ticari ve halk elinde beslenen tavuklardan alınan kloakal sıvaplardan Laktobasil türlerinin izolasyon ve identifikasyonu ile dağılımının belirlenmesi, izolatların Makrolid-Linkosamid-Streptogramin (MLS) grup antibiyotiklere ait MİK değerlerinin ve dirençten sorumlu belirli genlerin PCR ile saptanması amaçlandı.

12 farklı çiftlikten tesadüfi örnekleme ile toplamda 60 adet kloakal sürüntü örneğinden 174 *Lactobacillus* izolatı elde edildi. Bu izolatların 48'i halk elinde beslenen, 57'si yumurtacı ve 69'u broyler yetiştiricilik şekillerine aitti. Sırasıyla halk elinde beslenen, yumurtacı ve broyler yetiştiricilik olmak üzere 10, 12, 9 farklı *Lactobacillus* türü UltrafleXtreme MALDI TOF mass spectrometer cihazıyla identifiye edildi. Farklı Laktobasil türü izolat sayısı bakımından yetiştiricilik şekilleri arasında fark önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Broth mikrodilüsyon metoduyla gerçekleştirilen antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına göre; eritromisin, klindamisin, linkomisin, tylosin ile virjinamisin antibiyotiklerine direnç oranları sırasıyla halk elinde beslenen %62,5, %72,9, %43,8, %18,8, %37,5, yumurtacı %47,4, %78,9, %77,2, %40,4, %54,4 ve broylerde %87, %92,8, %91,3, %87, %73,9 olarak saptandı. Test edilen tüm antibiyotikler için yetiştiricilik şekilleri arasında fark önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Günümüzde Laktobasil türleri için antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde standart metod bulunmayışına bağlı olarak fenotipik test, bakteriyel suşların antibiyotik direnç belirleyicilerinin varlığı yönünden tarandığı moleküler yöntemle (PZR) kombine edildi. Bu bağlamda dirençten sorumlu gen varlığı [erm(B)-erm(C)] değerlendirmesinde ise oranlar; halk elinde beslenen, yumurtacı ve broiler yetiştiricilikte sırasıyla; %27,1-%37,5, %70,2-%71,9, %76,8-%55,1 olarak bulundu. Erm(A) direnç geni varlığına sadece broiler tavuğa ait 1 *Lactobacillus vaginalis* izolatında rastlanmıştır.

Sonuç olarak; hem ticari hem halk elinde beslenen tavukların mikrobiyomunda, önemli üyelerden olan Laktobasillerde yaygın antibiyotik direnç varlığına rastlanması antimikrobiyallerin kullanımının kontrollü ve sınırlı olması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Tavuk, Laktobasillus, MLS direnci

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:29115

ABSTRACT

Kenar, C. (2020) Distribution of Enteric Lactobacilli in Backyard and Commercial Poultry and Investigation of Their Makrolide-Lincosamide-Streptogramin (MLS) Antibiotics Resistance Profiles. İstanbul University-Cerrahpaşa Institute of Graduate Education, Department of Microbiology. PhD Thesis. İstanbul.

In this study; it was aimed to determine the distribution and isolation of Lactobacillus species from cloacal swabs taken from commercial and backyard chickens, and to determine the MIC values of the isolates belonging to Macrolide-Lincosamide-Streptogramin (MLS) group antibiotics and specific genes responsible for resistance by PCR.

A total of 174 Lactobacillus isolates were obtained from 60 cloacal swab samples by random sampling from 12 different farms. 48 of these isolates were from backyard chickens, 57 of them belonged to laying hens and 69 of broilers. 10, 12, 9 different Lactobacillus species were identified with UltrafleXtreme MALDI TOF mass spectrometer from backyard chickens, laying hens and broilers, respectively. The difference between the breeding methods was found to be significant in terms of the number of different Lactobacillus species ($p<0,05$). According to the antibiotic sensitivity test results performed with the broth microdilution method; resistance rates to erythromycin, clindamycin, lincomycin, tylosin and virginamycin antibiotics were 62.5%, 72.9%, 43.8%, 18.8%, 37.5% in backyard chickens, %47,4, %78,9, %77,2, %40,4, %54,4 in laying hens and 87%, 92.8%, 91.3%, 87%, 73.9% in broilers, respectively. For all antibiotics tested, the difference in breeding method was found to be significant ($p<0,05$). Due to the lack of a standard method for determining antibiotic susceptibility for Lactobacillus species, the phenotypic test was combined with the molecular method (PCR) in which bacterial strains were screened for the presence of antibiotic resistance determinants. In this context, in the evaluation of the gene responsible for resistance, the rates are; 27.1%-37.5%, 70.2%-71.9%, 76,8%-55,1% in backyard chickens, laying hens and broilers, respectively. The presence of the erm (A) resistance gene was found only in 1 Lactobacillus vaginalis isolate from broiler chicken.

As a result; the presence of widespread antibiotic resistance in the microbiome of both commercial and backyard chickens, one of its important members, Lactobacilli, reveals the need for controlled and limited use of antimicrobials

Key Words: Chicken, Lactobacillus, MLS resistance

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University - Cerrahpasa. Project No: 29115

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Laktobasiller insan ve hayvanlarda gastrointestinal mikrobiyatanın önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Bununla birlikte bitkilerde, bitkisel kaynaklı materyallerde, fermente gıdalarda ayrıca insan ve hayvanlarda ağız boşluğunda, vajinada bulunmaktadır. Bu bakteriler genellikle apatojenik olarak nitelendirilmekte ve faydalı özelliklerinden dolayı probiyotik olarak kullanılmaktadır.

Probiyotiklerin hayvan yetiştirmede antibiyotiklerin yerine gıda katkısı olarak kullanımı önemlidir. Laktik asit bakterileri içeriği olan probiyotikler hem hayvan ve insan sağlığını iyileştirmede hem de büyümeyi arttırmada tercih edilmektedir.

Günümüzde antibiyotiklere direnç küresel boyutta toplumsal sağlık sorunu haline gelmektedir. Bu sorunun sebeplerinden biri olan antimikrobiyallerin son yıllarda artan kullanımı sadece patojenik değil bunun yanında apatojenik mikrobiotal unsurlarda da antibiyotik direnç gelişimine sebep olmaktadır. Antibiyotik dirençli bakteriler sadece hayvanlarda tehlike oluşturmamakta aynı zamanda gıda zinciriyle insanlarda da problemlere yol açmaktadır. Bu bağlamda, gastrointestinal kommensal bakteriler (LAB) antimikrobiyal direnç genlerini patojen bakterilere aktarmada rezervuar rolü oynamaktadır. Bu direnç genlerinin zoonotik öneme sahip ajanlara aktarımı söz konusu olduğunda, kanatlılarda dirençli laktobasillerin varlığının toplumsal sağlık sorunlarına sebebiyet vereceği düşünülmektedir. Ayrıca laktobasillerde direnç genleri varlığı insan ve kanatlılarda tedaviyi engelleyici bir tehdit oluşturmaktadır.

Birçok araştırıcı patojen bakterilerde antimikrobiyal direnç konulu çalışmalar yürütmesine rağmen; mevcut literatürler incelendiğinde, kanatlılarda laktobasillerde antibiyotik direnciyle ilgili dünyada sınırlı sayıda kaynak bulunurken ülkemizde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Birkaç araştırıcının direnç konusunda kommensal bakterilerin de rolünü irdelemesiyle, laktobasillerde antibiyotik direnci son yıllarda oldukça dikkat çeken araştırmalar arasında yer almıştır.

Bu çalışmayla; ticari ve halk elinde beslenen tavuklardan izole edilen enterik Laktobasillerin izolasyonu, identifikasyonu ile dağılımını belirlemek ve Türkiye'de kanatlı sektöründe kullanılan antibiyotikleri de göz önüne alarak makrolide-lincosamide-streptogramin (MLS) antibiyotiklere direnci ve sorumlu genlerin varlığını araştırmak suretiyle, ülkemize ve dünyaya konuya ait güncel veri katkısında bulunmak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Probiyotiklerin Tarihçesi

Probiyotik kelimesi Yunancada yaşam için anlamına gelen "pro bios" teriminden türemiştir. Bu kavram da probiyotikleri "yaşama karşı" anlamına gelen antibiyotiklerin karşısına koymaktadır (Yavuzdurmaz 2007).

Nobel Tıp Ödülünü 1912 yılında kazanan Elie Metchnikoff, probiyotiklerin bilim dünyasında kaşifi olarak kabul edilmektedir. Rus bilim adamı, yoğurt, peynir gibi süt ürünlerinde var olan asit üreten mikroorganizmaların bağırsakta bulunan hastalık yapan mikroorganizmaları nötralize ettiğini keşfetmiştir. Metchnikoff bunun yanı sıra Bulgaristan ve Kafkasya'da insanların ömürlerinin uzun olmasını probiyotik bakımından zengin gıdalarla beslenmesine bağlamıştır (Schrezenmeir ve ark. 2001).

Elie Metchnikoff'un ortaya koyduğu hipotezden sonra probiyotik terim olarak ilk kez Lilly ve Stillwell tarafından 1965 yılında bir mikroorganizma tarafından sentezlenen ve diğerlerinin gelişimini stimüle eden içerik tanımlamasında kullanılmıştır. Bu tarihten itibaren probiyotiklere mekanizması ve insan sağlığına etkilerine göre farklı anlamlara gelecek çeşitli tanımlamalar yapılmıştır. Bugün kullandığımız anlamına yakın olanı, Parker tarafından 1974 yılında ortaya atılmıştır. Parker tanımlamasında probiyotikleri, bağırsaktaki mikrobiyal dengeye katkı sağlayan içerik ya da organizmalar olarak ifade etmiştir. Bugünkü anlamı ise, 1989 yılında Fuller tarafından literature kazandırılmıştır. Böylelikle probiyotikler için; bağırsakta mikrobiyal dengeyi iyileştirerek, konakçı sağlığını olumlu yönde etkileyen canlı mikrobiyal tamamlayıcı tanımlaması yapılmıştır. Bununla beraber bilimsel toplululuklar arasında probiyotik terimi ifadesi çok daha karmaşık ve çeşitli hale gelmektedir. Gıda ve Tarım Örgütü ve Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, yeterli miktarda uygulandığında konakçının sağlığına fayda sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak ifade edilmektedir (Yavuzdurmaz 2007; Jose 2015).

2.2. Probiyotik

Probiyotikler, bulunduğu konakçıya genel olarak iyilik hali veren mikrobiyel gıda katkıları olarak tanımlanmaktadır (Hotel, 2001). İnsanlarda bağırsak yangılarının tedavisi, çiftlik hayvanlarında vücut ağırlığını ve yemden yararlanımı arttırmak, kanatlılarda ise bulaşıcı hastalıkların baskılanması gibi bazı sağlık şartlarının iyileştirilmesinin amaçlandığı spesifik uygulamalarda probiyotiklerden faydalanılmaktadır. Probiyotikler çoklu gastrointestinal hastalıkların tedavi ve kontrol stratejilerinde geniş çapta tanınırlık kazanmıştır. Bazı laktik asit bakterisi (LAB) suşlarının sağlığa faydalı etkiler sağladığı açıkça gösterilmiştir. Bununla birlikte, bu etkilerin suş spesifik olduğu bilinmekte ve altında yatan moleküler mekanizma halen tam anlamıyla anlaşılamamaktadır. Bu nedenle, probiyotik aktivitesinin arkasında var olan mekanizmanın anlaşılmasında bilimsel kanıtların (epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen veriler, in vivo ve in vitro deneyler, proteomik ve genomik çalışmalar) yardımcı olacağı düşünülmektedir. Proteomik, genom ve transkriptomla ilişkili olan biyolojik fonksiyonlarının anlaşılmasında fayda sağlamaktadır. Karşılaştırmalı proteomiklerin protein tanımlamada ve bir gün probiyotik özellikler için bakteriyel biyobelirteç görevi görecek proteomik modeli elde etmede kullanılabileceği belirtilmektedir (Jose 2015).

2.2.1. Probiyotiklerin Sınıflandırılması

Gıda ve Tarım Örgütü (FAO, 2016); probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaları aşağıda belirtildiği şekilde sınıflandırmaktadır:

1- Bakteriyel ve bakteriyel olmayan probiyotikler: Belirli mantar ve maya probiyotikleri haricinde kullanılan mikroorganizmaların çoğunluğunu bakteriler oluşturmaktadır. Bu bakteriyel probiyotiklere örnek olarak; birçok *Lactobacillus, Bifidobacterium, Bacillus, Enterococcus* türleri örnek verilebilirken bakteriyel olmayanlar ise *Aspergillus oryzae*, *Candida pintolopesii*, *Saccharomyces bourlardii* ve *Saccharomyces cerevisiae* olarak gösterilmektedir.

2- Spor formunda olan ve spor formda olmayan probiyotikler: Başlangıçta spor oluşturmayan *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşları çoğunluktayken günümüzde *Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens* gibi sporlu formda bakteriler kullanılmaktadır.

3- Çok suşlu ve tek suştan oluşan probiyotikler: Probiyotik ürünler tek suş ila çok suştan veya türden oluşan yapıya kadar değişiklik göstermektedir. Çok suştan meydana gelen probiyotiklere örnek olarak PoultryStar ME; *Enterococcus faecium, Lactobacillus reuteri, L. salivarius and Pediococcus acidilactici* gibi türlerden oluşurken, Anta Pro EF sadece *E. Faecium* türünü içermektedir.
4- Gastrointestinal flora yapısında olan (autochthonous) ve yapısında bulunmayan (allochthonous) probiyotikler: Probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar hayvanlarda gastrointestinal sistemde bulunmazken (mayalar), bazıları da floaranın doğal üyesidir (*Lactobacillus* ve *Bifidobacterium*).

2.2.2. Probiyotiklerin Etki Mekanizmaları

Farklı probiyotiklerin etkilerini henüz tam olarak anlaşılmamış çeşitli mekanizmalarla uyguladığı bilinmektedir. Bu mekanizmalardaki farklılığa, gastrointestinal sistem duvarı veya lümenine olan etkisinin sebep olduğu düşünülmektedir (Fajardo ve ark. 2012).

Probiyotiklerin başlıca etki mekanizmalarının aşağıda sıralandığı gibi olduğu düşünülmektedir:

- Gastrointestinal sistemdeki mikrobiyal populasyonda değişim:

Gastrointestinal sistem mikroflorasının istenilen yönde desteklenmesi

Sağlıklı gastrointestinal sistemin belirleyicilerinden biri mikrobiyal populasyonun kompozisyonudur. Probiyotiklerin de; bu mikrobiyal populasyon dinamiklerini değiştirebildiği ve sonuç olarak yararlı ve zararlı bakterilerin dengesinin değiştirilmesi aracılığıyla, arzu edilen yönde mikrobiyal populasyonun yeniden dizaynını sağlayabildiği belirtilmektedir (An ve ark. 2008; Mountzouris ve ark. 2009). Gastrointestinal sistemdeki sağlıklı mikrobiyal populasyon; çoğu zaman hayvanın performansında iyileşme, daha etkili bir biçimde sindirim olarak yansımakta ve daha gelişmiş immunite ile ilişkilendirilmektedir (Niba ve ark. 2009; Hung ve ark. 2012).

Tavuklarda gastrointestinal floranın probiyotikler aracılığıyla en yaygın düzenleniş biçiminin; *Lactobacillus* ve *Bifidobacteria* popülasyonlarındaki artışla birlikte, çoğunlukla *Escherichia coli ve Clostridium* spp. türlerinden oluşan

koliformlardaki azalma ile sağlandığı bildirilmiştir. Floranın bu tarzda düzenlenişinin; laktik asit bakterileri (LAB), sporlu bakteriler (*Bacillus spp.)*, klostridial bakteriler (*C. butyricum*) ve hem gram pozitif hem negatif suşlar gibi probiyotik olarak kullanılan yaygın bakteri türlerinin hepsinde meydana geldiği belirtilmektedir (FAO 2016).

- Gıdaların sindirim ve absorbsiyonunun arttırılması

Probiyotiklerin sebep olduğu hayvanların üretkenliklerindeki gelişmeler, gıdaların sindirim ve absorbsiyonundaki artışla ilişkilendirilebilmektedir (Apata 2008). Probiyotiklerin esansiyel aminoasitlerin ileumda sindirilebilirliğini fark edilebilir bir şekilde arttırarak, %5 oranında vücut ağırlık artışı sağladığı (Zhang ve ark. 2014) ve kanatlılarda kalsiyumunun biyoyararlanımını geliştirdiği gösterilmiştir (Chawla ve ark. 2013).

Jin ve ark. (2000) tarafından; beslenmedeki gıdaların sindirilebilirliğinin artışının sebebi olarak, probiyotikler nedeniyle bağırsaklardaki enzim aktivitesinin artması gösterilmektedir. Ayrıca probiyotiklerin bağırsak villuslarının uzunluğu ve ağırlığını arttırdığı bilinmekte, bunun da gıda emilim yüzeyinin genişlemesi anlamına geldiğine işaret edilmektedir (Biloni ve ark. 2013; Jayaraman ve ark. 2013; Afsharmanesh ve ark. 2014).

- Antimikrobiyal maddelerin üretimi

Bacillus ve laktik asit bakterilerinin (LAB) de dâhil olduğu birçok bakteri türünün çeşitli türlerde ısıya dayanıklı bakteriyosinler ürettiği bilinmektedir (Cotter ve ark. 2005). Bu bakteriyosinlerin de hayvanlarda *Bacillus, Staphylococcus, Enterococcus, Listeria ve Salmonella* türlerinin dâhil olduğu potansiyel patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Flynn ve ark. 2002; Corr ve ark. 2007; Rea ve ark. 2007).

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin (örneğin nisin); bakteriyel yüzeyde porlar oluşturmak suretiyle, hücre duvarı sentezinin inhibisyonu aracılığıyla patojenik mikroorganizmaların gelişimini engellediği belirtilmektedir (Wiedemann ve ark. 2001; Hassan ve ark. 2012).

- Patojenik mikroorganizmalarda gen ekspresyonunun değişimi

Bakteriler, davranışlarını etkileyen "otomatik indükleyici" (autoinducer) adı verilen kimyasal uyarıların sekresyonuyla hücreler arasında iletişimi gerçekleştirmektedir (Miller ve ark. 2001). Bakteriyel iletişimdeki bu süreç "quorum sensing" olarak isimlendirilmekte ve bakteri ile konakçısı arasındaki haberleşmede de kullanılmaktadır (Hughes ve ark. 2008).

Medellin-Peña ve ark. (2007) tarafından; probiyotiklerin patojen bakterilerde "quorum sensing" işleyişine etkileyebildiği, böylelikle patojenitesine tesir ettiği bildirilmiştir.

- İmmunmodülasyon

İntestinal bariyer fonksiyonunu eski haline getirme yoluyla bağırsakta doğal bağışıklığın geliştirilmesi:

Galdeano ve ark. (2006) tarafından; probiyotik formülasyonunun, gastrointestinal sistemi epiteldeki doğal bağışıklığın stimülasyonu aracılığıyla kronik yangıdan koruduğu bildirilmiştir.

İntestinal bariyer fonksiyonunu sağlamada probiyotik tedavisinin zamanlamasıda büyük önem teşkil etmektedir. Lodemann (2010) tarafından, probiyotiği patojen gastrointestinal sisteme girmeden ya da infeksiyon oluşmadan öncesinde uygulamanın en etkili zaman olduğu ileri sürülmüştür.

İmmun yanıtın baskılanması veya stimüle edilmesi:

Probiyotiklerin immun yanıtı düzenleyici etkileri çok sayıda çalışma ile ispat edilmiştir (Bai, 2013). Cao ve ark. (2013), *L. fermentum* ve *S. Cerevisiae* içeren probiyotiğin immun sistem intestinal T hücrelerini stimüle ettiğini kanıtlamış ve broyler gastrointestinal sistemlerinde CD3+, CD4+ ve CD8+ T-lenfositlerin üretimini arttırdığını vurgulamışlardır.

Probiyotiklerin ayrıca serum immunoglobulin miktarını da arttırabildiği gösterilmiştir. Zhang ve ark. (2014) tarafından, *L. acidophilus, B. subtilis* ve *C. butyricum* içeren çoklu suş probiyotiklerin, tavuklarda serum seviyesinde IgA ve IgM miktarında artış meydana getirdiği bildirilmiştir.

Bu durumun tam tersi olarak bazı çalışmalar da probiyotiklerin konakçıda immunsupresif etkilerinin olduğunu göstermektedir (Siepert ve ark. 2014). Ayrıca Borchers ve ark. (2009); spesifik probiyotiklere karşı konakçının immun yanıtında, konakçının gastrointestinal mikrobiyal profilinin de etkisi olduğunu ileri sürmüşlerdir.

- Kolonizasyona Direnç

Probiyotikler yenidoğanlarda doğal kolonizasyonu taklit ederek veya yetişkinlerde kolonize olarak patojenlerin intestinal mukozada gelişimini engellemektedirler. Belirli *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşları hayvan hücreleri yüzeyine spesifik olmayan bağlanmada, bakteriye yardımcı hidrofobik yüzeyel proteinlere sahiptir (Coconnier ve ark. 1992; Tuomola ve ark. 1998; Bibiloni ve ark. 2001).

Probiyotik bakterilerde bağırsak epiteline bu tarzda bağlanma, reseptör bağlanma ünitelerini örtmekte ve *E.coli* O157:H7, *Salmonella* gibi patojenik bakterilerin epitele saldırısına engel olmaktadır (Bernet ve ark. 1994; Hudault ve ark. 1997; Johnson-Henry ve ark. 2007).

2.3. Kanatlılarda Bağırsak Florası

Kanatlılar steril bağırsak yolu ile doğmaktadır. Doğumdan hemen sonra, doğal çevre koşulları altında gastrointestinal sisteme anneye ait dışkı, bulunduğu ortam, beslenme kaynaklı olarak bakteriler kolonize olmakta ve bu durum da sistemlerindeki mikrobiyal çeşitliliği doğurmaktadır. Sonuç olarak ilk kolonizasyondan sonra mikroflora kompozisyonunun stabilitesine bağlı olarak yeni bakteri türlerinin yerleşmesi daha zor hale gelmekte ve bu durum "kolonizasyon direnci" olarak tanımlanmaktadır. Yaygın entansif yetiştiricilikte tavuk soyları tam olarak ayrılmakta ve yumurtadan yeni çıkmış tavuklar ile anne tavuğun yetişkin mikroflorası arasında temas

bulunmamaktadır. Bu sebeple çevrede bulunan her bakterinin bağırsakta kolonize olabildiği belirtilmektedir (Blok ve ark. 2002; Van der Klis ve ark. 2002).

Bu temasta eksikliğin, bağırsak mikroflorasında tamamlanmamış kompozisyon ve gecikmiş gelişimle sonuçlandığı düşünülmektedir. Modern barınak şartlarında, broyler tipi tavukların yaşamlarının ilk haftasında kursak, duodenum ve ileumda Enterokok ve Laktobasillerin hakim tür olduğu, sekumda ise Koliformlar, Enterokoklar ve Laktobasiller egemen konumda olduğu bildirilmektedir. Daha sonraları, çoğunluğu zorunlu anaerob bakterilerin sekumda hakim olmaya başladığı, Laktobasillerin ise kursak, duodenum ve ileumda baskın olduğu bildirilmiştir (Van der Wielen ve ark. 2000; Snel ve ark. 2002; Blok ve ark. 2002).

Tavukların bağırsaklarındaki bakteri içeriği devasa bir biyokütle halinde 1014 bakteri hücresine değin kapsamaktadır. Mikroflora tahmini olarak 900'ün üzerinde bakteri türünden oluşmaktadır (Stanley ve ark. 2014). Yapılan moleküler çalışmalarla sekal mikrobiyatanın tahmini olarak minimum 140 cinsten 640 türü kapsadığını ve identifiye edilen bakterilerin %10'unun 16S rDNA gen sekanslama ile önceden bilinen bakteri türleri olduğunu ve kalan diğerlerinin yeni tür ve hatta yeni cinse ait olduğu gösterilmiştir (Ahir ve ark. 2012).

Cauwerts ve ark. (2006), broyler cloacasının büyük bir çoğunluğunu oluşturan türleri *L. crispatus, L salivarius subsp. salivarius, L. amylovorus, L. gallinarum ve L. reuteri* olarak identifiye etmiştir.

Lan ve ark. (2002), 12 haftalık beyaz Leghorn yumurta tavuklarının sekumunu meydana getiren en önemli Laktobasil türleri arasında *L. crispatus, L. salivarius ve L. reuteri*'nin bulunduğunu belirtmiştir.

Korhonen ve ark. (2007), farklı laktobasillerin, gastrointestinal sistemin belirli bölgeleri ile ilişkili olduğu gözlemlemiştir. LAB gruplarının bazılarının belirli bölgelerde diğerlerinden daha sınırlı olduğunu belirtmiştir. Bu bağlamda, LAB türlerinin dağılımının örnekleme nişine bağlı olarak farklı olduğunu öne sürmüşlerdir.

Laktobasillerin floradaki kompozisyonundaki farklılığa; genetik faktörlerin, yaşın, intestinal lokasyonun, yaşam biçimi, rasyon gibi ekolojik faktörlerin ve hatta yetiştirilme tarzının sebebiyet verdiği belirtilmektedir (Cauwerts ve ark. 2006).

Stanley ve ark. (2014), yapmış oldukları derlemede, araştırmacıların farklı tekniklerle tavukların gastrointestinal sistemlerinden izole ettiği bakterileri belirtmiştir (Tablo 2-1).

Tablo 2-1: Tavukların farklı gastrointestinal sistem bölümlerinde en sıklıkla bulunan yerleşik bakterilerin özeti

Tavuk GIT bölümü	Çalışma (Kullanılan teknik)	Hakim ve çok sayıda bulunan bakteriler
Kursak	Sekelja ve ark. (2012) (S) Rehman ve ark. (2007) (R) Fuller (1973) (C)	*Lactobacillus* (hakim tür), *Clostridiaceae, Bifidobacterium, Enterobacteriaceae, Enterococcus*
Kaslı mide	Sekelja ve ark. (2012) (S) Rehman ve ark. (2007) (R) Fuller (1973) (C) Lu ve ark. (2003) (S)	*Lactobacillus* (hakim tür), *Clostridiacea, Enterococcus, Coliforms*
Duodenum	Gong ve ark. (2002) (T-RFLP) Salanitro ve ark. (1974) (C) Konsak ve ark. (2013) (S)	*Lactobacillus* (bazı kanatlılarda % 99'a kadar hakim)
İleum	Lu ve ark. (2003) (S) Gong ve ark. (2002) (T-RFLP) Salanitro ve ark. (1974) (C) Van der Hoeven-Hangoor (2013) (Microarray)	*Lactobacillus* (oldukça hakim tür), *Streptococcus, Coliforms, Enterobacteriaceae, Clostridiacea*
Sekum	Gong ve ark. (2002) (T-RFLP) Zhu ve ark. (2002) (TTGE) Lu ve ark. (2003) (S) Stanley ve ark. (2013) (S) Torok ve ark. (2011) (T-RFLP)	Bilinmeyen ve kültür edilmemişlerden zengin *Lactobacillus, Bacterioides, Clostridium, Bifidobacterium*
Dışkı	Sekelja ve ark. (2012) (S) Zoetendal ve ark. (1998) (TGGE)	Zamanlamalar arasında büyük ölçüde değişir. *Lactobacillus, Clostridium, Fecalibacterium, Ruminococcus, Bacillus,Eubacterium, Fusobacterium*

Not: Rasyondaki değişiklikler, sürü, yaş, cinsiyet ve diğer mikrobiatayı etkileyen değişkenler baskın ve çok sayıda olan türleri etkileyebilir. Kullanılan teknikler kısaltılmıştır ve referanstan sonra verilmiştir.

S sekans temelli metodlar, C kültür, T-RFLP terminal restriction fragment length polymorphism, TTGE temporal temperature gradient electrophoresis, TGGE temperature gradient gel electrophoresis, R derleme

Hammes ve ark. (2006), yazmış oldukları yayında, günümüze kadar tavukları da kapsayan birçok hayvanın bağırsağından saptanmış *Lactobacillus* türlerini derlemişlerdir (Tablo 2-2).

Tablo 2-2: Tavukların bağırsaklarında bulunan *Lactobacillus* türleri

Laktobasillus türleri	**Tavuk bağırsağı**
L. acidophilus	+
L. amylovorus	Nd
L. crispatus	M
L. gallinarum	M
L. gasseri	Nd
L. johnsonii	M
L. murinus/animalis	+
L. intestinalis	Nd
L. salivarius	M
L. agilis	+
L. ruminis	Nd
L. hamster	Nd
L. aviaries	+
L. paracasei	Nd
L. rhamnosus	Nd
L. plantarum	Nd
L. reuteri	M
L. fermentum	+
L. brevis	+
L. delbrueckii	Nd
L. sakei	Nd
L. mucosae	Nd
L. equi	Nd
L. pantheris	Nd

Semboller: M: *Lactobacillus* türlerinin ana bileşenleri, +: bazen ortaya çıkanlar ve nd: veri yok

2.3.1. Probiyotiklerin Kanatlılar Üzerinde Etkileri

- Probiyotiklerin büyüme oranları üzerine etkileri:

Antibiyotiklerin büyütme amaçlı kullanımının yasaklanmasından sonra probiyotikler bu amaç için tercih edilen yem katkı maddelerinden biri konumuna gelmiştir. Probiyotiklerin büyütmede en etkili hızlandırıcı olduğuna işaret edilmektedir (Baidya ve ark. 1993).

Beslenmesinde probiyotik içeriği olan tavuklarda ağırlık artışının daha fazla olduğu ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Mohan ve ark. 1995; Noh 1997).

Bu durumun tam tersi olarak, aynı türde probiyotik mikroorganizmaların broylerde büyümeyi geliştiremeyebildiği bildirilmiştir (Fajardo ve ark. 2012; Hung ve ark. 2012; Zhao ve ark. 2013). Bu farklılıklar üzerine; kullanılan hayvan türü ile probiyotik çeşidi ve dozundaki farklılığın sebebiyet verdiği düşünülmektedir (Kumprechtova ve ark. 2000).

- Probiyotiklerin yumurta üretimi ve kalitesine etkileri:

Yumurtacı tavukların beslenmesinde probiyotiklerin etkisi üzerine pek çok çalışma yapılmış ve bulgular değişkenlik göstermiştir. Çalışmalardan bazıları; probiyotiklerin beslenmeye katılmasının yumurta üretimi üzerine olumlu etkisi olduğunu ortaya koyarken, (Kurtoğlu ve ark. 2004; Yörük ve ark. 2004; Xu ve ark. 2006; Gallazzi ve ark. 2009) bazıları da herhangi bir değişikliğe sebep olmadığını (Asli ve ark. 2007; Salmave ark. 2007; Dizaji ve ark. 2009; Capcarova ve ark. 2010; Mikulski ve ark. 2012) göstermiştir.

Probiyotiklerin yumurta kalitesi üzerine diğer bir etkisinin de; yumurta sarısı kolestrolünün laktik asit bakterileri (Haddadin ve ark. 1996; Panda ve ark. 2003), *Bacillus* sporları (Kurtoglu ve ark. 2004) ve mayalar (Yousefi ve ark. 2007) tarafından düşürülmesi olarak gösterilmektedir.

- Et kalitesi üzerine probiyotik etkisi:

Kabir ve ark. (2005), broyler tavuk etinde probiyotiklerin duyusal özelliklere ve mikrobiyolojik niteliğe etkisi üzerine çalışmalarda bulunmuş ve broyler rasyonuna probiyotik ilavesinin dondurma öncesi ve sonrası et kalitesi üzerine olumlu etkileri olduğuna işaret etmiştir.

Mahajan ve ark. (2000), probiyotikle beslenen tavuk etlerindeki toplam canlı bakteri sayısının, kontrol grubu tavuk etlerine kıyasla daha düşük olduğunu gözlemlemiştir.

- İntestinal histomorfoloji üzerine etkileri:

İntestinal mukozanın yapısının, kanatlılarda büyüme fonksiyonunu etkileyen intestinal fonksiyonun (sindirim ve absorbsiyon) önemli belirteçlerinden olduğu bilinmektedir (Afsharmanesh ve ark. 2014).

B. subtilis (Jayaraman ve ark. 2013), *B. coagulans* (Hung ve ark. 2012), laktik asit üreten bakteri *L. salivarius*, *P. parvulus* (Biloni ve ark. 2013) ve *E. faecium* (Abdel-Rahman ve ark. 2013; Cao ve ark. 2013) kullanımı ile villus ağırlığı ve uzunluğunda (kript oranı) artış gözlemlendiği bildirilmiştir.

- Enterik patojenlerden korunma ve kontrol üzerine etkileri:

Büyütme amaçlı kullanılan antibiyotiklerin; bazı bakterilerin sebep olduğu infeksiyonlara direnç oluşumuna ve gastrointestinal sistem florasına olumsuz yönde etkileri olduğuna işaret edilmektedir. Probiyotik takviyesi ile; infeksiyonlara direncin artışı ve dengeli gastrointestinal sistem mikrobiyotası oluşumu vasıtasıyla, bağırsak florasının desteklendiği belirtilmektedir (Ülger ve ark. 2015).

❖ ***Salmonellozis***

Kanatlılarda *Salmonella* infeksiyonlarında koruma ve kontrolde tanımlanmayan gastrointestinal kültürlerin başarılı bir biçimde kullanımı (yarışmacı dışlama), hastalıkla mücadelede gastrointestinal kültür ve probiyotik kullanımı hakkında birçok çalışmanın önünü açmıştır (Lloyd ve ark. 1977; Snoeyenbos ve ark. 1979; Bolder ve ark. 1992).

Haghighi ve ark. (2008), probiyotiklerin doza bağlı olarak çeşitli katlarda (1,2 - 3,0 $\log_{10}$) uygulamasının, *Salmonella* türlerinin sekal kolonizasyonunda azalmaya sebebiyet verdiğini göstermiştir. Probiyotiklerin ayrıca sürüde *Salmonella* infeksiyonunun bulaşmasını (horizontal bulaşma), *L. salivarius* and *Pediococcus parvulus* içeriği ile daha yavaş hale getirdiği bildirilmiştir (Biloni *ve ark.* 2013).

- ***Kamfilobakteriozis***

Morishita ve ark. (1997); broylerde *L. Acidophilus ve S. Faecium* karışımından oluşan ticari probiyotiğin oral yolla (içme suyuyla) uygulamasının, yaşamlarının ilk 3 gününde *Campylobacter* türlerinin bulaşmasını yapay olarak infekte edilmiş kuşlarda %70 oranında, *Campylobacter* bağırsak kolonizasyonunu da %27 oranında azalttığını göstermiştir.

Yapılan in vitro deneylerde sağlıklı tavukların gastrointestinal sistemlerinden izole edilen probiyotik bakteriyel suşların *(E. faecium, P. acidilactici, L. salivarius* ve *L. reuteri)* agar besiyerinde *Campylobacter jejuni* gelişimini inhibe ettiği belirtilmiştir. Sonuçlar in vivo olarak broyler tavuklarla da doğrulanmıştır. İn vitro gelişmenin inhibisyonu, probiyotikler tarafından üretilen büyüme inhibe edici faktörle ilişkilendirilmiştir (Ghareeb ve ark. 2012).

- ***Nekrotik enteritis***

Jayaraman ve ark. (2013) tarafından; *Clostridium perfringens* ile yapay olarak infekte edilen broyler tavuklarda *B. subtilis* (PB6 suşu) uygulamasının, intestinal lezyonların ciddiyetini azalttığı ve gastrointestinal sistemde patojen sayısını belirgin biçimde düşürdüğü gösterilmiştir.

- ***Koksidiozis***

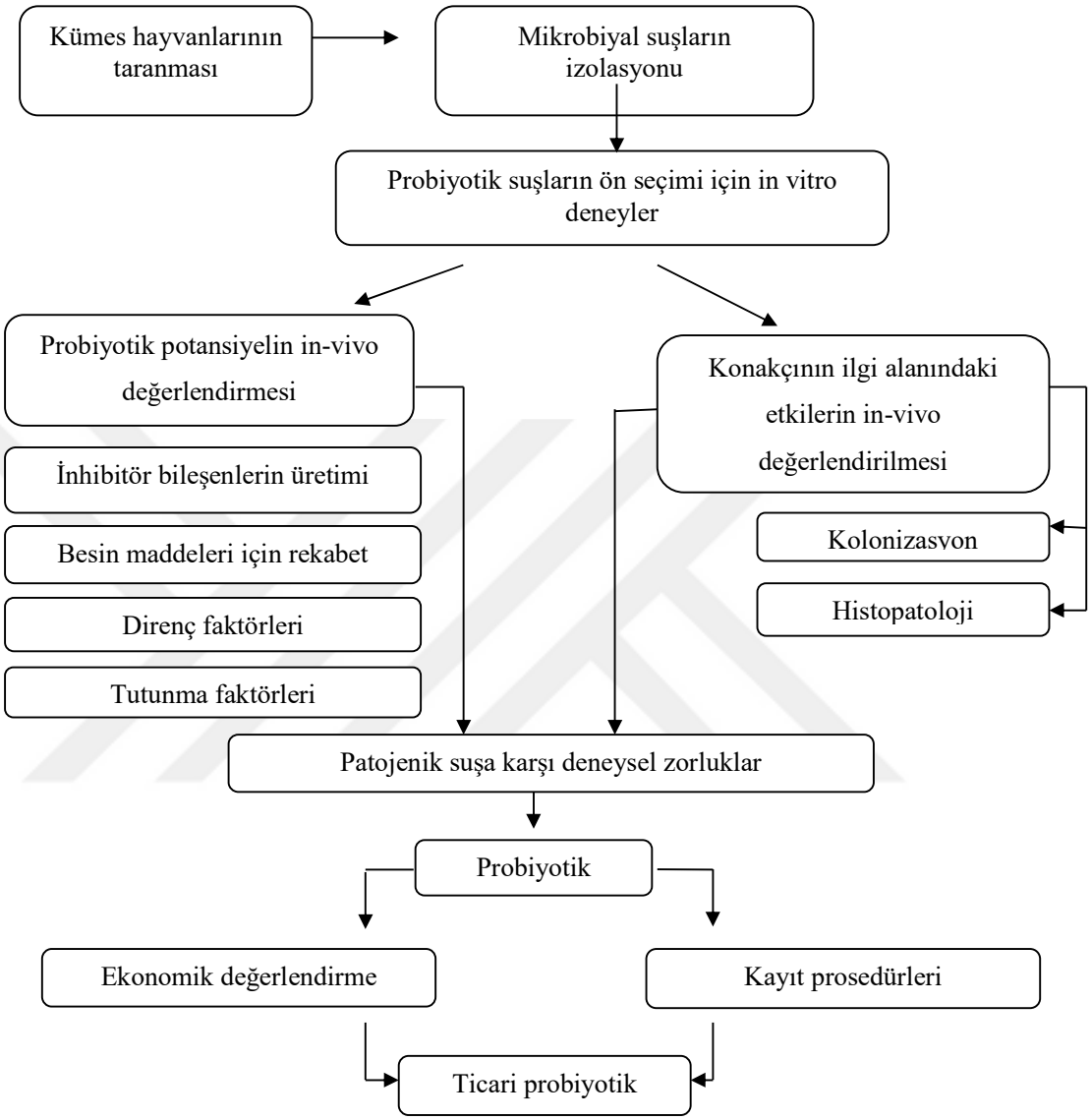
Giannenas ve ark. (2012); *E. faecium, B. animalis, L. reuteri* ve *B. subtilis* bazlı probiyotiklerin tekli ya da kombine kullanımları aracılığıyla koksidiyozun azaldığına, infekte hayvanlardan oosit saçılımının belirgin biçimde düştüğüne ve böylelikle hastalığın yayılımının önlendiğine işaret etmişlerdir.

2.3.2. Kanatlı Sektöründe Probiyotiklerin Seçiminde Kriterler

Fonksiyonel probiyotiklerin seçimi için istenilen özellikler çok çeşitlidir. Probiyotik bakterilerin sıralanan şartları yerine getirmesi istenmektedir (Ülger ve ark. 2015):

- Bağırsağın normal florasında olmalı
- Potansiyel engellerin üstesinden gelebilmek için bağırsak epiteline bağlanabilmeli
- Midenin düşük Ph'sında olduğu gibi bağırsaklardaki safra asitlerinde varlığını sürdürebilmeli
- Gastrointestinal sistemde diğer mikroorganizmlarla yarışabilmeli

Kanatlı sektöründe probiyotiklerin biyokontrol ajanları olarak seçilmesinin muhtemel yolları şekilde gösterilmiştir (Şekil 2-1). Probiyotik suşların ön seçimi amacıyla birçok in-vitro analiz geliştirilmiştir. İn-vitro analizlerle seçilen en umut vadeden suşlar; rekabet edilebilirliği, tavuklarda sürekliliğin izlenmesi için in-vivo olarak değerlendirilmiştir. Bunlara ilave olarak, potansiyel probiyotiklerin konakçı üzerinde faydalı etkilerinin (örneğin immun yanıtın arttırılması gibi) gösterilmesi gerekmektedir. Son olarak, probiyotiklerin normal depolama koşulları altında uygulanabilir olması ve endüstriyel süreçler için teknolojik olarak (örneğin liyofilize) uygun olması beklenmektedir (Kabir 2009).



Şekil 2-1: Kanatlı sektöründe probiyotiklerin seçim diyagramı

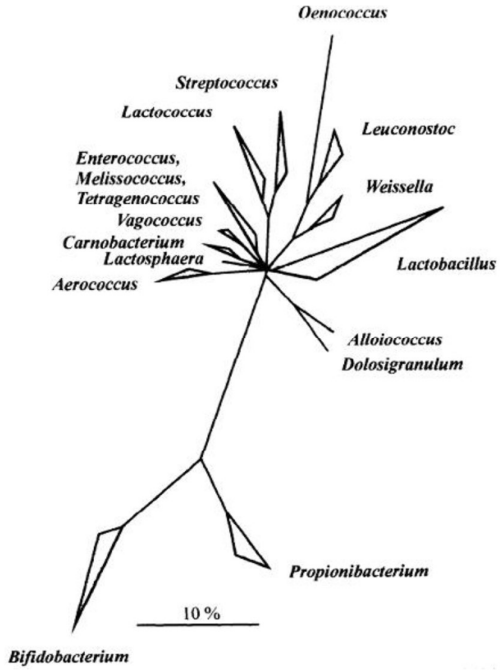
2.4. Laktik Asit Bakterileri

Tarihte ilk kez 19. yüzyılın sonlarında sütte pıhtılaşma ve fermantasyona sebep olan bakteriler Laktik asit bakterileri olarak adlandırılmıştır. Morfolojik yönden birçok değişken özelliğe sahip; uzun veya kısa çomak ya da kok şekillerinde gözlenen aile üyelerinde, fizyolojik bakımdan ise sıklıkla benzer özelliklere rastlanılmaktadır. Ailedeki üyelerin tümü; Gram özelliği pozitif, katalazı negatif, tek tür (*Sporolactobacillus inulinus*) haricinde spor meydana getirmeyen, sadece tek düzlemde bölünen (fakültatif anaerob *Pediococcus* cinsi hariç) ve birkaç üye haricinde hareketsiz bakteriler olarak tanımlanmaktadır (Yerlikaya 2014).

Laktik asit bakterileri (LAB), sitokrama sahip olmayan, mikroaerofilik veya anaerobik, aside dayanıklı, kuvvetli fermantatif olup, nitratları indirgemeyen, büyüme ve gelişimleri için glikoz ve amonyum yanında bazı vitamin ve aminoasitlere ihtiyaç duyan mikroorganizmalardır (Yörük ve ark. 2011).

DNA molekülünde Guanin+Sitozin içeriği genellikle %50'nin altında olmakla birlikte 32-53 arasında değişiklik göstermektedir (Denev 2006).

Taksonomik olarak, laktik asit bakterileri bakteriler aleminin Firmicutes bölümünün Bacilli alt bölümü Lactobacillales takımında bulunan gram-pozitif bakteriler olarak sınıflandırılmaktadır. Firmicutes şubesi içerisinde yaklaşık 20 cinsi kapsayan heterojen bir bakteri grubundan oluşmaktadır. LAB klasifikasyonu hücre morfolojileri, glukozu fermente ediş biçimleri, gelişme sıcaklığı aralığı ve şeker kullanım modelleri göz önünde bulundurularak yapılmaktadır. Laktik asit bakterilerinin belli başlı cinsleri *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* olarak tanımlanmaktadır. Bununla birlikte *Lactobacillus* en geniş cinsi oluşturmakta ve karbonhidrat yönünden içeriği zengin olan 200 den fazla türü kapsamaktadır (Korhonen 2010; Mokoena 2017). Ribozomal proteinlerin art arda hizalanmaları esasına göreoluşturulan Lactobacillales filogenetik ağaç modeli Şekil 2-2'de gösterilmiştir (Stiles ve ark. 1997).



Şekil 2-2: Lactobacillales Filogenetik Ağacı (Stiles ve ark. 1997)

Adaptasyon kapasitelerinin yüksek olmasından kaynaklı, farklı çevresel ortamlarda geniş aralıklarda gözlemlenirler. Gıda ürünleri arasında; süt ürünlerinden yoğurt ve peynirde, fermente sebzelerde (turşu vb.), fermente etlerde (salam vb.) ve ekşi ekmekte, bitkilerde veya bitkisel orijinli materyallerde ayrıca insan ve hayvanların ağız boşluğunda, gastrointestinal sistemlerinde (GIT), kadınların vajinasında bulunurlar. Bununla birlikte LAB hem kara hem de deniz hayvanları ile ilişkilendirilmektedir (Korhonen 2010; Dec ve ark. 2015).

Lactobacillus cinsi bakterilerin elektron mikroskobuyla incelendiğinde, 5 ana yapıdan oluştuğu gözlenmektedir. Bu kısımlar; hücre duvarı, sitoplazmik membran, nükleer elementler (kromozomlar ile plazmidler) ve ribozomlardır. Hücre duvarı 20-40 nm kalınlığında; su, mineral maddeler (tuz vb.) ve metabolitlerin geçişini sağlayan peptidoglikan tabakaya sahiptir. Peptidoglikan, N-asetilmurminik asit ve N-asetilglikozamin monomer yapılarından meydana gelmiştir. Hücre duvarları bu yapıların haricinde şekerler, proteinler, teikoik asit ve nötr polisakkaritler de ihtiva etmektedir. Teikoik asit antijenik karakterin oluşumundan sorumludur ve negatif yük

meydana getirmektedir. Teikoik asit gliserol fosfat veya ribitol fosfat gibi polimerlerden oluşmaktadır. Hücre duvarı proteaz enzimleri içermektedir ve enzimler çeşitli faaliyetlerde (çoğalmada ve azotlu maddelerin parçalanmasında) rol almaktadır. Bakterilerin proteinleri işleyebileceği büyüklüğe getirilebilmesinde gerekli enzimler ise stoplazmik membranda bulunmakta; bu reaksiyonlar ve ilave olarak fosfotransferaz enzimleriyle aktif taşıma da sitoplazmik membranda gerçekleşmektedir. En az bir adet plasmid Laktik asit bakterilerinin çoğunda bulunmaktadır. Plazmidler, koruyucu özellikte ekzopolisakkarit ve antimikrobiyal madde sentezinden sorumlu tutulmaktadır (Aykanat 2008).

Laktik asit bakterilerinde bulunan ribozomlar 70S tipindedir. Bu yapı 50S büyük ve 30S küçük olarak iki alt üniteden meydana gelmektedir. 50S'lik alt birimin yapısında 23S rRNA ve 50S rRNA ile muhtemel 35 çeşit protein, 30 S'lik alt birimde ise 16S rRNA ile 25 farklı protein bulunmaktadır. Bakterilerin birbirlerinden ayırımında da 16S rRNA'dan faydalanılmaktadır (Demirok 2014).

Laktik asit bakterilerinde hem grupları (katalaz ve sitokrom) bulunmamaktadır. Buna karşılık havanın oksijeninde gelişip üreme gösterebilirler. Katalaz enzimlerinin yokluğuna karşın aerob ortamlarda gelişebilen ender bakteriler arasında laktik asit bakterileri bulunmaktadır (Halkman 1991; Hofvendahl ve ark. 2000).

Laktik asit bakterileri düşük pH'larda asit (formik asit, laktik asit, propiyonik asit vb.) meydana getirme özelliğine sahiptir. Bu ürünlerle de patojen ve kontaminant mikroorganizmaların gelişmelerini engellemektedirler. Yapılan araştırmalar sonucu *Lactobacillus*'ların bu inhibisyonik özelliğinin *Streptococcus*'lara oranla daha fazla olduğu ortaya konmuştur. Laktik asit bakterilerinin aerobik şartlarda gelişmesiyle ortaya çıkan hidrojen peroksitin de pek çok mikroorganizma üzerinde inhibisyon etkisinin olduğu bildirilmiştir (Demirok 2014).

Laktik asit bakterileri asit meydana getirmelerinin yanı sıra farklı bakteri grupları (*Lactobacillus, Lactococcus, Pediococcus, Leuconostoc, Enterococcus*) tarafından üretilen bakteriyosinleri de üretir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bu bakteriyosinler hakkında araştırmalar yapılmakta ve gıdalarda da

kullanılabilmektedir. Bakteriyosinlerin antagonistik etkilerinin yakın akraba ve gram pozitif türler üzerine olmasıyla birlikte gıdalarda bozulmaya sebep olan patojen bakterilere (*Escherichia coli, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens, Listeria* türleri gibi) de bakteriosidal etki göstererek gıdalarda doğal koruyucu görevi görmektedirler (Biswas ve ark. 1991; Lewus ve ark. 1991; Kurt ve ark. 2005; Todorov ve ark. 2006).

2.4.1. *Lactobacillu*s Türü

1901 yılında ilk olarak Beijerinck *Lactobacillus* türünü ileri sürmüştür (Beijerinck 1901). *Lactobacillus* cinsi fenotipik, ekolojik ve genotipik bakımdan oldukça çeşitlilik barındıran 261 türü içermektedir (Zheng ve ark. 2020). Bu sayılar modern moleküler biyoloji metodları ve tüm genom tabanlı teknikler baz alınarak devamlı olarak yeniden değerlendirilmektedir (Felis ve ark. 2007).

Laktobasiller katalaz ve sitokrom negatif, genellikle hareketsiz formda ve nitratı indirgemeyen bakterilerdir. Jelatini sıvılaştırmazlar. Kazeini parçalamazlar fakat suşların çoğunluğu az miktarda çözünür nitrojen üretirler. İndol ve H_2S_2 meydana getirmezler. 2-53°de gelişim göstermekle birlikte optimum aralığı 30-40° dir (Denev 2006). Hafif asidik ortamda hızlı bir şekilde çoğalırlar. % 1-3 oranında laktik asit meydana getirerek pH'yı 3.2-3.5'e düşürürler. Yüksek proteolitik aktivite gösterirler (Yörük ve ark. 2011).

Laktobasiller besin açısından zengin ortamlarda gelişme kapasitesine sahiptirler ve basit metabolik yollar aracılığıyla şekeri hızlı bir şekilde laktik asite dönüştürürler. Genellikle laktobasiller anaerobik ve kesin surette fermentatif olmalarına rağmen; bazı laktobasiller rudimenter elektron taşıma zincirlerine sahiptir ve bu sayede haem gibi dışarıdan eklenmiş kofaktörlerin varlığında geliştiklerinde, moleküler oksijen ve muhtemelen nitratı solumalarına imkan sağlanır (Kant ve ark. 2010).

Fermantatif özellikleri bakımından değerlendirildiğinde, *Lactobacillus* türleri obligat homofermentatifler, fakültatif hetero-fermentatifler ve obligat heterofermentatifler olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır (Korhonen 2010). Homofermentatif laktik asit bakterileri (*Lactococcus*, bazı *Lactobacilluslar*, *Pediococcus* vb.) şekerlerden fruktoz di fosfat yoluyla ana ürün olarak % 90-95 oranında laktik asit meydana getirir. Heterofermentatif laktik asit bakterileri (*Leuconostoc, Weissella*, bazı *Lactobacillus*lar, *Oenococcus*) ise heksoz mono fosfat yoluyla yaptığı fermentasyon sonucunda %50 laktik asit meydana getirirken, ilave olarak yüksek miktarda karbondioksit, etil alkol, diasetil, asetik asit, gliserol, früktoz ve mannitol gibi ikincil ürünler açığa çıkarırlar (Demirok 2014). 1 ve 2'nci gruptaki bakterilerin büyük çoğunluğu ile 3'üncü gruptaki bakterilerin bazıları fermente gıdalarda kullanılmakla birlikte 3'üncü grubun gıdalarda bozulmaya sebep olduğu bilinmektedir (Yörük ve ark. 2011).

Salvetti ve ark. (2012) tarafından yayınlanan filogenetik yapıya göre 16S rRNA gen sekanslama baz alınarak Laktobasiller 15 gruba ayrılmaktadır (Tablo 2-3). Bununla birlikte aynı gruba dahil olan türlerin her zaman aynı fenotipik karakterleri taşımadığı belirtilmektedir. 16S rRNA geninin moleküler taksonomide altın standart olarak kabul edilmesine ve bakteriyel topluluğu tanımlamada sıklıkla kullanılmasına rağmen, bu yolla yapılan identifikasyonun yakın ilişkili türleri değerlendirmede yetersiz kalabileceği üzerinde durulmuştur. Dolayısıyla; bazı durumlarda, 16S rRNA gen sekans analizinin grup sınıflandırmasında kısıtlı kaldığı bildirilmektedir.

Tablo 2-3: Salvetti ve ark. (2012) göre, Laktobasillerin filogenetik grupları ve her gruba Laktobasillus türleri örneği

Filogenetik Grup	Laktobasillus türleri
L. delbrueckii	*L. delbrueckii, L. acidophilus, L. gasseri, L. iners, L. johnsonii*
L. salivarius	*L. salivarius, L. agilis, L. animalis*
L. reuteri	*L. reuteri, L. fermentum, L. oris, L. vaginalis*
L. buchneri	*L. buchneri, L. otakiensis, L. parabuchneri*
L. alimentarius	*L. alimentarius, L. crustorum, L. farciminis*
L. brevis	*L. brevis, L. hammesii, L. koreensis*
L. collinoides	*L. collinoides, L. kimchicus, L. odoratitofui*
L. fructivorans	*L. fructivorans, L. florum, L. homohiochii*
L. plantarum	*L. plantarum, L. paraplantarum, L. pentosus*
L. sakei	*L. sakei, L. curvatus, L. fuchuensis, L. graminis*
L. casei	*L. casei, L. paracasei, L. rhamnosus*
L. coryniformis	*L. coryniformis, L. bifermentans, L. rennin*
L. manihotivorans	*L. manihotivorans, L. nasuensis, L. porcinae*
L. perolens	*L. perolens, L. harbinensis, L. shenzhenensis*
L. vaccinostercus	*L. vaccinostercus, L. oligofermentans*

2.4.2. İzolasyon ve İdentifikasyonda Kullanılan Yöntemler

Laktik asit bakterilerinin tanımlanması için ilk olarak bulundukları ortamdan izolasyonları ve saf kültürlerinin elde edilmesi gereklidir. İzolasyon amaçlı çeşitli besiyerlerinden faydalanılmaktadır. Bu bakteriler besiyerinin içerisinde sadece glikoz ve amonyum bulunduğu ortam şartlarında gelişememekle beraber, birçoğu da aminoasitlere ve vitaminlerden bir ya da birkaçına ihtiyaç duymaktadır (Demirok 2014).

Tablo 2-4'te Laktobasillus ve ilişkili cinslerde (LLPW) kullanılan en önemli seçici besiyerleri özetlemekte, bununla birlikte *Lactobacillus* cinsi için şu anda tamamen seçici bir ortam mevcut bulunmamaktadır. Laktobasillerin izolasyonu için tasarlanmış olan besiyerlerinin çoğunluğu, lökonostokların ve / veya pediokokların ve *Weissella* örneklerinin eşzamanlı olarak büyümesini sağlamaktadır (Schillinger ve ark. 2003).

Tablo 2-4: Laktobasillus ve ilişkili cinslerde (LLPW grup-*Lactobacillus, Leuconostoc* ve *Pediococcus, Weissella*) kullanılan seçici besiyerleri

Besiyeri	Kültürü yapılan gruplar/türler	İnhibitör/ İndikatör	Kaynak
Rogosa (pH 5.5)	*Lactobacilli, Weissella Leuconostoc, Pediococcus*	Asetat, Asetik asit	Rogosa ve ark. (1951)
NAP (pH 5.5)	*Lactobacilli, Lactococci,* (*Leuconostoc* ?)	Nitrite, Actidione, Polymyxin B	Davidson ve Cronin (1973)
MRS (pH 5.5)	*Lactobacilli, Weissella*		Baird ve Patterson (1980)
MRS-S (pH 5.7	*Lactobacilli,Leuconostoc, Weissella*	Sorbic acid (%0.1)	
LaS (pH 5.0)	*Lactobacilli*, (*Leuconostoc,Weissella*)	Sorbic acid (%0.04)	Reuter (1970)
HHD (pH 7.0)	Homo- ve Heterofermentatif LAB	Bromocresol yeşili	McDonald ve ark. (1987)
M 5 (pH 6.5)	Homo- ve Heterofermentatif LAB	Bromocresol yeşili	Zflnigave ark. (1993)
TJA (pH 5.0)	*Lactobacilli, Pediococci, Leuconostoc*	Cycloheximide, Sorbik asit	Yoshizumi (1975)
KPL (pH 5.5)	*Lactobacillus kefiranofaciens*	Beyaz şarap	Tobave ark. (1986)

Bunların haricinde, Hartemink ve ark. (1997) dışkıdan laktobasillerin izolasyonu amaçlı Vancomycin ve Bromokresol yeşili ilave edilmiş Lactobacillus Anaerobic MRS (LAMVAB) besiyerini öne sürmüşlerdir. Bu ortam genellikle vankomisine duyarlı olan streptokoklar, enterokoklar ve bifidobakteriler ve hatta bazen vankomisin dirençli enterokoklardahi çok sayıda başka LAB mevcudiyetinde düşük sayıda bulunan laktobasillerin saptanmasına ve izole edilmesine olanak sağlamaktadır (Kontula ve ark. 2000).

Laktik asit bakterilerinin saf kültür halinde elde edilmesinin ardından klasik yöntemlerle tanımlanması için ilk olarak koloni morfoloijsi, gram reaksiyonu, mikroskobik morfolojisi ve katalaz aktivitesinin saptanması gereklidir. Gram boyama morfolojisi çeşitli olmakla birlikte ve kısa ya da dolgun çomaklardan uzun, ince zincir halinde veya palisad çomaklara kadar değişkenlik gösterebilmektedir. Koloni morfolojileri de küçükten orta boya kadar grimsi olarak gözlenebilmekte ve genellikle kanlı agarda alfa-hemoliz oluşturmaktadır. MRS agarın da dahil olduğu çeşitli besiyerlerinde geliştiklerinde beyaz, mukoid koloni olarak görülürler (Goldstein ve ark. 2015).

Besiyerinde gelişen gram pozitif, çubuk ya da kok şeklinde, sporsuz ve katalaz özelliği negatif laktik asit bakterisi şüpheli izolatlar ayrılmakta ve elde edilen izolatların cins düzeyinde tanımlanması için belli başlı biyokimyasal, morfolojik, fizyolojik testlerden yararlanılmaktadır. Bu bakterilerin cins bazında identifikasyonunda faydalanılan fizyolojik ve biyokimyasal testlere örnek olarak karbonhidrat fermentasyon testleri, glikozdan gaz oluşturma, Voges-Proskauer, üreaz testi, indol, arjininden amonyak üretimi, sukrozdan dekstran oluşturma, jelatin hidrolizi, çeşitli Ph ve sıcaklık değerlerinde ve farklı tuz konsantrasyonlarında gelişim gösterme testleri gösterilebilmektedir (Yılmaz ve ark. 2003).

Genetik açıdan *Lactobacillus* cinsi heterojen suşları bulundurduğundan dolayı, fiziksel ve biyokimyasal testlerle sınıflandırılma yapmanın bu cinslerde kompleks ve zor olduğuna değinilmektedir (Demirok 2014).

Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında tercih edilen yöntemler fenotipik ve genotipik (moleküler) yöntemler olarak iki ana başlık altında toplanabilmektedir. Tanımlama en başta bakterinin morfolojik ve fizyolojik özellikleri göz önüne alınarak yapılmış daha sonra özellikler üzerine yapılan düzenlemelerle elde edilen doğru bulgulara rağmen birbirine yakın türlerin ayrımında yetersiz kalmıştır. Kullanılan fenotipik yöntemler, bakterinin fizyolojik ve morfolojik olarak karakterizasyonunu, protein profil analizlerini ve karbonhidrat fermentasyon özelliklerinin belirlenmesini kapsamaktadır (Kıran ve ark. 2011; Yerlikaya 2014).

Mikroorganizmaların genel grup profilleri göz önünde bulundurularak oluşturulmuş, çok sayıda biyokimyasal testin yer aldığı ticari API test kitlerinden (Analytical Profile Index) ve Diatabs (Rosco, Denmark), Enterotube (Roche), Phoenix (BD), MicroScan (Dade Behring), CRYSTAL Api (BBL) ya da BIOLOG GPMicroPlate (BIOLOG Inc., USA) gibi yöntemlerden de identifikasyon amacıyla sıklıkla faydalanılmaktadır. Laktik asit bakterilerinin API 50 CH kiti ile rahatlıkla tür/alt tür bakımından tanımlamasının yapılabildiği birçok çalışmada gösterilmiştir. Ancak kit ile alınan sonuçlar, bilgisayar programının veritabanında bulunan türler ile sınırlanmaktadır (Dušková ve ark. 2012; Yerlikaya 2014).

Laktik asit bakterilerinin tanımlamasında biyokimyasal testlere ve fermentasyon özelliklerine dayanan sistemler tür ve cins düzeyinde ayrım yapabilirken, kullanılan fenotipik yöntemler arasında en güvenilir olanın protein profil analizi olduğu saptanmıştır. Bunun haricinde fenotipik yöntemler yağ asidi metil ester profillerinin analizi ve organik asitlerin ince tabaka kromatografisi de kapsamaktadır. Ancak klasik yöntemlerle yapılan çalışmalar çoğunlukla zaman alıcı olmakta ve sonuçların değerlendirilmesinde kesin tanıya ulaştıramamaktadır. Türler arası varyasyonlar ve tekrarlanabilirliğinin zayıflığı gibi sebeplerden ötürü laktik asit bakterilerinin hızlı ve güvenilir tanımının yapılması ve karakterizasyonu amaçlı olarak moleküler biyolojik yöntemlerin geliştirilmesi bu yöntemlerin uygulamaya konulması üzerine yapılan çalışmaların sayısı artış göstermektedir (Kıran ve ark. 2011; Yerlikaya 2014).

Günümüzde laktik asit bakterilerinin tanımlanması/tiplendirmesinde ilgi fenotipik yöntemlere kıyasla daha kesin ve hassas sonuçlara ulaştıran moleküler yöntemlere doğru kaymıştır. DNA temelli bu yöntemler kullanılan yönteme de bağlı olarak genustan suş düzeyine değin mikroorganizmaların tanımlanması açısından geniş bir imkan sağlamaktadır. Moleküler yöntemler polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) temelli olan ve polimeraz zincir reaksiyonu temelli olmayan olarak ayrılmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu temelli olmayan moleküler yöntemler arasında Dalgalı Alan Jel Elektroforezi (PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis), Ribotiplendirme (Ribotyping), Plazmid profil analizleri, Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism) gösterilmektedir (Kıran ve ark. 2011).

Temeli polimeraz zincir reaksiyonu olan moleküler yöntemler ise Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RFLP-PZR), Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-PZR (RAPD: Randomly Amplified Polymorphic DNA PCR), Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi (AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism), Tekrarlanan Palindromlara dayalı PZR (Rep-PZR: Repetitive Extragenic Palindrome PCR) ve yöntemleri arasında Çoğaltılmış rDNA Geni Restriksiyon Analizi (ARDRA: Amplified rDNA Restriction Analysis) ve 16S-23S İç Transkribe Edilen Ayırıcı Bölge PZR (16S-23S ITS: Internal Transcribed Spacer PCR) / Genler Arası 16S-23S rRNA Ayırıcı Bölge PZR (ISR: Intergenic 16S-23SrRNA Spacer Region PCR) bulunan PZR ribotiplendirmeyi kapsamaktadır (Kıran ve ark. 2011). İlave olarak Denatüre Gradiyen Jel Elektroforezi (PCR-DGGE) ve Zamansal Sıcaklık Gradiyent Elektroforezi (PCR-TTGE) yöntemleri de bulunmaktadır (Yerlikaya 2014).

Son yıllarda, matrix-assisted laser desorption/ionization time of-flight mass spectrometry-matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon /iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) yöntemi bakterilerin tür ve cins düzeyinde identifikasyonunda hızlı ve etkili bir yöntem olarak kanıtlanmıştır (Foschi 2017). Yöntem, protenlerin peptit kütle parmak izi analizine dayanan bir tekniktir. Bu sayede bakteri hücrelerinden protein profillerinin çıkarılarak bunların referans alınan bir spektra ile karşılaştırılması ile bakterilerin tanımlaması kolaylıkla yapılmaktadır (Sarıcı 2015).

MALDI-TOF MS yöntemi bakterilerin tür ve cins düzeyinde identifikasyonunda hızlı ve etkili bir yöntem olarak kanıtlanmıştır. Yakın zamanda, MALDI-TOF MS dikkat çekici başarısıyla rutin mikrobiyolojik tanıya tanıtılmıştır. Klinik örneklerden ve gıda ürünlerinden Laktobasillerin tür düzeyinde tanımlanmasında yöntem denenme girişimlerinde bulunulmuştur. MALDI-TOF MS farklı kaynaklardan laktobasillerin hızlı olarak taksonomik karakterizasyonunda basit, güvenilir ve maliyetten tasarruflu yöntem olarak gösterilmektedir. Foschi yaptığı çalışmada, MALDI-TOF yönteminin tür düzeyinde yüksek ayırım gücü ile genotipik analiz yöntemleriyle alınan sonuçlar birbiriyle uyuşma göstermiştir. İlave olarak kıyaslama yapıldığında, 16S rRNA gen sekansının oldukça pahalı olması, zaman ve iş gücü istemesi, rutin identifikasyona

uygunluk göstermemesi ve bazı durumlarda yakın ilişkili türlerde yetersiz ayırım gücü gibi dezavantajları bulunmaktadır (Foschi 2017). Bu gibi ayırım güçlüğü durumlarında elongasyon (uzatma) faktörü, Tu geni, rpoB geni, rpoA geni, DNA rekombinaz geni (RecA) ve pheS geni gibi diğer hedef genlerden faydalanılmaktadır (Yerlikaya 2014).

2.5. Laktobasillerin Güvenilirliği / Probiyotiklerle İlişkili Riskler

Gıda mevzuatının görüşlerine göre, European Food and Feed Cultures Association tarafından faydalı ve teknolojik uygulamalarıyla 84 *Lactobacillus* türü güvenli olarak sertifikalandırılmakta, 36 türün European Food Safety Authority (EFSA) tarafından kalifiye emniyet varsayımları-KEV (qualified presumption of safety-QPS) statüsünü sağladığı belirtilmekte ve 12 tür de U.S. Food and Drug Administration (FDA)'a göre genellikle güvenilir (GRAS) kabul edilmektedir (Salvetti ve ark. 2018).

Hayvan beslemede probiyotik olarak kullanılan mikrobiyal türler ve cinsler genellikle güvenli kabul edilir statüsünde (GRAS) olmasına rağmen, hayvanları, insanları ve çevreyi potansiyel olarak güvenilir olmayan mikroorganizmalardan korumak için önlemler alınmalıdır. Teorik olarak, hayvan beslemede probiyotik kullanımıyla ilişkili riskler aşağıda sıralandığı gibidir (Doron ve Snydman, 2015; FAO/WHO, 2002; Marteau 2001)

- Probiyotikle beslenmiş hayvanlarda infeksiyon (gastrointestinal veya sistemik)
- Probiyotikle beslenmiş hayvanlardan üretilen hayvansal ürünleri tüketenlerde infeksiyon (gastrointestinal veya sistemik)
- Antibiyotik direncinin probiyotiklerden diğer patojen mikroorganizmalara aktarılması
- Hayvan üretim ünitelerinden çevreye infeksiyöz mikroorganizmaların veya zararlı bileşiklerin salınımı
- Hayvan terbiyecisi veya hayvan yemindeki infeksiyon (gastrointestinal veya sistemik)
- Probiyotik işleyicilerindeki deri ve/veya göz ve/veya muköz membran duyarlılaşması
- Duyarlı konakçılarda immun sistemin hiperstimülasyonu

- Probiyotik içeriğindeki mikroorganizmalar tarafından üretilen toksinlere bağlı konakçıda yıkıcı metabolik veya toksik etkiler

Hayvan beslenmesinde probiyotik olarak kullanılması düşünülen mikroorganizmalar yukarıda sıralanan riskler bakımından değerlendirilmelidir. Değerlendirmede olan mikroorganizmalar suş düzeyinde identifiye edilmelidir. Beslemede probiyotik mikrobiyal kaynaklı en ciddi risk bazı probiyotik bakterilerdeki aktarılabilir antibiyotik direnç genleri/determinantları varlığından kaynaklı antibiyotik direnci aktarımıdır. Ayrıca mikroorganizmaların toksin üretmeleri veya konakçıda immun sistemin hiperstimülasyonuna sebep olmaları probiyotik olmaları için uygun bulunmamaktadır (FAO 2016).

Mikroorganizmaların belirli suşları hayvanlarda ve insanlarda herhangi infeksiyonla ilişkide olmamalıdır. Çok nadir vakalarda meydana gelmesine rağmen, bazı Laktobasil türlerinin insanlarda fırsatçı infeksiyonlara sebep olan hastalıklarla ilişkili olduğu ifade edilmektedir. Laktik asit bakterileri endokardit, bakteriyemi, kan dolaşımı infeksiyonları ve lokal infeksiyonlardan izole edilmiştir. Olguların çoğunluğunda, infekte bakterinin konakçı orijinli olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte birkaç durumda da, infeksiyonun probiyotik tüketimi kaynaklı olduğu görülmüştür (Korhonen 2010).

2.5.1. Antimikrobiyal Direnç Gelişimi

Antibiyotik direnci, bir organizmanın normalde duyarlı olduğu bir antibiyotiğin öldürme etkisine karşı koyma kabiliyeti olarak tanımlanmaktadır ve küresel boyutta ilgi konusu haline gelmiştir. Antimikrobiyal direnç yeni bir fenomen değildir. Sebebi ise tüm mikroorganizmaların bazı antibiyotiklere karşı doğal bir dirence sahip olma kapasitesidir. Bununla birlikte antimikrobiyal direncin gelişiminde ve yayılmasındaki hızlı artış endişe verici boyutlardadır (Agyare ve ark. 2018).

Mevcut durumda antibiyotiklere dirençli bakteriler bir yılda tüm dünyada en az 700.000 ölüme sebebiyet vermektedir. 2014 yılında Avrupa'da 27.000 ve ABD'de 23.000 gibi rakamlar görülmüştür. 2050 yılına gelindiğinde eğer direnç gelişimi bugünkü hızıyla devam ederse, yılda 10 milyona varan ölümler görüleceğine inanılmaktadır. Buna ilave olarak 2050 yılı ile beraber dirençli bakterilerin neden

olduğu ölümlerin; kanseri (yılda 8,2 milyon ölüm), diyare sebepli hastalıkları (1,4 milyon), diyabeti (1,5 milyon) ve trafik kazalarını (1,2 milyon) arkasında bırakarak dünya çapında ölüm sebebiyetleri arasında birinci sıraya yerleşeceği işaret edilmektedir (O'Neill 2014).

Kanatlılar üzerinde 1949 yılında bir araştırma yapılmış ve tesadüfi olarak bu canlılarda antibiyotiklerin büyümeyi arttırıcı fonksiyonu olduğunun farkına varılmıştır. Yaşanan gelişme çiftlik hayvanlarında antibiyotiklerden büyüme faktörü olarak yararlanmasına milat teşkil etmiştir. Antibiyotiklerden; bu keşifle birlikte uzun yıllardan bu yana infeksiyonların önlenmesi, verim artışı, gelişimin hızlandırılması ve yemden yararlanmanın arttırılması gibi amaçlarla yem katkı maddesi olarak yararlanılmaktadır. FAO'nun kanatlılar üzerinde hazırladığı raporlar bu canlıların %80'inin yaşamlarının belirli dönemlerinde ve yahut tamamında antibiyotiklere maruz kaldıklarını gözler önüne sermektedir. Büyüme faktörü amaçlı olarak kullanımda etki mekanizmaları tam anlamıyla açıklanmasa dahi üç farklı hipotez ileri sürülmektedir. Bunların, besin maddelerinin emilimini engelleyen toksik metabolizma ürünlerinin üretiminin inhibisyonu, gastrointestinal sistemdeki patojen mikroorganizmaların gelişiminin engellenmesi ve subklinik infeksiyonların azaltılması veya önlenmesi olduğu gösterilmektedir (Sarıcı 2015).

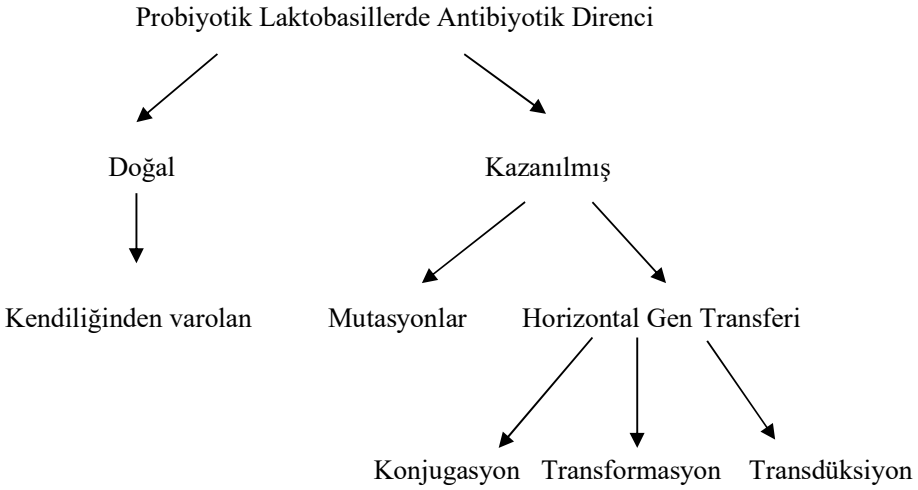
1970'li yılların başlarında Avrupa Birliği, hayvansal yemlerde, tedavi amacıyla kullanımda olan birtakım antibiyotiklerin ruhsatlarını geçici süreyle yürürlükten kaldırma uygulamalarına başlamıştır. Türkiye Avrupa Birliği aday ülkesi olarak Avrupa Birliği'nin almış olduğu büyütme amaçlı kullanım yasaklamalarını uygulayarak, 1997'den itibaren yasaklamaya gitmiştir. Cenevre'de 2000 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nün besi amaçlı yetiştirilen hayvanlarda antibiyotik direncinin önlemesinde evrensel prensipler konulu toplantısı sonrasında önerilen kurallar yayınlanmıştır. Bunlardan birini, besi amacıyla üretilen hayvanlarda antimikrobiyallerin kullanımında ulusalarası kullanım düzeyleri belirlenmesi, veteriner hekimlere yönelik kullanım protokolleri oluşturulması ve mecburi reçetelendirilme kuralı oluşturmaktadır. Avrupa Birliği, 2003 yılında attığı son adımla antibiyotik büyütme faktörlerini (avilamycin, salinomycin sodyum, monensin sodyum, flavophospholipol) 1 Ocak 2006 tarihiyle tamamiyle yasaklamada karar kılmıştır. Türkiye'de büyütme faktörlerinde tümüyle

yasaklamaya ise 21/01/2006 tarihli 26056 sayılı resmi gazete kararıyla geçilmiştir (Yıldız 2014).

Buna rağmen yıllardır karma yemlerde kullanımı yasak olan sistemik etkili antibiyotiklerin bazılarının günümüzde halen yaygın bir biçimde kullanıldığı bilinmektedir. Farklı isimler adı altında ve çoğunlukla ülkeye kaçak yollarla giriş yapan bu antibiyotiklerin gıdalardaki kalıntıları ve hızla artan direnç sorunu göz önüne alınarak denetimlerin sıkı hale getirilerek kullanımlarının tümden engellenmesi mutlak hale gelmiştir (Keskinöz 2010).

Bazı Avrupa ülkelerinde yasaklamalar, hayvanlarda, gıda ürünlerinde ve insanlarda antibiyotik direncinin azalmasına neden olmuştur ancak tam anlamıyla eradikasyon sağlanamamıştır (Garofalo ve ark. 2007).

Bakteriler antibiyotiklere temelde doğal ve kazanılmış olarak adlandırılan iki mekanizma ile Şekil 2-3'te de belirtildiği gibi direnç göstermektedir. Bu mekanizmalar belirli bakteri türleri arasında antibiyotiğin yapısı, bakteri türü, konaktaki hedef bölge, kromozomal mutasyon veya plazmit ilgili oluşuna bağlı olarak etkili olmaktadır. Doğal, kazanılmış ve mutasyonel olarak laktik asit bakterilerinde üç direnç tipi tanımlaması yapılmıştır (Jose ve ark. 2015).



Şekil 2-3: Bakterilerde antibiyotiklere karşı görülen direnç mekanizmaları

Bakterinin antibiyotiğe gösterdiği doğal dirençte 4 farklı mekanizma etkili olmaktadır. Bunlar enzimatik inaktivasyon, bakterinin hedef bölgesindeki değişim, hücre içi metabolik düzenleme ve aktif pompa sistemi ile dış membran geçirgenliğinde değişim olmak üzere ifade edilmektedir (Jose ve ark. 2015).

Kazanılmış direnç ise bakterinin kendi genetik materyalini aynı türden başka bakteriye ya da farklı türden olanlara dahi taşıması yoluyla gerçekleşebilmektedir. Genetik kaynaklı bu direnç, kromozomal yada kromozom dışı etkenler ötürü olabilmektedir. Bakteri kromozomunda spontan mutasyonlarla kromozomal direnç meydana gelirken, ekstrakromozomal direnç farklı yollarla aktarılabilen transpozon, plazmit ve integron olarak adlandırılan genetik elemanların varlığında gerçekleşmektedir (Meral ve ark. 2014).

Bazı istisnalar dışında, intrinsik (doğal) direnç ve mutasyonal direnci aktarma olasılığı düşükken; çoğunlukla taşınabilir genetik elementlerle gerçekleşen yatay gen transferi ile çoğunlukla aktarım gerçekleşmektedir (Ammor ve ark. 2008).

EFSA FEEDAP Paneli (2008)'ne göre hayvanlarda gıda katkısı olarak kullanılacak suşlarda kazanılmış direncin, eğer horizontal aktarılma riski düşük olan kromozomal mutasyon yoluyla kazanıldığı gösterilirse kabul edilebileceği bildirilmiştir (Dec ve ark. 2015).

Günümüzde antibiyotiklere direnç küresel boyutta toplumsal sağlık sorunu haline gelmektedir. Bu sorunun sebeplerinden biri olan antimikrobiyallerin son yıllarda artan kullanımı sadece patojenik değil bunun yanında apatojenik mikrobiotal unsurlarda da antibiyotik direnç gelişimine sebep olmaktadır (Cauwerts ve ark. 2006). Gıda zinciri, antibiyotik direncinin hayvan bakteri populasyonlarından insana aktarımında başlıca yollardan biri sayılmaktadır. Antibiyotik dirençli bakteriler sadece hayvanlarda tehlike oluşturmamakta aynı zamanda gıda zinciriyle insanlarda da problemlere yol açmaktadır. Bu bağlamda, gastrointestinal kommensal bakteriler (LAB) antimikrobiyal direnç genlerini patojen bakterilere aktarmada rezervuar rolü oynamaktadır (Dec ve ark. 2015).

Yaygın olarak probiyotiklerin antibiyotiklere direnç gibi istenmeyen özellikler taşımadığına olan kanıya karşın mikrobiyel genom dizilim çalışmaları sonucu Laktik asit bakterilerinin kromozomlarına entegre olan birçok antibiyotik direnç geni varlığı saptanmıştır (Meral ve ark. 2014). Bu direnç genlerinin zoonotik öneme sahip ajanlara aktarımı söz konusu olduğunda, kanatlılarda dirençli Laktobasillerin varlığının toplumsal sağlık sorunlarına sebebiyet vereceği düşünülmektedir. Ayrıca Laktobasillerde direnç genleri varlığı insan ve kanatlılarda tedaviyi engelleyici bir tehdit oluşturmaktadır (Cauwerts ve ark. 2006).

Laktik asit bakterilerinde direnç gelişiminin görülmesi; yetiştiricilikte büyüme arttırıcı amaçla antibiyotiklerin yaygın kullanımının, LAB'lerinde antibiyotiklere direnç gelişimine izin vermiş olduğunu ortaya koymaktadır. Bu bakterilerde antibiyotik direnci ayrıca, konjugatif transpozonlar aracılığıyla direnç geninin bakteriye yatay olarak aktarılmasıyla da elde edilebilmektedir. Gilchrist ve ark. tarafından bildirildiği gibi; hayvan beslemede terapötik ve büyüme arttırıcı olarak antibiyotik kullanımının denetimindeki yetersizlik, laktik asit bakterilerinde antibiyotik direncine yol açmaktadır. Bu durum bağırsakta antibiyotiğe dirençli bakteri gelişimine katkıda bulunabilmektedir. Buradan; herhangi bir LAB suşunun hayvan beslemesinde yem katkı maddesi olarak seçilmesinden önce antibiyotik direnç varlığı yönünden taramasının gerekli olduğu sonucuna varılmaktadır (Shazali ve ark. 2014).

2.5.2. Laktobasillerde Antibiyotik Duyarlılık Testi Uygulamaları

Laktik asit bakterilerinin antibiyotik duyarlılık profillerinin belirlenmesi amacıyla, dirençli ve duyarlı suşların saptanmasında kullanılan antibiyotiklere ait sınır değerlerinin açık bir biçimde tanımının yapılması gerekmektedir. Doğal ve kazanılmış olan direnç ayrımının yapılması büyük önem taşımaktadır. Bu da farklı kaynaklardan izole edilmiş çok sayıda LAB türünde antimikrobiyallere karşı saptanan direnç örneklerinin kıyaslanmasını gerektirmektedir. Bakterilerde kazanılmış olan ve aktarılma riski bulunan direncin tanımlanmasında antibiyotik sınır değerleri önem taşımaktadır (Demir ve ark. 2018).

Laktik asit bakterilerinde antibiyotik duyarlılık testi; agar disk difüzyon, agar yayma, E-test, agar dilüsyon, broth makro ve mikrodilüsyonun dahil olduğu birçok metodla gerçekleştirilebilir. Genel olarak, dilüsyon metodları inhibisyon zonlarının meydana geldiği E-test ve difüzyon testlerine tercih edilmektedir. Antimikrobiyal maddelerin minimum inhibitör konsantrasyonlarının belirlenmesine olanak sağlayan bu yöntemler verilen direnç profilinin intrinsik ya da kazanılmış olduğuna ilişkin daha güvenilir bulgular sağlamaktadır (Klare ve ark. 2007).

EFSA tarafından öngörülen sınır değerler, sürekli olarak gözden geçirilmesi ve gerektiği durumlarda değiştirilmesi gereken pratik sonuçlara yönelik bir yanıt olarak değerlendirilmektedir (Mayrhofer ve ark. 2010).

Laktobasillerde antibimikrobiyal duyarlılık test prosedürlerinde standart bir yöntem eksikliğine karşın, bu boşluğu kapatmak amaçlı ilk adım olarak LSM besiyeri (laktik asit bakterilerinde duyarlılık test mediumu) standardize method olarak geliştirilmiştir. Bu formülasyon baz alınarak Laktobasillerde antibimikrobiyal duyarlılık testlerinde standart işlem prosedürleri (SOPs) öngörülmesiyle International Organization of Standardization (ISO)/ International Dairy Federation (IDF) standartlarında yerini almıştır (Mayrhofer ve ark. 2014).

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), method tercihinde agar dilüsyon ve broth mikrodilüsyon yöntemlerini standart olarak onaylamıştır. Fenotipik antibiyotik duyarlılık testlerine ilave olarak, dirence sebep olan belirli genlerin genotipik olarak belirlenmesi gereklidir. Fenotipik testlere, spesifik direnç genlerinin saptanması amacıyla farklı PCR temelli metodlar, southern hibridizasyon, plasmid profilleme ve microarray gibi moleküler teknikler günümüzde eşlik etmektedir. Böylelikle genotipik ve fenotipik direnç profilleri uyuşma gösterdiğinde durumun açıklığa kavuşması sağlanmaktadır (Radulović ve ark. 2012).

Laktobasillerde antibiyotiklerin çoğunluğu için saptanan duyarlılık-direnç değerlerinde ortak bir değerlendirme halen bulunmamaktadır. Minimum inhibitör konsantrasyon değerleri üzerinde besiyeri seçiminin oldukça etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, günümüzde kommensal ya da gıdayla ilişkili bakterilerde antimikrobiyal

duyarlılık test sonuçlarının yorumlanmasında kullanılacak bir yönerge de bulunmamaktadır. Ek olarak, minimum inhibitör konsantrasyon değerlerinin tür spesifik olduğu ve bu nedenle aynı cinsteki türler arasında çeşitlendiği gösterilmiştir. İntrinsik, spesifik olmayan ve kazanılmış direnç arasında ayrım yapmak gerekli olmakla birlikte zordur ve genetik bazlı direnç değerlendirilmesinin yanı sıra, farklı kaynaklardan gelen birçok LAB türünün antimikrobiyal direnç modellerinin karşılaştırılmasını gerektirmektedir (Radulović ve ark. 2012).

2.5.3. Laktobasillerde Antibiyotiklere Direnç ve Makrolide-Lincosamide-Streptogramin Direnci

Vankomisin direnci Laktobasillerde en iyi tanımlanmış doğal direnç mekanizmasını oluşturmasının yanı sıra, bu antibiyotiklere yüksek oranda direnç gözlenmektedir. Laktobasillerin bazıları içerisinde bacitracin, cefoxitin, ciprofloxacin, fusidic acid, kanamycin, gentamicin, metronidazole, nitrofurantoin, norfloxacin, streptomycin, sulphadiazine, teicoplanin, trimethoprim/sulphamethoxazole bulunduğu antibiyotiklere yüksek doğal direnç göstermektedir (Gevers 2002). Laktobasiller penisilin ve ampisilin gibi birçok hücre duvarı sentezini hedef seçen antibiyotiklere karşı duyarlı iken, sefalosporinlere daha dirençlidirler (Gueimonde 2013). Nalidixic acid, ciprofloxacin, sulfamethoxazole, trimethoprim gibi nükleik asit sentezi inhibitörlerinin çoğunluğuna dirençli olmakla birlikte bu direnç genellikle intrinsiktir (Petronio 2012). Laktobasillerin bir kısmında nitrofurazon, kanamisin ve streptomisine karşı çok yüksek bir spontan mutasyon sıklığı tespit edilmiştir (Gevers 2002).

Laktobasillerde tetrasiklin direnci türler arasında çok sık gözlemlenir. Bu direncin minumum inhibitör konsantrasyonunun geniş bir aralığa sahip olduğu belirtilmiştir (Meral ve ark. 2014).

Düşük konsantrasyonlarda protein sentezi inhibitörlerinin çoğuna (örneğin kloramfenikol, makrolid, linkosamid, tetrasiklin) duyarlı olmakla beraber aminoglikozidlere yüksek direnç görülmektedir (Gueimonde 2013).

Lactobacillus spp. kursaktaki florada var oluşu, makrolidler gibi bazı antimikrobiyal ajanlar grubunu metabolize etme yeteneklerinden dolayı, bu ajanların emiliminin engellenmesine sebep olmaktadır. Yetişkin tavuktaki bağırsak florası çok sayıda *Lactobacillus spp.* içermekte ve bu mikroorganizmaların makrolid-lincosamid-streptogramin grubu antibiyotikleri metabolize etme kapasitesinin var olmasından dolayı durumun bilincinde olmak önem arz etmektedir. Öte yandan, enterositler sitokrom P-450 enzimleri, özellikle CYP3A bakımından zengindir. Bu sebeple, adı geçen enzimlere substrat oluşturan antimikrobiyal ajanlar (makrolide ve lincosamide) için, birinci seviyede bir metabolizma burada gerçekleşerek biyoyararlanımın azalmasına neden olabilmektedirler (Landoni ve ark. 2015).

Hayvan orijinli bakterilerde MLS direnç gelişimi, bu antibiyotiklerin esas olarak klinik infeksiyonlarda kullanılışıyla muhtemel değildir. Bununla birlikte bazı MLS antibiyotiklerin (tylosin, tilmikosin, linkomisin ve virjinamisin) büyüme arttırıcı ve/veya terapötik olarak hayvan yetiştirmede ve kanatlı sektöründe kullanımı kommensal bakterilerde MLS direnç gelişiminde selektif bir baskı uygulamaktadır. Günümüzde de hayvanlardan, hayvansal ürünlerden, fermente süt ürünlerinden, starter kültürlerden ve hatta doğal fermente yöresel gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinde MLS direnci saptama konusunda gittikçe artan ilgi gözlemlenmektedir (Thumu ve ark. 2012).

Lincosamide grubu antibiyotikler protein sentezinin inhibisyonu yoluyla gram pozitif koklar üzerinde etki göstermektedir. Etki şekli bakımından, dokulara diffüze olarak kemik ve eklem infeksiyonlarının tedavisinde kullanılmakta ve ayrıca nekrotik enteritisin sağaltımında da etkili olmaktadır. Makrolide grubu antibiyotikler de protein sentezinin inhibisyonu yoluyla gram pozitif bakteriler üzerinde etki göstermektedir. Mycoplasma infeksiyonlarının tedavisinde oldukça faydalanılmaktadır. Streptogramin grubu antibiyotikler ise hücre duvarı ve protein sentezinin inhibisyonu yoluyla anaerob bakterilere karşı etkili olmaktadır. Virjinamisin bu antibiyotik sınıfına aittir ve büyümeyi teşvik edici konsantrasyonlarda yemle yaygın olarak kullanılmıştır (Sanchez ve ark. 2015).

Linkomisin, Penisilin G'ye dirençli organizmaların ve anaerobların sebep olduğu infeksiyonların tedavisi için veya büyümeyi teşvik edici amaçlı kanatlılarda kullanılan bir lincosamide antibiyotiktir. (Al-Mustafa ve ark. 2001).

Eritromisin kanatlılarda *Staphylococcus aureus* artritlerinin tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Tylosin yumurtacı tavuklarda *Mycoplasma* infeksiyonlarını tedavi ederek, yumurta üretimini iyileştiren, transovaryal bulaşmayı düşüren ve klinik bulguları azaltan en etkili antimikrobiyallerden biridir. Kanatlı hayvan sürülerinde klinik ve subklinik nekrotik enteritis tylosin ile başarılı bir biçimde tedavi edilebilmektedir (Hofacre ve ark. 2013).

Tylosin kullanımı sadece gıda üreten hayvanlarda görülürken, aynı makrolide-lincosamide-streptogramin grubundan ilaç olan eritromisin hem insanlarda hem de gıda üreten hayvanlarda kullanımdadır. Tylosin ve eritromisin, insanlarda infeksiyonların tedavisinde rol oynayan arasında klindamisin gibi ilaçların bulunduğu yine MLS grubunda bulunan tüm ilaçlara çapraz direnç göstermektedir (Chen ve ark. 2008).

Farklı sınıfa ait antibiyotikler aynı hedef bölgesini paylaştıklarında, bölge direnç geninin ürünü tarafından değiştirilir ve yapısal olarak alakasız antibiyotikler arasında çapraz direnç gözlenir. Örnek olarak erm genleri tarafından MLS kombine direnci gösterilebilir (Mathur ve ark. 2005).

MLS antibiyotiklere dirençte birçok mekanizma tanımlaması yapılmıştır. Esas etki şekilleri olarak; antibiyotiğin hedef bölgesinin değiştirilmesi, bakteriyel hücreden antibiyotiğin dışarı çıkışı ve antibiyotiğin enzimatik inaktivasyonu gösterilebilmektedir. Hedef bölgedeki değişim sonucu ortaya çıkan MLS direnci 23S rRNA genindeki mutasyondan orijin almakta veya erytromycin-resistant-methylase (erm) genleri tarafından kodlanmaktadır. Erm genleri, 23S rRNA'yı dimetile eden adenin-N6-metiltransferazları kodlar (Cauwerts ve ark. 2006).

Birkaç istisna dışında hayvanlardan orijin alan eritromisin dirençli gram pozitif bakterilerde en sıklıkla saptanan erm geninin erm (B) olduğu ve bu bakterilerde erm (A) ve erm (C) genlerine daha az rastlandığı bildirilmiştir. Bunun yanında erm (B), transfer edilebilirliğinin önemi ile karakterize Tn916-Tn1545 ailesinin üyesi Tn916 konjugatif transpozonla ilişkilendirilirken, erm (A) kromozom üzerinde erm (C) ise küçük plazmitler üzerinde lokalize olmaktadır (Aquilanti ve ark. 2007).

Şimdiye kadar bulunan sayısı 33 kadar olan erm genleri, MLS antibiyotiklerinin örtüşen hedefi olan 50S ribozomal alt ünitesindeki bağlanma bölgesini metilleyen bir rRNA metilaz'ı kodlamaktadır. MLS_B direnci laktobasillerde genellikle erm (B) genleri varlığıyla daha seyrek olarak da erm (C), erm (G) ve erm (T) ile ilişkilendirilmiştir (Egervärn ve ark. 2009).

Ammor ve ark tarafından yapılan derlemede laktik asit bakterilerinde taşınabilir genler bakımından en sıklıkla bulunan iki direnç geni olarak tet (M) (tetrasikline dirençten sorumlu gen) ve erm (B) (eritromisine dirençten sorumlu gen) tespit edilmiştir. Bu direnç sırasını cat adlı kloramfenikole dirençten sorumlu genler takip etmektedir (Jose ve ark.2015).

Halk sağlığı açısından kommensal bakterilerin bağırsakta bulunan diğer bakterilerle etkileşime girip, taşınabilir antibiyotiğe direnç genlerini aktarabilmeleri sonucu bu genler kolaylıkla kaybolmamakta ve genomun bir parçası haline gelmektedir. Laktobasiller için aktarılabilir direnç genlerini taşımaları güvenlik açısından risk taşımaktadır (Meral ve ark. 2014).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.2. Örnekler

İstanbul ilinin çeşitli ilçeleri (Avcılar, Çatalca, Arnavutköy, Silivri), Tekirdağ (Marmara Ereğlisi), Balıkesir (Erdek) ve Bursa (Mustafa Kemal Paşa) olmak üzere toplamda 12 farklı kaynaktan 60 adet (20 adet halk elinde beslenen-20 adet yumurtacı-20 adet broiler) kloakal sürüntü numunesi, çeşitli *Lactobacillus* türlerinin izolasyonu ve dağılımlarının belirlenmesi amacıyla Eylül 2018 – Kasım 2018 tarihleri arasında tesadüfi örnekleme ile klinik olarak sağlıklı hayvanlardan alındı. Alınan örnekler buz aküleriyle en kısa sürede İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına ulaştırıldı. Kloakal sürüntü örneği alınan hayvanlara ait ve çiftliğin konumuna ilişkin bilgiler not edilerek numune bilgi formları oluşturuldu.

Tablo 3-1: Farklı yetiştirme şekillerinden örneklerin toplandığı çiftliklerin lokasyonu ve tavuğa ait bilgiler

	Örnekler	Alındığı Yer	Tarih	Yaş
Yetiştirme Şekli-Halk elinde beslenen	1-a	Avcılar/İstanbul	19.09.2018	>24 ay
	1-b			
	2-a	Avcılar/İstanbul	19.09.2018	>24 ay
	2-c			
	3-a	Avcılar/İstanbul	19.09.2018	>24 ay
	3-b			
	3-c			
	4-a	Avcılar/İstanbul	19.09.2018	>24 ay
	4-c			
	4-d			

Yetiştirme Şekli-Halk elinde beslenen	5-a	Avcılar/İstanbul	19.09.2018	>24 ay
	5-b			
	5-c			
	6-a	Çatalca 1/İstanbul	28.09.2018	>24 ay
	7-a	Çatalca 1/İstanbul	28.09.2018	>24 ay
	7-b			
	7-c			
	8-a	Çatalca 1/İstanbul	28.09.2018	>24 ay
	8-b			
	8-c			
	9-b	Çatalca 1/İstanbul	28.09.2018	>24 ay
	9-c			
	9-d			
	10-a	Çatalca 1/İstanbul	28.09.2018	>24 ay
	10-c			
	11-a	Çatalca 2 /İstanbul	28.09.2018	>24 ay
	11-d			
	12-a	Çatalca 2/İstanbul	28.09.2018	>24 ay
	12-b			
	12-c			
	13-a	Çatalca 2/İstanbul	28.09.2018	>24 ay
	13-b			
	14-a	Çatalca 2/İstanbul	28.09.2018	>24 ay
	14-b			
	15-a	Çatalca 2/İstanbul	28.09.2018	>24 ay
	15-b	Çatalca 2/İstanbul	28.09.2018	>24 ay

Yetiştirme Şekli-Halk elinde beslenen	16-b 16-c	Arnavutköy/İstanbul	6.10.2018	>24 ay
	17-a 17-d 17-e	Arnavutköy /İstanbul	6.10.2018	>24 ay
	18-b 18-c	Arnavutköy /İstanbul	6.10.2018	>24 ay
	19-b 19-c	Arnavutköy /İstanbul	6.10.2018	>24 ay
	20-a 20-b 20-c	Arnavutköy /İstanbul	6.10.2018	>24 ay

Yetiştirme Şekli-Broiler	1-a 1-b 1-c 1-e	Erdek 1/Balıkesir	14.10.2018	43 günlük
	2-a 2-b 2-d	Erdek 1/Balıkesir	14.10.2018	43 günlük
	3-a 3-c 3-d 3-e	Erdek 1/Balıkesir	14.10.2018	43 günlük
	4-a 4-c	Erdek 1/Balıkesir	14.10.2018	43 günlük

Yetiştirme Şekli-Broiler	5-a	Erdek 1/Balıkesir	14.10.2018	43 günlük
	5-b			
	5-c			
	6-a	M.Kemal Paşa 1/Bursa	14.10.2018	36 günlük
	6-b			
	6-c			
	7-a	M.Kemal Paşa 1/Bursa	14.10.2018	36 günlük
	7-b			
	7-c			
	7-d			
	8-a	M.Kemal Paşa 1/Bursa	14.10.2018	36 günlük
	8-b			
	8-c			
	8-d			
	8-e			
	9-c	M.Kemal Paşa 1/Bursa	14.10.2018	36 günlük
	9-d			
	9-e			
	10-a	M.Kemal Paşa 1/Bursa	14.10.2018	36 günlük
	10-b			
	10-c			
	11-a	Erdek 2/Balıkesir	16.11.2018	42 günlük
	11-c			
	11-e			
	12-b	Erdek 2 /Balıkesir	16.11.2018	42 günlük
	12-d			
	12-e			

Yetiştirme Şekli-Broiler	13-a	Erdek 2 /Balıkesir	16.11.2018	42 günlük
	13-b			
	13-c			
	13-f			
	14-a	Erdek 2 /Balıkesir	16.11.2018	42 günlük
	14-b			
	14-c			
	14-d			
	15-c	Erdek 2 /Balıkesir	16.11.2018	42 günlük
	15-d			
	15-f			
	16-a	M.Kemal Paşa 2 /Bursa	16.11.2018	35 günlük
	16-d			
	16-f			
	17-d	M.Kemal Paşa 2 /Bursa	16.11.2018	35 günlük
	17-f			
	18-a	M.Kemal Paşa 2 /Bursa	16.11.2018	35 günlük
	18-b			
	18-c			
	18-d			
	19-a	M.Kemal Paşa 2 /Bursa	16.11.2018	35 günlük
	19-b			
	19-d			
	19-e			
	19-f			
	20-b	M.Kemal Paşa 2 /Bursa	16.11.2018	35 günlük
	20-c			
	20-d			
	20-e			

Yetiştirme Şekli-Yumurtacı	1-d	Marmaraereğlisi/Tekirdağ	20.10.2018	25 hafta
	1-e			
	2-a	Marmaraereğlisi/Tekirdağ	20.10.2018	25 hafta
	2-b			
	2-e			
	3-a	Marmaraereğlisi/Tekirdağ	20.10.2018	25 hafta
	3-b			
	3-c			
	4-b	Marmaraereğlisi/Tekirdağ	20.10.2018	25 hafta
	4-c			
	4-d			
	5-a	Marmaraereğlisi/Tekirdağ	20.10.2018	25 hafta
	5-d			
	6-a	Silivri1(Ortaköy)/İstanbul	25.10.2018	26 hafta
	6-b			
	6-c			
	7-a	Silivri1(Ortaköy)/İstanbul	25.10.2018	26 hafta
	7-c			
	7-d			
	7-e			
	8-a	Silivri1(Ortaköy)/İstanbul	25.10.2018	26 hafta
	8-d			
	9-b	Silivri1(Ortaköy)/İstanbul	25.10.2018	26 hafta
	9-c			
	9-e			
	9-f			
	10-c	Silivri1(Ortaköy)/İstanbul	25.10.2018	26 hafta
	10-f			

Yetiştirme Şekli-Yumurtacı	11-a 11-b 11-d 11-e	Silivri 2 (Büyükkılıçlı A)/ İstanbul	3.11.2018	25 hafta
	12-a 12-d 12-e	Silivri 2 (Büyükkılıçlı A)/ İstanbul	3.11.2018	25 hafta
	13-e	Silivri 2 (Büyükkılıçlı A)/ İstanbul	3.11.2018	25 hafta
	14-a 14-b 14-c 14-e 14-f	Silivri 2 (Büyükkılıçlı A) / İstanbul	3.11.2018	25 hafta
	15	Silivri 2 (Büyükkılıçlı B)/ İstanbul	3.11.2018	25 hafta
	16	Silivri 2 (Büyükkılıçlı B) / İstanbul	10.11.2018	26 hafta
	17-a 17-b 17-d 17-e 17-f	Silivri 2 (Büyükkılıçlı B)/ İstanbul	10.11.2018	26 hafta
	18-a 18-b 18-f	Silivri 2 (Büyükkılıçlı B) / İstanbul	10.11.2018	26 hafta
	19-a 19-b 19-c	Silivri 2 (Büyükkılıçlı B)/ İstanbul	10.11.2018	26 hafta
	20-a 20-c 20-e	Silivri 2 (Büyükkılıçlı B)/ İstanbul	10.11.2018	26 hafta

3.2.1. Besiyerleri

3.2.1.1. MRS agar (de MAN, ROGOSA and SHARPE)

MRS agar (Merck, 1.10660.0500)	68,2 gr
Distile su	1000ml

121°de 15 dakika süreyle sterilize edildi. Yaklaşık 50°ye soğutulduktan sonra 25 ml petri kutularına dağıtıldı ve kullanılana kadar 4°de saklandı.

3.2.1.2. MRS broth (de MAN, ROGOSA and SHARPE)

MRS broth (Merck, 1.10661.0500)	52,2 gr
Distile su	1000ml

Belirtilen oranda hazırlandıktan sonra 4'er ml cam tüplere dağıtıldı ve 121℃ de 15 dakika süreyle sterilize edildi. Kullanılana kadar 4℃'de saklandı.

3.2.1.3. Iso-Sensitest broth

Iso-Sensitest broth (Oxoid, CM0473)	23.4gr
Distile su	1000ml

Antibiyotiklere duyarlılık testinde kullanılmak üzere besiyerinde %90 olacak şekilde hazırlandı ve 121°C de 15 dakika süreyle sterilize edildi. Kullanılana kadar 4°C'de saklandı.

3.2.1.4. Biyokimyasal Test ve Ayıraçlar

- Gram Boyama Seti (Norateks-106092)
- Katalaz Testi, Hidrojen peroksit (H_2O_2, Sigma, H3410)
- Lysozyme (Roche/ 10 837 059 001)

3.2.2. Antibiyotikler

İzolatlardan MİK değerlerini belirlemek amacıyla eritromisin (Sigma-Aldrich, E1300000), klindamisin **(**Sigma-Aldrich, C2250000), linkomisin **(**Sigma-Aldrich, L0650000), tylosin (Sigma-Aldrich, T2880000), virjinamisin M_1 (Sigma-Aldrich, V2753) ve virjinamisin S_1 (Sigma-Aldrich, V4140) toz antibiyotikleri kullanıldı.

3.2.3. Standart Suşlar

Sıvı mikrodilüsyon testinin değerlendiririlmesinde pozitif kontrol olarak *Enterococcus faecalis 29212* suşu kullanılırken, genotipik olarak direnç genlerinin belirlenmesinde ise Prof.Dr. Bülent Bozdoğan'dan erm (A), erm (B) ve erm (C) direnç genlerini taşıyan DNA'lar temin edildi.

3.2.4. Diğer gereçler

- Anaerobik jar (Oxoid HP0011)
- Anaerogen (Thermo Scientific 3,5 l /AN0035A)
- Araştırma mikroskobu (Olympus CH30)
- H_2O_2 (Sigma, H3410, katalaz testi)
- UltrafleXtreme MALDI TOF mass spectrometer (Bruker, Germany)

3.2.5. Polimerase Chain Reaction (PCR)

3.2.5.1. Ekstraksiyon

Genomik DNA'nın ekstraksiyonunda DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen-Hilden, Germany/69506) kullanıldı.

3.2.5.2. Amplifikasyon

Amplifikasyon için DF-Pfu DNA Polymerase (Bioron/108105) kit kullanıldı. Kit kullanılıncaya kadar -20'de muhafaza edildi.

- 2×500 U Pfu DNA Polymerase (5U/µl)
- 10X PCR Buffer

  1,8 ml Incomplete (200 mM Tris-HCl (pH 8.8), 100 mM KCl, 100 mM (NH4)2SO4, 1.0 % Triton X-100, 1 mg/mL nuclease-free BSA)

1,8 Complete (200 mM Tris-HCl (pH 8.8), 100 mM KCl, 100 mM (NH4)2SO4, 20 mM MgSO4, 1.0 % Triton X-100, 1 mg/ml nuclease-free BSA)

- 10mM Dntp Mix (Biomatik- 0,5 ml/A2446)
- 100 mM$MgSO_4$ (Bioron- 1 ml/108105)
- DNase/ RNase'dan arındırılmış steril distile su (Thermo Scientific, 10977035)
- Primerler

3.2.5.3. DNA Elektroforezi

- Agarose (Prona Biomax Agarose 100 g- IB70073)
- DNA marker (Thermo Scientific, SM0241)

  100-1000 bp
- Ethidium Bromide (Sigma, E1510)

  3,8 Diamino-1-ethyl-6-phenylphenantridinium bromide
- TAE Buffer (Wisent Bioproducts/ 880-540-CL)
- 6X loading dye (Thermo Scientific, R0611)

  10mM Tris-HCl

  %0,03bromophenol blue

  %0,03xylene cyanol FF

  %60 glycerol

  60mM EDTA

3.2.5.4. Diğer Gereçler

- Agaroz jel elektroforez aparatı (Agagel Mini-Wide)
- Biyogüvenlik Kabineti (Heal Force)
- Digital Dry Bath (Labnet)
- DNase, RNase free filtreli pipet uçları (Eppendorf)

- Etüv (Aerob, Nüve)
- Güç kaynağı (Biometra- Power pack P25)
- Hassas terazi (BEL)
- Mikrodalga ısıtıcı (Vestel)
- Mikrosantrifüj (Hettich)
- Otoklav (Temiz için,Nüve)
- Otoklav (Kirli için, ALP)
- Öze (İğne ve halka uçlu)
- Pipetler (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl otomatik pipetler, Eppendorf)
- Thermal cycler (Axygen Maxygen)
- UV Transilluminator-Jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat 09 200886)
- Vorteks (Biosan)
- 0,2 ml ince çeperli, 0,5 ml ve 1,5 ml DNase, RNase free mikrosantrifüj tüpleri (Axygen)

3.3. Yöntem

3.3.1. İzolasyon

Kloakal sürüntü örnekleri direkt MRS broth'a aktarıldı. Anaerobik ortamda 37℃'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkubasyon süresi sonunda bir öze dolusu alınarak MRS agara ekim yapıldı. Anaerobik ortamda 37℃'de 48 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon süresi sonunda besiyerinde oluşan koloniler öncelikle koloni morfolojisi açısından değerlendirilerek, farklı görünüme sahip koloniler saf kültür elde edilinceye değin MRS agara pasajlandı. Ardından kolonilerin Gram özellikleri belirlendi ve katalaz testi yapıldı (Ahn ve ark. 2002).

Katalaz testi için bir damla %3'lük H_2O_2 solüsyonu lama damlatıldı ve üzerine şüpheli kolonilerden konuldu. Gaz kabarcıklarının oluşumu yönünden kontrol edildi. Birkaç saniye içerisinde kabarcık görülmemesi negatif reaksiyon olarak değerlendirildi.

Gram pozitif, koktan kokoide değişen morfolojiye sahip, katalaz negatif koloniler *Lactobacillus spp.* şüpheli olarak kabul edildi. Elde edilen izolatlar Maldi-Tof ile identifikasyon, MİK değerleri ve moleküler yönden direnç genleri araştırılıncaya kadar -20℃'de %20 gliserol içeren MRS brothda dondurularak saklandı.

3.3.2. İdentifikasyon

Şüpheli izolatların identifikasyonu 1000 Hz Nd-YAG lazer (neodymiumdopedyttrium aluminium garnet) ekipmanlı UltrafleXtreme MALDI TOF mass spectrometer (Bruker, Germany) ile gerçekleştirildi.

MRS agarda üremiş tek bir koloni MTP AnchorChip™ T F stainlesssteel MALDI target plate-paslanmaz çelik numune plakasında (Bruker, Germany) bulunan noktaya aktarıldı. Ardından bakteri örneği ilk olarak 1 µL %70 formik asitle (Sigma-Aldrich) ve sonrasında % 50 acetonitrile (Sigma-Aldrich) ve % 2.5 TFA (trifluoro-acetic acid, Sigma-Aldrich) ile çözdürülmüş 10 mg/mL HCCA (a-cyano-4-hydroxycinnamic acid, Sigma-Aldrich) içeren 1 µL matriks solüsyonu ile muamele edildi ve kurumaya bırakıldı (Dec ve ark. 2016).

Yorumlamada; cihazın saptadığı puanın ≥ 2.000 (log score) olması identifikasyonun tür düzeyinde, ≥ 1.700 olması ise identifikasyonun cins düzeyinde gerçekleştiğini gösterirken; 1.700 altındaki herhangi puan elde edilen spektrumun herhangi bir veritabanı girişi ile anlamlı benzerliği olmadığı anlamına gelmektedir. Kesin olmayan sonuçların elde edilmesi durumunda testin tekrar edilmesi gerektiği belirtilmektedir (Anderson ve ark. 2014).

3.3.3. İzolatların Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemiyle Eritromisin, Klindamisin, Linkomisin, Tylosin ve Virjinamisin MİK Değerlerinin Belirlenmesi

Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle MİK değerlerinin belirlenmesi International Organization of Standardization (ISO)/ International Dairy Federation (IDF) kriterleri doğrultusunda yapıldı (ISO 10932/ IDF 223, 2010).

- İçeriğinde % 10 MRS broth ve % 90 ISO Sensitest broth bulunan LSM besiyeri hazırlandı.
- Eritromisin, Klindamisin, Tylosin, Linkomisin, Virjinamisin aktif maddeleri daha önceden yapılan araştırmalar göz önünde bulundurularak, sırasıyla konsantrasyonu 0,015-256 µg/ml, 0.015-256 µg/ml, 0.03-512 µg/ml, 0,06-1024 µg/ml ve 0,12-128 µg/ml olacak şekilde LSM içinde sulandırıldı.
- U tabanlı 96 kuyucuklu mikroplakaya antibiyotik ile sulandırması yapılan besiyerinden sulandırma oranına göre her kuyucuğa 50 µl miktarında dağıtıldı.
- LSM'de 24 saat süreyle üreyen bakterilerden McFarland standart 1 veya 625 nm'de optik yoğunluk (ortalama $3x10^8$ cfu/ml) yoğunluğunda bakteri süspansiyonu hazırlandı.
- Bakteri süspansiyonunun 1:500 oranında LSM brothla dilüsyonuyla elde edilmiş dilüe inokulumdan 50 µl her kuyucuğa eklendi. Bu şekilde bir kuyucukta toplam 100 µl sıvı oluşturuldu.
- Mikroplaka sırasının son kuyucuğuna sadece besiyeri konularak besiyeri kontrol kuyucuğu oluşturuldu. Sondan bir önceki kuyucuğa ise antibiyotik ilave edilmeyip, besiyeri ve bakteri konularak üreme kontrol kuyucuğu oluşturuldu.
- Mikroplakanın kapağınınkapatılmasının ardından 37℃' de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Üremenin gözlenmediği en düşük antimikrobiyal ilaç konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlendi.

Laktobasillerde antibiyotiklere duyarlılığın belirlenmesinde eşik (breakpoint) değerleri EUCAST (Antibiyotik Duyarlılık Testleri Avrupa Komitesi) yönetmeliğinde rapor edilmediğinden ve CLSI M-45 (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü) tarafından belirtilen yöntem tüm *Lactobacillus* türlerinin gelişimi için gerekliliklere adapte olmadığından; sonuçların yorumlanmasında, EFSA (2012), Dec ve ark. (2015), Dec ve ark. (2017) ve Ammor ve ark. (2007) referanslarında belirttikleri epidemiyolojik

ayırım (cut-off / ECOFF) değerleri baz alındı ve suşların antibiyotiğe ait MİK değeri ilgili ECOFF değerinden yüksek olması durumunda dirençli olarak kabul edildi. Eritromisin ve klindamisin direnç bulgularının yorumlanmasında FEEDAP (EFSA, 2012)'da eşik (breakpoint) değerleri mevcut bulunmaktadır. Virjinamisin eşik değeri belirlenmesinde analoğu olan kinopristin/dalfopristin için FEEDAP Panel Raporu baz alındı (Ammor ve ark. 2007). Linkomisin ve tylosin için MİK değerinin belirlenmesinde bimodal dağılım temel alınmıştır (Dec ve ark. 2015); (Dec ve ark. (2017). EFSA tarafından ECOFF değerleri *Lactobacillus casei* / *L. paracasei*, *Lactobacillus plantarum* / *L. pentosus* ve *Lactobacillus rhamnosus, L. acidophilus grubu ve L. reuteri* türleri için belirlenmiş olup, *Lactobacillus* cinsinin diğer türleri için EFSA metabolik fermentasyon kategorilerine (obligate heterofermentative, obligate homofermentative ve fakültatif heterofermentative) göre yönlendirme yapmaktadır. Fenotipik bulgulara referanslar ve EFSA değerleri değerlendirilerek ulaşılmıştır.

3.3.4. İzolatların Makrolide-Lincosamide-Streptogramin Antibiyotiklere Dirençten Sorumlu Erm Genlerinin Genotipik Yöntemle Belirlenmesi

Öncesinde fenotipik yöntemle duyarlılığı test edilen izolatların MLS antibiyotiklere direncinden sorumlu erm genlerinin araştırılması amacıyla klasik PCR yönteminden faydalanıldı. MLS antibiyotiklerine karşı dirençliliğe ait hedef gen bölgelerinden; erm (A), erm (B) ve erm (C)'nin varlığı araştırıldı (Cauwerts ve ark. 2006). Bu sebeple tüm izolatlardan genomik DNA'nın ekstraksiyonun ardından sırayla amplifikasyon, jel elektroforez ve görüntüleme işlemleri gerçekleştirildi.

3.3.4.1. DNA Ekstraksiyonu

DNA'nın ekstraksiyonu; DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen-Hilden, Germany/69506) içerisinde gram pozitif bakteriler için belirtilmiş protokolle, üretici firmanın belirttiği doğrultuda ve birkaç modifikasyonla gerçekleştirildi. Buna göre;

- Gram pozitif bakterilerinin ön muamelesi için gerekli olan enzimatik lizis solüsyonu belirtilen miktarlarla;
  20 mM Tris·Cl,
  pH 8.0 2 mM sodium EDTA
  1.2% Triton® X-100

ve kullanımdan hemen önce 20 mg/ml lizozim eklenerek hazırlandı.

- 24 sa önceden MRS broth besiyerinde inkubasyona bırakılan kültürler (maksimum 2×10^9 bakteri içeren) 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- 10 dakika süreyle 7500 rpm'de santrifüj edildi, daha sonra süpernatant atıldı.
- 180 µl önceden hazırlanmış olan enzimatik lizis solüsyonuyla bakteriyel pellet sulandırıldı.
- 37°C'de en az 30 dakika boyunca inkübe edildi.
- 25 µl proteinaz K ve ardından 200 µl AL solüsyonu eklendi ve vortekslenerek güzelce homojenize edildi.
- 56°C'de 30 dakika süreyle inkubasyona bırakıldı.
- Ardından 200 µl etanol (%96-100) eklendi ve homojen olana değin vortekslendi.
- Lizat pipetlenerek kolon tüpüne (2 ml) aktarıldı ve 1 dakika boyunca 8000 rpm'de santrifüj edildi. Sonrasında toplama tüpü atıldı ve yenisi ile değiştirildi.
- 500 µl AW I yıkama solüsyonu eklendi ve 1 dk 8000 rpm'de santrifüj edildi. . Sonrasında toplama tüpü atıldı ve yenisi ile değiştirildi.
- 500 µl AW II yıkama solüsyonu eklendi ve 3 dk 14000 rpm'de santrifüj edildi. Sonrasında toplama tüpü atıldı ve yerine 1,5ml'lik mikrosantrifüj tüpü ile değiştirildi.
- 70 µl AE solüsyonu kolon tüpüne direk pipetlendi ve 5 dakika oda ısısında beklendi.
- 3 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi.
- Kolon atılarak ekstrakte DNA elde edildi.

Ekstrakte edilmiş olan örneklerin tesadüfi olarak seçilmiş %10'unun, sahip oldukları nükleik asit saflığının belirlenmesi amacıyla NanoDrop 1000 Spektrofotometre (ThermoScientific) kullanılarak DNA/RNA oranları ve ng cinsinde DNA miktarları ölçümü yapıldı.

Amplifikasyon aşamasına kadar elde edilmiş olan ekstraktlar -20°C'de saklandı.

3.3.4.2. DNA Amplifikasyonu

Ekstraksiyon sonucu elde edilmiş genomik DNA'larda hedef gen bölgelerinin saptanmasına yönelik amplifikasyon gerçekleştirildi. Araştırmada hedef gen bölgelerine ait olan primerler ve amplikonların büyüklükleri Tablo 3-2'de verilmiştir.

Tablo 3-2: Çalışmada kullanılan primerler, hedef bölgeleri ve bant uzunlukları

Hedef gen	Primer Dizileri (5′–3′)	Amplikon Büyüklüğü (bp)	Kaynak
Erm (A)	Fw 5'- TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA-3'	645	Sutcliffe ve ark., 1996
	Rv 5'- CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT-3'		
Erm (B)	Fw 5'- TGG TAT TCC AAA TGC GTA ATG-3'	745	Dec ve ark., 2017
	Rv 5'- CTG TGG TAT GGC GGG TAA GT-3'		
Erm (C)	Fw 5'- AAT CGT CAA TTC CTG CAT GT-3'	299	Klare ve ark., 2007
	Rv 5'- TAATCGTGGAATACGGGTTTG-3'		

Primerler TE Buffer kullanılarak üretici firmanın belirttiği biçimde, stok solüsyon 100 µM konsantrasyonda olacak şekilde hazırlandı. Primerlerin stok solüsyonları kullanılıncaya değin -20°C de muhafaza edildi. PCR gerçekleştirilmeden önce stok sulandırılarak, son konsantrasyonu 10 µM halinde elde edilip çalışma solüsyonu olarak hazırlanmış oldu ve PCR karışımında da bu solüsyon kullanıldı. Erm (A), erm (B) ve erm (C) hedef gen bölgelerinin araştırılmasına yönelik gerçekleştirilen amplifikasyonda standart ve ortak bir PCR karışımı hazırlandı.

Örneklerin herbiri için toplam final volümü 25 µl olan PCR karışımının içeriği:

1X PCR buffer	2,5 µl
$MgCl_2$	0,25 µl
dNTP mix	0,75 µl
Forward primer	0,75 µl
Reverse primer	0,75 µl
DF-Pfu polimeraz	0,2 µl
DNase free su	17,8 µl
Template DNA	2 µl

Erm (A) için 94℃ ’de 2 dk ön denatürasyon yapıldı. Ön denatürasyonu ardından 35 siklus 94℃ ’de 10 sn denatürasyon, 50℃ ’de 30 sn primerlerin bağlanması, 72℃ ’de 2 dk zincir uzaması olarak PCR optimizasyonu gerçekleştirildi. Sentezin son aşaması ise 72℃’de 10 dk olarak çalışıldı. Agaroz jelde yürütme işlemine değin amplikonlar +4°C de bekletildi (Sutcliffe ve ark. 1996).

Erm (B) için 94℃ ’de 2 dk ön denatürasyon yapıldı. Ön denatürasyonu ardından 35 siklus 94℃ ’de 10 sn denatürasyon, 60℃ ’de 30 sn primerlerin bağlanması, 72℃ ’de 2 dk zincir uzaması olarak PCR optimizasyonu gerçekleştirildi. Sentezin son aşaması ise 72℃’de 10 dk olarak çalışıldı. Agaroz jelde yürütme işlemine değin amplikonlar +4°C de bekletildi (Dec ve ark. 2017).

Erm (C) için 94℃ ’de 2 dk ön denatürasyon yapıldı. Ön denatürasyonu ardından 35 siklus 94℃ ’de 10 sn denatürasyon, 56℃ ’de 30 sn primerlerin bağlanması, 72℃ ’de 2 dk zincir uzaması olarak PCR optimizasyonu gerçekleştirildi. Sentezin son aşaması ise 72℃’de 10 dk olarak çalışıldı. Agaroz jelde yürütme işlemine değin amplikonlar +4°C de bekletildi (Klare ve ark. 2007).

3.3.4.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Amplifikasyondan sonra elde edilen PCR ürünlerine agaroz jel elektroforezi uygulandı. Agaroz jel %1'lik (100 ml 1X TAE Buffer, 1g agarose, 10 µl ethidium bromid) olacak şekilde hazırlandı. Jelin ilk kuyucuğuna marker DNA (1 µl 6X yükleme solüsyonu ve 5 µl DNA marker), ikinci kuyucuğa pozitif kontrol ve sonraki kuyucuklardan itibaren örneklere ait PCR ürünleri (10 µl amplikon + 2 µl 6X yükleme solüsyonu) ve negatif kontrol yüklendi. DNA bantlarının büyüklüğü ise 100 bp DNA marker ile karşılaştırma yapılarak belirlendi. Elektroforez sonrası jel tanktan alınarak UV transmilatör aracılığıyla görüntülendi (Green ve Sambrook, 2012).

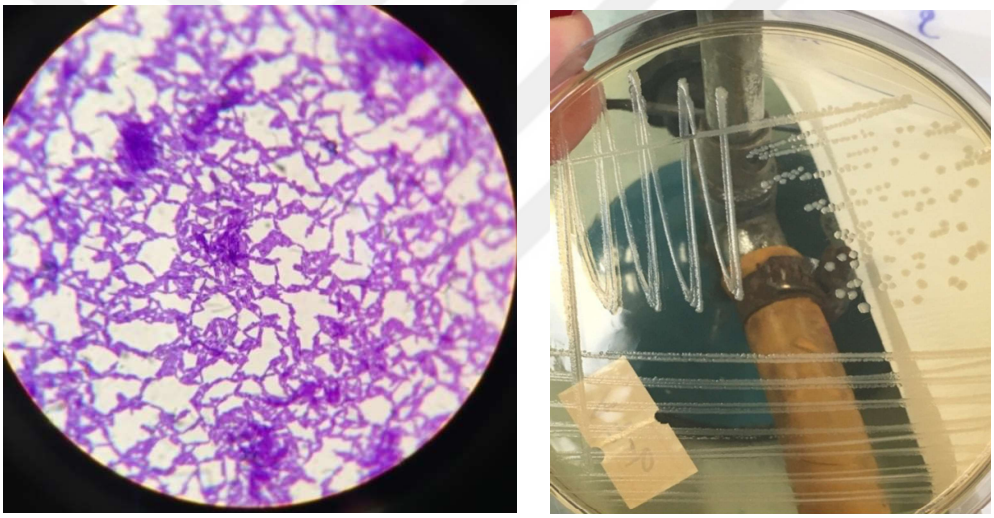
3.3.5. İstatiksel Analiz

Farklı Laktobasil türü izolat sayısı bakımından ve test edilen antibiyotikler ile seçili genlerin yetiştiricilik şekillerine göre karşılaştırılması amacıyla Khi-Kare (x^2) testi uygulandı (Kutsal ve ark 1990). İstatistiksel analizler, IBM SPSS Statistics for Windows (Version 25.0) programı kullanılarak gerçekleştirildi (IBM SPSS, 2017).

4. BULGULAR

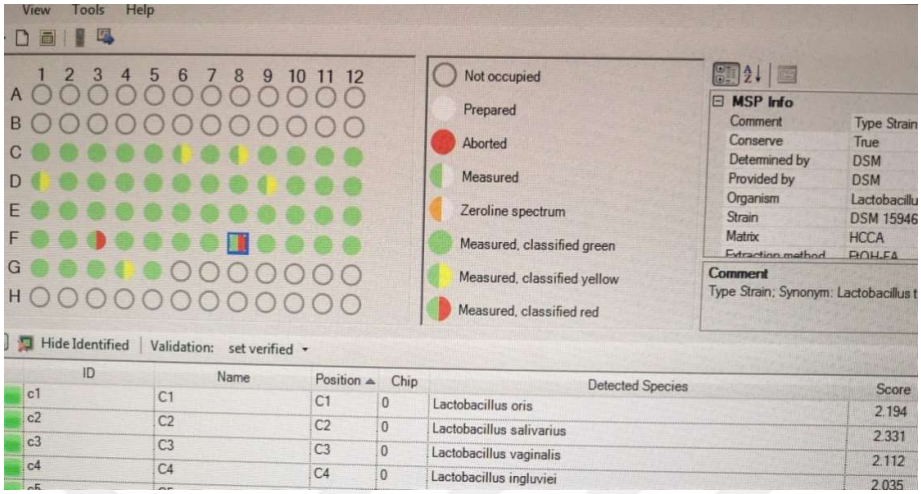
4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Çalışmada; İstanbul, Tekirdağ, Balıkesir ve Bursa illeri çevresinde bulunan 12 farklı çiftlikten ve her hayvandan 1 adet kloakal sürüntü olacak şekilde örnek alındı ve her örnekten 1-5 aralığında değişen sayıda çeşitli *Lactobacillus* türleri, toplamda ise 174 adet *Lactobacillus* türü izolatı elde edildi. *Lactobacillus* cinsine ait elde edilen izolatların mikroskop ve kültür görünümleri Şekil 4-1'de verilmiştir.



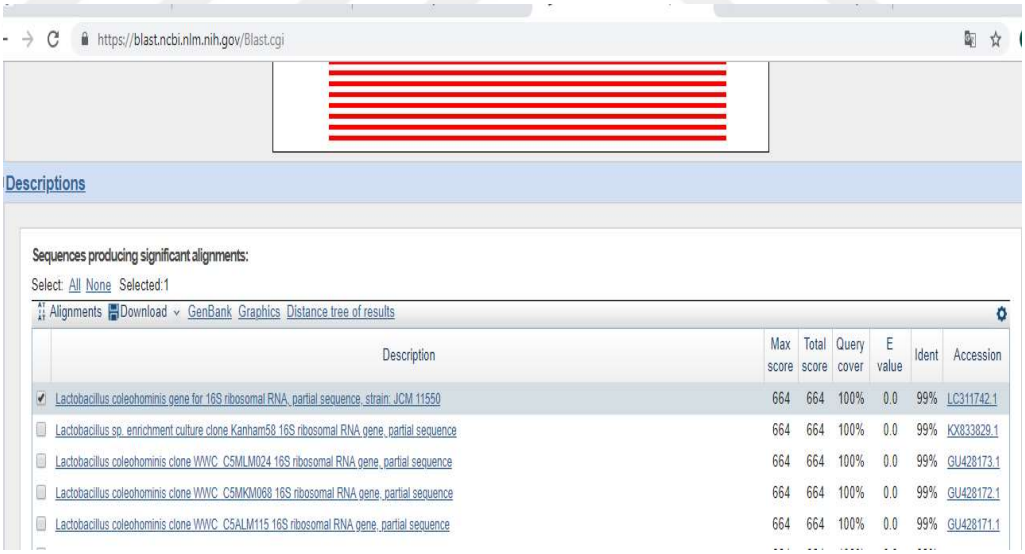
Şekil 4-1: Lactobacillus spp. sırasıyla mikroskopta (100X) ve MRS agar kültüründe görünümü

İzolatlara ait saptanan puan değerleri (log score) belirtildiği gibidir (Şekil 4-2).

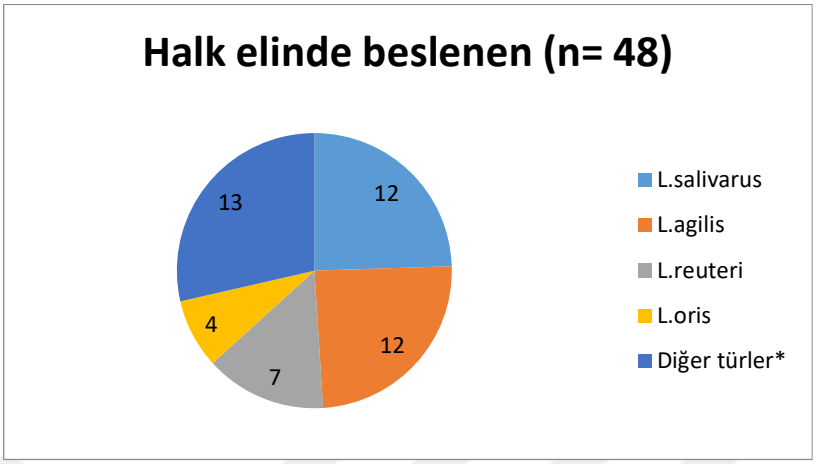


Şekil 4-2: Maldi Tof cihazıyla gerçekleştirilen identifikasyona ait örnek

Lactobacillus şüpheli örneklerden birinde puanın <1.7 çıkması sebebiyle 16S rRNA dizi analizine tabi tutuldu ve %99 oranla *L.coleohominis* olarak identifiye edildi.

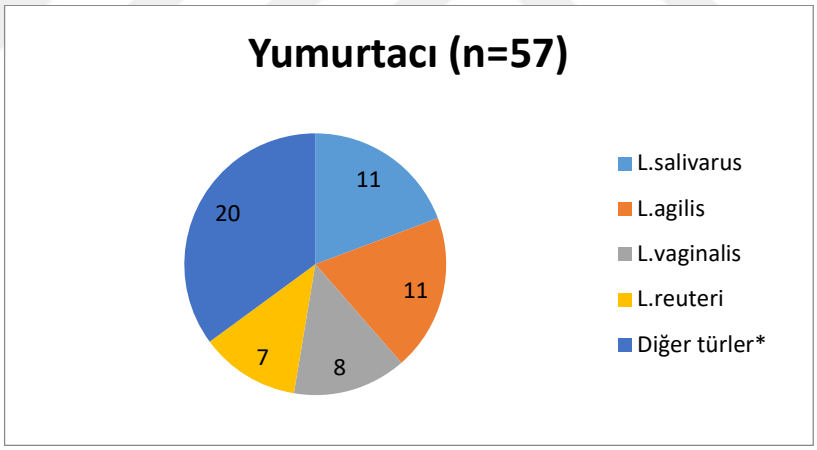


Elde edilen farklı türde Laktobasillerin dağılımı; yetiştirme şekilleri baz alınarak, halk elinde beslenen Şekil 4-3, yumurtacı Şekil 4-4, broiler Şekil 4-5 ve tüm izolatlar Şekil 4-6'da olmak üzere verilmiştir.



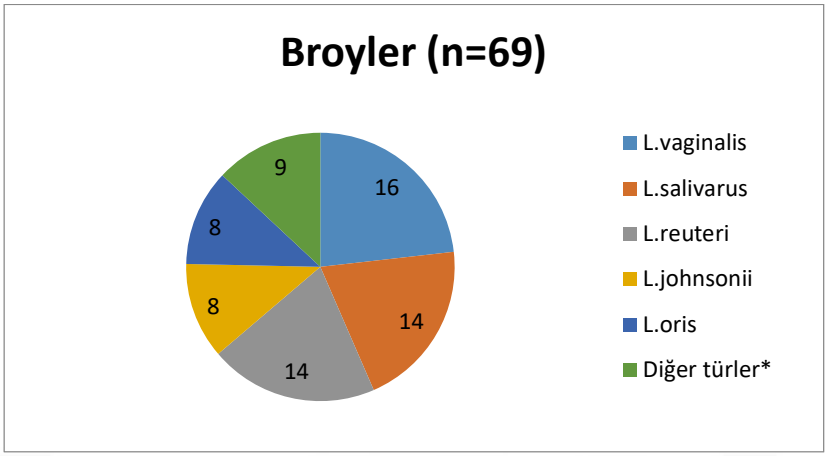
Şekil 4-3: Halk elinde beslenen tavuklara ait izolatların türlere göre dağılımı

* Diğer türler: *L.crispatus* 3 adet, *L.johnsonii* 2 adet, *L.ingluviei* 3 adet, *L.kitasatonis* 2 adet, *L.vaginalis* 2 adet, *L.mucosae* 1 adet



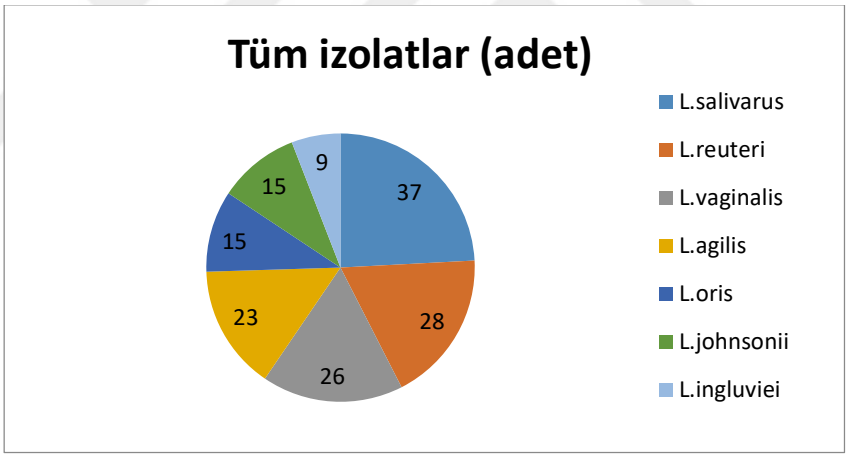
Şekil 4-4: Yumurtacı tavuklara ait izolatların türlere göre dağılımı

* Diğer türler: *L.mucosae* 4 adet, *L.johnsonii* 4 adet, *L.kitasatonis* 4 adet, *L.oris* 3 adet, *L.crispatus* 2 adet, *L.gallinarum* 1 adet, *L.delbrueckii* 1 adet, *L.panis* 1 adet



Şekil 4-5: Broyler tavuklara ait izolatların türlere göre dağılımı

* Diğer türler: *L.ingluviei* 6 adet, *L.saerimneri* 1 adet, *L.crispatus* 1 adet, *L.coleohominis* 1 adet



Şekil 4-6: Yetiştiriciliklerin tümünden izole edilen bütün izolatların türlere göre dağılımı

* Diğer türler: L. kitasatonis 6 adet, L. mucosae 5 adet, L. crispatus 4 adet, L.coleohominis 1 adet, L. saerimneri 1 adet, L.gallinarum 1 adet, L. delbrueckii 1 adet, L.panis 1 adet

Tablo 4-1: Tüm izolatlara ait saptanan puan değerleri (log score)

	2,0 > Puan ≥ 1,7	Puan ≥ 2
Serbest Gezen (n=48)	10	38
Broyler (n=68+1*)	4	64
Yumurtacı (n=57)	13	44

* 1 izolatın 16S r RNA geni sekans analizi yapılmıştır.

Tüm izolatlarda log score değeri ≥ 2 olan % 84,4 iken, değeri 2,0 > Puan ≥ 1,7 arasında izolat % 15,6 kadardır.

4.2. MLS Antibiyotik Direnci Fenotip Bulguları

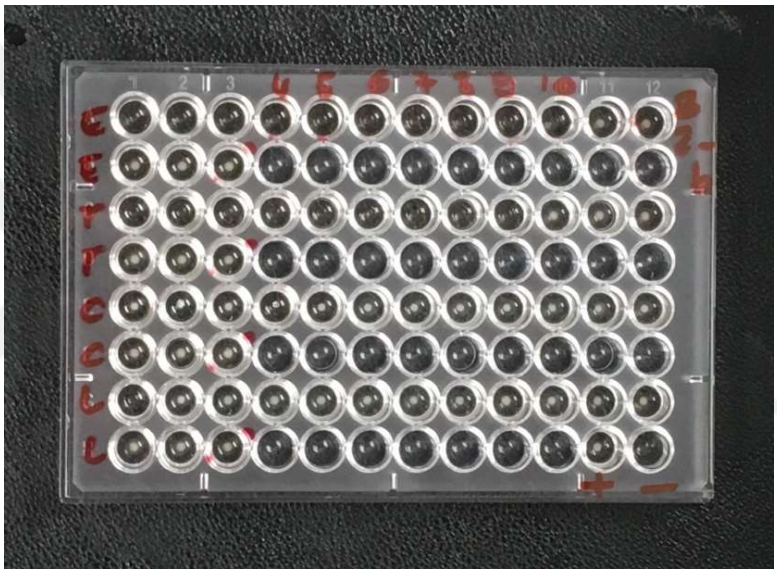
Eritromisin ve klindamisin direnç bulgularının değerlendirilmesinde, MİK değeri 1µg/ml'in yukarısında olan değerler dirençli olarak kabul edildi. Bu doğrultuda eritromisin direnci; halk elinde beslenen tavuklarda %62,5, broylerde %87,0, yumurtacı tavuklarda %47,4 olarak belirlendi. Klindamisin direnci ise; halk elinde beslenen, broyler ve yumurtacı tavuklarda sırasıyla; %72,9, %92,8 ve %78,9 olarak tespit edildi.

Virjinamisin eşik (breakpoint) değeri belirlenmesinde ise analoğu olan kinopristin/dalfopristin baz alınarak değer 4µg/ml olarak kabul edildi. Bu doğrultuda virjinamisin direnci; halk elinde beslenen tavuklarda %37,5, broylerde %73,9, yumurtacı tavuklarda %54,4 olarak belirlendi.

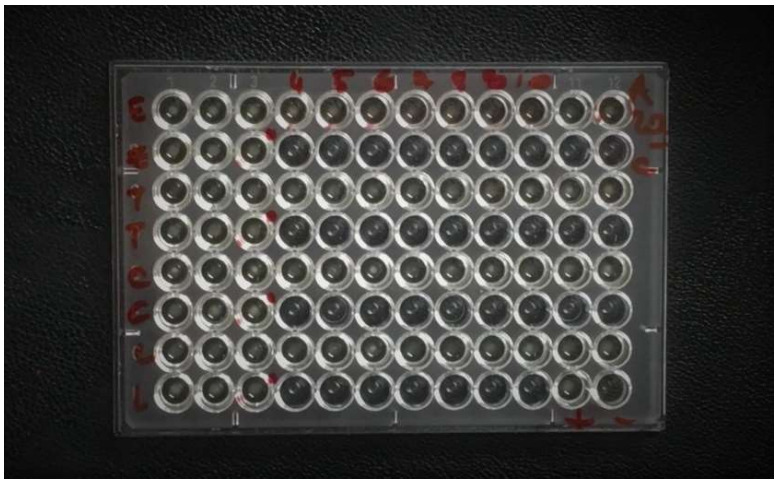
Bu çalışmada linkomisin ve tylosin için MİK değerleri iki subpopulasyon olarak elde edilen bimodal dağılım gösterdi. Bu antibiyotiklere yüksek aralıkta MİK değerine sahip olan izolatların kazanılmış dirence sahip olduğu değerlendirmesine, yapılan diğer araştırmalardaki fenotipik direnç yorumlamaları da göz önüne alınarak varıldı. Dirençli ve duyarlı izolatlar arasında ayrım belirgin olarak gözlendi ve linkomisin için MİK değeri 64 µg/ml ve yukarısı, tylosin için ise MİK değeri 16 µg/ml ve yukarısında olan izolatların dirençli olduğu kabul edildi.

Bu doğrultuda linkomisin direnci; halk elinde beslenen tavuklarda %43,8, broylerde %91,3, yumurtacı tavuklarda %77,2 olarak belirlendi. Tylosin direnci ise; halk elinde beslenen, broyler ve yumurtacı tavuklarda sırasıyla; %18,8, %87,0 ve %40,4 olarak tespit edildi.

Fenotipik direncin belirlenmesinde kullanılan broth mikrodilüsyon yöntemine ait gerçekleştirilmiş olan test örnekleri Şekil 4-7 ve Şekil 4-8'de verilmiştir.



Şekil 4-7: Yumurtacı tavuğa ait broth mikrodilusyon testi



Şekil 4-8: Broyler tavuğa ait broth mikrodilusyon testi

Farklı yetiştiricilik şekillerinden sağlanan ve 5 farklı antibiyotiğe karşı fenotipik direnç gösterdiği tespit edilen izolatların sayısı Tablo 4-2'de verilmiştir.

Tablo 4-2: Yetiştiricilik şekline göre fenotipik dirençli izolat sayısı

Antibiyotikler	Dirençli İzolat Sayısı (%)			
	Halk elinde beslenen (n=48)	Broyler (n=69)	Yumurtacı (n=57)	Ki-kare (P değeri)
Eritromisin	30 (%62,5)[b]	60 (%87,0)[a]	27 (%47,4)[b]	22,885 (<0,001)
Klindamisin	35 (%72,9)[b]	64 (%92,8)[a]	45 (%78,9)[b]	8,670 (<0,05)
Linkomisin	21 (%43,8)[b]	63 (%91,3)[a]	44 (%77,2)[c]	33,491 (<0,001)
Tylosin	9 (%18,8)[b]	60 (%87,0)[a]	23 (%40,4)[c]	58,186 (<0,001)
Virjinamisin	18 (%37,5)[b]	51 (%73,9)[a]	31 (%54,4)[b]	15,686 (<0,001)

[a,b,c] Aynı satırda farklı harf taşıyan oranlar arasındaki farklılık önemlidir (P<0,05).

Antibiyotik/Türler		MİK (µg/ml)																	
		0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	≥256	≥512	≥1024
Eritromisin	L.salivarus								5	4			1				2		
	L.agilis						1		5	1	1	2					2		
	L.reuteri					5				1							1		
	L.oris				1	2	1												
	L.crispatus					1			1				1						
	L.johnsonii					2													
	L.ingluviei						1	2											
	L.kitasatonis					1						1							
	L.vaginalis					1											1		
	L.mucosae																1		
	Toplam				1	12	3	2	11	6	1	3	2				7		
Klindamisin	L.salivarus						1	2	5	1	1						2		
	L.agilis					1		2	1		3	1					4		
	L.reuteri				1	2			1	2							1		
	L.oris				1			1	1		1								
	L.crispatus										3								
	L.johnsonii											2							
	L.ingluviei					1				2									
	L.kitasatonis								1		1								
	L.vaginalis																1		
	L.mucosae						1										1		
	Toplam				2	4	2	5	9	5	9	3					9		
Linkomisin	L.salivarus								1	2	4			3					2
	L.agilis							1		2	2			2		1			4
	L.reuteri						1	1		1	2			1					1
	L.oris								1	1		2							
	L.crispatus						1							2					
	L.johnsonii											1		1					
	L.ingluviei								1	1	1								
	L.kitasatonis													1	1				
	L.vaginalis								1										1
	L.mucosae																		1
	Toplam						2	2	4	7	9	3		10	1	1			9

Tablo 4-3: Halk elinde beslenen tavuklara ait MİK bulgular

Antibiyotik/Türler	MİK (µg/ml)															
	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256	≥512
Tylosin																
L.salivarus							1	7	2					1		1
L.agilis						1	2	1	5							3
L.reuteri					1	2	2	1		1						
L.oris						1	1		1	1						
L.crispatus						1		1	1							
L.johnsonii						1	1									
L.ingluviei								2	1							
L.kitasatonis						1	1									
L.vaginalis									1					1		
L.mucosae																1
Toplam					1	7	8	12	11	2				2		5
Virginiamycin																
L.salivarus								4	8							
L.agilis						2	3	5	2							
L.reuteri							2	2	3							
L.oris						1		2	1							
L.crispatus										3						
L.johnsonii								1	1							
L.ingluviei						1		2								
L.kitasatonis							1	1								
L.vaginalis					2											
L.mucosae							1									
Toplam					2	4	7	17	15	3						

Tablo 4-3: Halk elinde beslenen tavuklara ait MİK bulguları - devamı

	MİK (µg/ml)																
AntibiyotikTürler	**0,015**	**0,03**	**0,06**	**0,12**	**0,25**	**0,5**	**1**	**2**	**4**	**8**	**16**	**32**	**64**	**128**	**≥256**	**≥512**	**≥1024**
Eritromisin																	
L.salivarus					1										13		
L.vaginalis			1	2	1			3						1	8		
L.reuteri					3	1		1	1				1	1	6		
L.oris															8		
L.crispatus															1		
L.johnsonii															8		
L.ingluviei															6		
L.saerimneri															1		
L.colehominis															1		
Toplam			1	2	5	1		4	1				1	2	52		
Klindamisin																	
L.salivarus					1										13		
L. vaginalis							2	1			1	1	2		9		
L.reuteri						1	1	1	1	1		1	1		7		
L.oris										1		1	2		4		
L.crispatus															1		
L.johnsonii												1			7		
L.ingluviei															6		
L. saerimneri															1		
L. colehominis															1		
Toplam					1	1	3	2	1	2	1	4	5		49		
Linkomisin																	
L.salivarus								1									13
L.vaginalis								1				1			1	1	12
L.reuteri									3							2	9
L.oris															1	1	6
L.crispatus																	1
L.johnsonii																1	7
L.ingluviei																	6
L.saerimneri																	1
L.colehominis																	1
Toplam								2	3			1			2	5	56

Tablo 4-4: Broyler tavuklara ait MİK bulguları

AntibiyotikTürler	MİK (µg/ml)														
	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	≥512
Tylosin															
L.salivarus						1								1	12
L.vaginalis						1		1	1	1		1		1	10
L.reuteri							3		1	1			1	1	7
L.oris														1	7
L.crispatus															1
L.johnsonii						1						1			6
L.ingluviei															6
L.saerimneri															1
L.colehominis															1
Toplam						3	3	1	2	2		2	1	4	51
Virginiamycin															
L.salivarus							1		2	3	5	3			
L.vaginalis					3	4	2	4	3						
L.reuteri					1				2	10	1				
L.oris						2			1	2	2	1			
L.crispatus											1				
L.johnsonii									1	2	1	2	2		
L.ingluviei							1			2		3			
L.saerimneri												1			
L.colehominis									1						
Toplam					4	6	4	4	10	19	10	10	2		

Tablo 4-4:Broyler tavuklara ait MİK bulguları- devamı

Antibiyotik/Türler		MİK (µg/ml)																
		0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	≥256	≥512	1024
Eritromisin	L.salivarus					1			4	1	2					3		
	L.agilis				1	1	1	1	4		1					2		
	L. vaginalis				1	4	1				2							
	L.reuteri					3	1							1		2		
	L.mucosae				2	1										1		
	L.johnsonii					1										3		
	L.kitasatonis			2		2												
	L.oris			1	2													
	L. crispatus					2												
	L.gallinarum					1												
	L.delbrueckii				1													
	L.panis										1							
	Toplam			3	7	16	3	1	8	1	6			1		11		
Klindamisin	L.salivarus							1	2			2	1	2		3		
	L.agilis					1	2			1		2			1	4		
	L. vaginalis						1		1						1	5		
	L.reuteri						1		1			1		1	1	2		
	L.mucosae				1	1	1									1		
	L.johnsonii															4		
	L.kitasatonis							2								2		
	L.oris						1							1		1		
	L.crispatus															2		
	L.gallinarum															1		
	L.delbrueckii													1				
	L.panis												1					
	Toplam				1	2	6	3	4	1		5	2	5	3	25		

Tablo 4-5: Yumurtacı tavuklara ait MİK bulguları

Antibiyotik	Türler	MİK (µg/ml)														
		0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	≥512	≥1024
Linkomisin	L.salivarus									1		3			2	5
	L.agilis						3			1	1	1	2			3
	L. vaginalis					1						1			1	5
	L.reuteri					2						1			1	3
	L.mucosae			1	2											1
	L.johnsonii															4
	L.kitasatonis									1		2				1
	L.crispatus												1			1
	L.oris											1				2
	L.gallinarum															1
	L.delbrueckii															1
	L.panis															1
	Toplam			1	2	3	3			3	1	9	3		4	28
Tylosin	L.salivarus						1	4		2			1	1	2	
	L.agilis					2	2	4				1			2	
	L. vaginalis							3		1	1		1		2	
	L.reuteri					1	2	2		1					1	
	L.mucosae							2			1				1	
	L.johnsonii						1								3	
	L.kitasatonis				2	2										
	L.crispatus						1	1								
	L.oris							2			1					
	L.gallinarum						1									
	L.delbrueckii							1								
	L.panis											1				
	Toplam				2	5	8	19		4	3	2	2	1	11	

Tablo 4-5:Yumurtacı tavuklara ait MİK bulguları- devamı

AntibiyotikTürler	MİK (µg/ml)																		
	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256	512	1024	>1024
Virginiamycin																			
L.salivarus										7	3	1							
L.agilis						1		1	4	3	2								
L.vaginalis								3			5								
L.reuteri									3	1	3								
L.mucosae								3	1										
L.johnsonii									2	2									
L.kitasatonis					1			2		1									
L.crispatus								1		1									
L.oris					2					1									
L.gallinarum									1										
L.delbrueckii											1								
L.panis						1													
Toplam					3	2		10	11	16	14	1							

Tablo4-5:Yumurtacı tavuklara ait MİK bulguları- devamı

4.3. MLS Antibiyotik Direnci Genotip Bulguları

Çalışmada örnekleme yapılan tavuklardan izole edilen *Lactobacillus* türlerinin tümünde Makrolide-Lincosamide-Streptogramin (MLS) direncine yönelik belirlenen hedef genler PCR yöntemiyle araştırıldı. Tüm izolatlarda MLS direncinde rol oynayan erm (A) geni, erm (B) geni ve erm (C) geni varlığı saptanmaya çalışıldı.

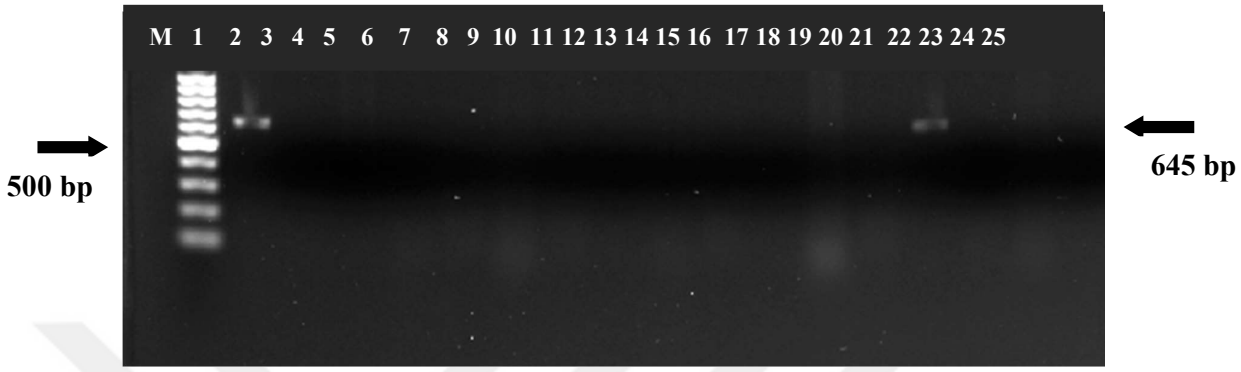
Tüm izolatlarda araştırılan hedef genler ve pozitif sonuç veren izolat sayılarının yetiştirme şekline bağlı dağılımı Tablo 4-6'da verilmiştir.

Tablo 4-6: İzolatların genotipik direnç oranları

Direnç Genleri	Direnç Gözlenen İzolat Sayısı (%)			
	Halk elinde beslenen (n=48)	Broyler (n=69)	Yumurtacı (n=57)	Ki-kare (P değeri)
Erm (A) geni	-	1 (%1,4)	-	1,531 (>0,05)
Erm (B) geni	13 (%27,1)[b]	53 (%76,8)[a]	40 (%70,2)[a]	32,454 (<0,001)
Erm (C) geni	18 (%37,5)[b]	38 (%55,1)[ab]	41 (%71,9)[a]	12,542 (<0,05)

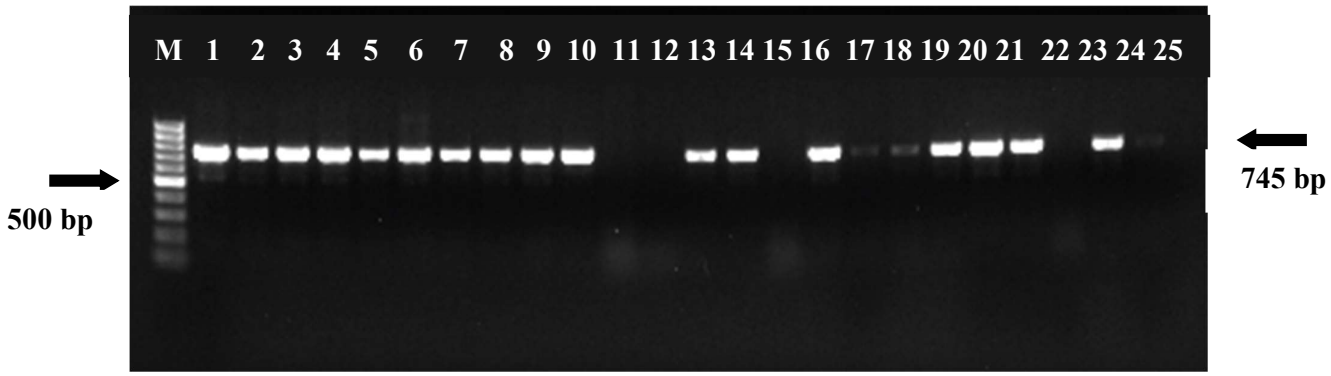
[a,b,c] Aynı satırda farklı harf taşıyan oranlar arasındaki farklılık önemlidir (P<0,05).

Şekil 4-9: PCR sonucunda *Lactobacillus* türlerinin erm (A) geni jel elektroforez görüntüleri



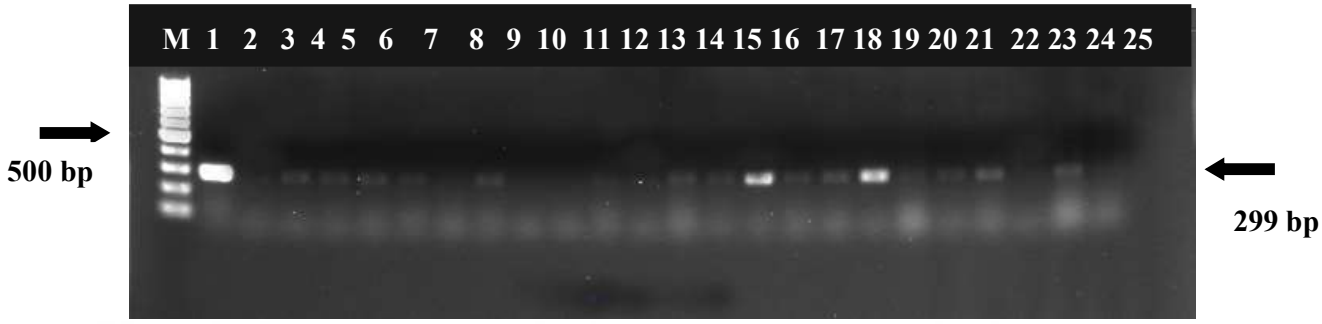
M: Marker
1: Pozitif kontrol
21: Erm (A) genine sahip *Lactobacillus* izolatı (645 bp)
25: DNase- RNase free distile su (negatif kontrol)

Şekil 4-10: PCR sonucunda *Lactobacillus* türlerinin erm (B) geni jel elektroforez görüntüleri



M: Marker
1: Pozitif kontrol
2-10, 13, 14, 16-21, 23-24: Erm (B) genine sahip Lactobacillus izolatları (745 bp)
25: DNase- RNase free distile su (negatif kontrol)

Şekil 4-11: PCR sonucunda *Lactobacillus* türlerinin erm (C) geni jel elektroforez görüntüleri



M: Marker
1: Pozitif kontrol
2-6, 8, 11-18, 20-21, 23: Erm (C) genine sahip *Lactobacillus* izolatları (299 bp)
25: DNase- RNase free distile su (negatif kontrol)

4.4. İstatistiksel Analiz Sonuçları

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda; üç yetiştirme şeklinde farklı *Lactobacillus* tür izolat sayısı arasındaki fark, serbest gezen ve broyler tip yetiştirme için anlamlı ($p<0,05$) bulundu.

Yetiştirme şekillerine göre istatistiki açıdan karşılaştırmada farklı *Lactobacillus* türleri bakımından fark;

Serbest gezen ile broyler tavuklarda yapılan değerlendirme sonucunda *L.reuteri* ($P <0,05$), *L.agilis* ($P <0,001$), *L.vaginalis* ($P<0,001$), halk elinde beslenen ile yumurtacı tavuklarda yapılan değerlendirme sonucunda izole edilen *L.vaginalis* ($P<0,05$) ve broyler ile yumurtacı tavuklarda yapılan değerlendirme sonucunda izole edilen *L.reuteri* ($P<0,05$), *L.agilis* ($P<0,001$), *L.ingluviei* ($P<0,05$), *L.vaginalis* ($P<0,05$) türleri için önemli bulundu.

Eritromisin, klindamisin ve virjinamisin dirençli izolatların yetiştirme şekli ile (halk elinde beslenen-broyler ve broyler-yumurtacı) istatistiki karşılaştırmasında fark önemli bulundu ($P<0,05$-$P<0,001$)($P<0,05$-$P<0,05$)($P<0,001$-$P<0,05$). Eritromisin, klindamisin ve virjinamisin dirençli izolat sayısının yetiştirme şekli ile (halk elinde beslenen-yumurtacı) istatistiki karşılaştırmasında ise fark önemsiz bulundu ($P>0,05$).

Dirençli izolatların, linkomisin (halk elinde beslenen-broyler, halk elinde beslenen-yumurtacı, broyler-yumurtacı) ve tylosin (halk elinde beslenen-broyler, halk elinde beslenen-yumurtacı, broyler-yumurtacı) ile istatistiki açıdan karşılaştırmasında fark önemli bulundu ($P<0,05$). (Tablo 4.2).

Her üç yetiştirme şeklinde erm (A) direnç oranlarının istatistiki karşılaştırılmasında tüm yetiştiricilik şekillerinde fark önemsiz bulundu ($P>0,05$). Yetiştirme şekli ile erm (B) direnç oranları istatistiki olarak karşılaştırıldığında halk elinde beslenen-broyler ve halk elinde beslenen-yumurtacı önemli ($P<0,001$), broyler-yumurtacı arasındaki oranlar ise önemsiz bulundu ($P>0,05$). Erm (C) dirençli izolat sayısının yetiştirme şekli ile istatistiki karşılaştırmasında sadece halk elinde beslenen-yumurtacı arasındaki fark önemli bulundu ($P<0,001$) (Tablo 4.6)

5. TARTIŞMA

Laktobasiller hem gıda endüstrisinde hem de insan sağlığının iyileştirilmesinde probiyotik bir ajan olarak, çeşitli uygulamalara dâhil olan ticari yönden önemli bakterilerdir (Chin ve ark. 2005). Bağırsak mikrobiyomunun yararlı bileşenleri olarak bu bakteriler, kanatlıların da dâhil olduğu çiftlik hayvanlarının sağlık durumları üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Mukoz membranların mikrobiyal dengesinin korunmasının yanı sıra, enteropatojenik infeksiyonlara karşı koruma sağlamaktadırlar. Sindirim ve gıda assimülasyonunun iyileştirilmesinde, toksik maddelerin eliminasyonunda ve bağışıklığın geliştirilmesinde de fonksiyonları bulunmaktadır (Dec ve ark. 2016).

Antibiyotikler, bakteriyel etkenlerin neden olduğu bulaşıcı hastalıkların tedavisi için insan ve veteriner hekimliğinde en güçlü terapötik seçeneklerden birini temsil etmektedir. Bununla beraber; antibiyotiklerin ilaç sektörü, hayvan besleme, su ürünleri yetiştiriciliği ve tarımda aşırı miktarda ve kötüye kullanılması, hem insan hem de hayvan sağlığı için ciddi bir sorun oluşturan antibiyotiklere dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına ve yayılmasına neden olmuştur. Günümüzde, infeksiyöz mikroorganizmalarda sürekli olarak artan antibiyotik direnci (AR) yaygınlığı küresel bir halk sağlığı acil durumu oluşturmaktadır (Campedelli ve ark. 2019).

Aşırı miktarda, çoğu zaman da gerekçesiz bir biçimde antimikrobiyal maddelerin hayvansal üretim ve veterinerlikte kullanımı; yalnızca patojenik suşlar arasında değil aynı zamanda kommensal mikroflora içinde de (Laktobasiller gibi) direnç gelişimine katkıda bulunmaktadır. Antibiyotik direnci yayılımını durdurma girişimlerine rağmen, dirençli bakteri seviyesi artmakta ve günümüzde gastrointestinal sistemin antibiyotik direnç genleri rezervuarı olarak hareket ettiği hipotezi yaygın olarak kabul edilmektedir (Dec ve ark. 2015).

Patojen bakterilerde antibiyotik direnci üzerine çok sayıda çalışma olmasına rağmen bu konu laktik asit bakterilerinde son yıllara değin geniş çapta çalışılmamıştır (Moračanin ve ark. 2017). Bununla birlikte; kommensal bakterilerin direnç determinantlarını patojenlere aktardığı gösterildiğinden bu yana, direnç gelişimi ile ilgili

yapılan araştırmaların Laktobasilleri de kapsaması gerektiğine işaret edilmektedir (Drago ve ark. 2011). Türkiye'de gıda alanında laktik asit bakterilerinde direnç bulgularını ortaya koyan çalışmalar yapılmasına karşın, hayvanlarda bu bakterilerde direnç varlığının araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında, halk elinde beslenen ve ticari (yumurtacı ve broyler) tavuklarda Laktobasillerin dağılımı ve türlerinin identifikasyonu gerçekleştirilirken, izolatlara ait Makrolide-Lincosamide-Streptogramin (MLS) antibiyotiklere direnç profilleri belirlenmiştir.

İlk aşamada, klasik yöntemler ile identifikasyon yapabilmek için bakterilerin bulunduğu ortamdan izolasyonunun ardından saf kültürlerinin elde edilmesi gerekmektedir. Laktobasillus türlerinin karışık laktik asit bakterileri populasyonlarından ayrılmasında, izolasyonunda ve sayımında çeşitli besiyerilerinden faydalanılmaktadır. Ancak, sadece Laktobasillerin gelişebildiği bir besiyeri bildirilmemiştir. Oksijen toleransı, gıda gereksinimleri, antibiyotik duyarlılığı, koloni morfolojisi ve rengi suşların ayırımında değerlendirilme kriterlerini oluşturmaktadır. Bununla beraber aynı besiyerlerinde kolay üreyen *Lactococcus, Enterococcus, Leuconostoc, Weissella, Bifidobacterium* ve *Pediococci* gibi mikroorganizmaların bulunması izolasyon için kullanılan besiyerlerini sınırlamaktadır. Bunlardan besleyici özelliği yüksek olan MRS agar ve MRS broth Laktobasillerin kültür ve izolasyonu amaçlı en sıklıkla tercih edilen besiyeridir. Bu tez çalışmasında izolasyon için MRS agar ve MRS broth besiyerleri tercih edilmiştir. Saf kültür olarak izolatların elde edilmesinin ardından, identifikasyonda sırasıyla gram özelliğinin, mikroskobik morfolojisinin ve katalaz testininin değerlendirilmesi adımları takip edilmektedir. Besiyerinde gözlenen gram pozitif, çubuk veya kok formunda, sporsuz ve katalaz aktivitesi negatif izolatlar laktik asit bakteri şüpheli olarak değerlendirilmiştir (Coeuret ve ark. 2003; Yılmaz ve ark. 2003).

Bazı geleneksel tanımlama testleri, Laktobasillerin çeşitli karbonhidratları fermente etme yeteneğine dayanmaktadır. Bakteriyal tanımlamada fenotipik metodların sonuçları belirsizlik gösterebilmekte veya yorumlanması zor olmakla birlikte düşük tekrarlanabilirlik göstermektedir. Günümüzde tanımlamada polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve PCR bazlı RAPD, 16S-ARDRA ve DNA-DNA hibridizasyonunun dahil olduğu metodlar bulunmaktadır. Öte yandan moleküler teknikler nispeten pahalı olmakla beraber zaman ve emek gerektirmekte ve rutin identifikasyon için uygun bulunmamaktadır. Son yıllarda matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon /iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) tanıtılmış ve günümüzde mikroorganizmaların tanımlanması ile tiplendirilmesinde yaygın olarak kullanım alanı bulmuştur (Dušková ve ark. 2012). Kısa zamanda sonuç vermesi, düşük reaktif maaliyetleri, numune hacim gereksiniminin az olması ve rutin analizlerde sağladığı kolaylık bildirilen başlıca avantajlarından bazılarıdır (Soro-Yao ve ark. 2014). MALDI-TOF MS ile Laktobasillerin tiplendirilmesinin güvenilirliği ve etkinliği birçok araştırıcı tarafından doğrulanmış ve log değerinin 2.00 altında olmasına rağmen kütle spektrometresi ile çeşitli genetik metodlardan elde edilen sonuçlar arasında yüksek uyum gözlendiğine işaret edilmiştir (Dec ve ark. 2018). MALDI-TOF MS bakterileri yalnızca cins ve tür düzeyinde değil bazı durumlarda alt tür seviyesinde dahi tanımlayabildiği bildirilmiştir. Dušková ve ark. (2012), MALDI-TOF MS teknolojisinin yakın zamanda yeni *Lactobacillus* referans suşlarının da veritabanına dahil edilmesiyle, metodun basitliği ve hızlı olması nedeniyle türlerin güvenilir şekilde identifikasyonunda tercih sebebi olacağını vurgulamaktadır. Bu tez çalışmasında Laktobasillerin cins ve tür düzeyinde identifikasyonları matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) ile gerçekleştirilmiştir. Tüm izolatlarda log score değeri ≥ 2 olan % 84,4 iken, değeri 2,0 > Puan ≥ 1,7 arasında % 15,6 kadar izolat bulunması seçilen metod tercihinin doğruluğunu kanıtlar niteliktedir.

Bu tez çalışmasında sırasıyla ticari (broyler ve yumurtacı) ve halk elinde beslenen yetiştiricilik türlerinde 69, 57 ve 48 *Lactobacillus* izolatı elde edilmiştir. Kobierecka ve ark. (2017)'nın çalışma bulgularında; tür dağılımı halk elinde yetiştiricilikte daha fazla çeşitlilik göstermiştir. Bu duruma çeşitlendirilmiş beslenmenin mikrobiyal topluluğu etkilediği ve buna bağlı olarak bağırsakta baskın suşları meydana getirdiği sebep olarak göstermişlerdir.

Diğer yandan Tannock (2004), autochthonous (mikrofloraya özgü) *Lactobacillus* türlerinin ticari yetiştirilen tavuklarda daha belirgin olarak saptandığını bildirmiştir. Bu tez çalışmasında da, ticari yetiştiricilikte identifiye edilen *Lactobacillus* izolat sayısının; halk elinde beslenene göre fazla olması, Tannock (2004)'un bulgularıyla örtüşmektedir.

Kobierecka ve ark. (2017), çalışmalarında yetiştirme metodlarından bağımsız olarak en sıklıkla saptanan türün *L.salivarus* olduğunu bildirmiştir. Bu tez çalışmasında da yetiştirme metodlarından bağımsız olarak *L. salivarus* (37/174) en baskın tür olarak saptanmıştır.

De Souza ve ark. (2012), beş adet free-range broyler tavuğun taşlık, ince ve kalın bağırsağı ile sekumundan aldıkları örneklerde 6 farklı türe ait 37 *Lactobacillus* izolatı elde etmişlerdir. İdentifikasyonu ise türlere göre; 11 *L. reuteri* (%29.7), 11 *L. acidophilus* (%29.7), 5 *L. vaginalis* (%13.6), 4 *L. johnsonii* (%10.8), 4 *L. salivarius* (%10.8), 2 *L. crispatus* (%5.4) olmak üzere belirtmişlerdir.

Lan ve ark. (2002), ticari tesisten yumurtacı tavukların caecaum örneklerinde 16S rDNA sekans analizi ile yaptıkları identifikasyon sonucu gözlenen en önemli türlerin başlıca *L.crispatus* olduğunu, bunu *L.salivarus*'un izlediğini ve *L.reuteri, L. oris* ve *L. fermentum* gibi türlerin de çalışmada izole edildiğini bildirmişlerdir.

K.Cauwerts ve ark. (2006), 40 broyler tavuktan aldığı kloakal svaptan 88 *Lactobacillus* izolasyonu bildirmişlerdir. Ardından API 50 CH, tDNA-PCR sonuçlarına dayanarak 31 izolatı *L.salivarius*, 8'ini *L. reuteri* ve 49 izolatın *Lactobacillus amylovorus*, *L. crispatus* veya *Lactobacillus gallinarum*'a ait olduğunu ve devamında son grupta 16S rDNA-sekans metoduyla yaptıkları identifikasyonla da bunların 8 *L.amylovorus*, 10 *L. crispatus* ve 31 *L. gallinarum* suşuna ait olduğunu tanımlamışlardır.

Souza ve ark. (2007)'nın, ticari broyler ve serbest gezen (free-range) tavuklarda Laktobasillerin dağılımını araştırdıkları çalışmasında, hayvanların sekumlarında 7 farklı *Lactobacillus* türünü identifiye ettiklerini bildirmişlerdir. Bunlar; *L.acidophilus,*

L.agilis, L.crispatus, L.johnsonii, L.reuteri, L.salivarus ve *L.vaginalis* olarak saptanmıştır. Bunlardan *Lactobacillus crispatus* sadece ticari broilerlerde, *Lactobacillus vaginalis ve Lactobacillus agilis* ise yalnızca free-range tavuklarda ve *Lactobacillus salivarus* ise her iki yetiştiricilikte de izole edilmiştir. Bu tez çalışmasında benzer olarak *L.salivarus* tüm yetiştirme şekillerinde identifiye edilirken, *L.crispatus* ve *L.vaginalis* de her 3 yetiştirme şeklinde saptanmıştır. *L. agilis* varlığı da bu çalışmada bulgulara paralel olarak ticari broylerde gözlenmezken, yumurtacı ve halk elinde beslenen tavuklardan izolasyonu yapılmıştır. Bu farklılıklara diyet, stress seviyesi ve büyümeyi destekleyici ilaç kullanımının etkisi olabileceği fikri Alzueta ile ark. ve Wage tarafından desteklenmektedir.

Tannock (2004), *L. acidophilus* grubu ve *Lactobacillus reuteri* kolonizasyonda erken üyeler olduğunu, *Lactobacillus salivarius*'un ise ileri yaşlarda sürekli olarak tespit edildiğini belirtmiştir. Çalışmada da halk elinde beslenen ve yumurtacı tavuklarda baskın tür *L.salivarus* olarak gözlenirken, yaşı iki gruba göre nisbeten daha küçük olan broilerlerde baskın türün farklılık göstermesi verileri desteklemektedir.

Bu çalışmada, halk elinde beslenen ve ticari (yumurtacı ile broiler) tavuklardan 15 farklı türe ait olmak üzere toplamda 174 *Lactobacillus* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Yetiştirme şekillerine göre türlerin dağılımına bakıldığında en sıklıkla; halk elinde beslenenlerde(n=48) L.salivarus(n=12), L.agilis(n=12), L.reuteri(n=7), yumurtacılarda(n=57) L.salivarus(n=11), L.agilis(n=11), L.vaginalis(n=8) ve broylerde(n=69) L.vaginalis(n=16), L.salivarus(n=14), L.reuteri(n=14) türleri saptanmıştır. Bu tez çalışmasında benzer bulgular bulunmasına karşın, Laktobasillerin floradaki kompozisyonundaki farklılığa; Cauwerts ve ark. (2006)'nın da belirttiği gibi genetik faktörlerin, yaşın, intestinal lokasyonun, yaşam biçimi, rasyon gibi ekolojik faktörlerin ve hatta yetiştirilme tarzının sebebiyet verdiği düşünülmüştür. Bunun yanısıra Lan ve ark. (2002), tanıda bakterinin kültürünün yapılmadığı PCR bazlı yöntemlerin de farklılıklara yol açtığı bildirmiştir.

Çalışmada *L.saerimneri*, *L.colehominis*, *L.gallinarum*, *L.delbrueckii* ve *L.panis* tek izolat olmak üzere identifiye edilmiştir. Yapılmış olan araştırmalar *L.saerimneri* (Stephenson ve ark. 2009; Coillie ve ark. 2007; Ferrario ve ark. 2017), *L.colehominis* (Bjerrum ve ark. 2006), *L.gallinarum* (Stephenson ve ark. 2009; Guan ve ark. 2003; Hagen ve ark. 2005; Coillie ve ark. 2007), *L.delbrueckii* (Lu ve ark. 2003) ve *L.panis* (Stephenson ve ark. 2009; Lee ve ark. 2008) türlerinin daha önceden tavukların gastrointestinal sisteminde tanımlanmış olduğunu ortaya koymaktadır.

Ülkemizde Laktobasillerde antibiyotiklere duyarlılık sınır değerlerini tanımlayan ve antimikrobiyal direnç prevalansına ilişkin veriler nadirdir (Ouoba ve ark. 2008). Ülkemizde Çataloluk ve ark. (2004) ile Özteber ve ark. (2017) sırasıyla; süt ürünleri ile insan kaynaklı Laktobasillerde ve fermente süt ürünlerindeki Laktik asit bakterilerinde antimikrobiyal direnç konulu çalışmaları olmasına karşın, kanatlı orjinli elde edilen Laktobasillerde direnç çalışmasına rastlanmamıştır.

Laktobasillerde antibiyotik duyarlılık testlerinde standart bir prosedürün olmayışına bağlı olarak, kullanılan methodlar farklı inokulumları, besiyerlerini ve inkubasyon koşullarını içerebilmektedir (Mayrhofer ve ark. 2014). Bu çalışmada tüm izolatlara ait antibiyotik duyarlılıkları ISO 10932 / IDF 223 standartları tarafından önerilen LSM besiyeri tercih edilerek broth mikrodilüsyon metoduyla belirlendi. Laktobasillerde antibiyotiklere duyarlılığın belirlenmesinde eşik (breakpoint) değerleri EUCAST yönetmeliğinde rapor edilmediğinden ve CLSI M-45 tarafından belirtilen yöntem tüm *Lactobacillus* türlerinin gelişimi için gerekliliklere adapte olmadığından; sonuçların yorumlanmasında, EFSA (2012) ve diğer araştırmacıların referanslarında belirttikleri epidemiyolojik ayırım (cut-off/ ECOFF) değerleri baz alındı.

Dec ve ark. (2017), tavuklardan izole edilen Laktobasillerde antibiyotik duyarlılık testlerini ISO 10932/IDF 223 standartlarının önerdiği LSM medium besiyerinde broth mikrodilüsyon metoduyla gerçekleştirmiştir. FEEDAP tarafından çeşitli antibiyotiklere dair belirlenen breakpoint değerleri baz alınarak sonuçların yorumlaması yapılmıştır. Tylosin için eritromisine ait belirlenen breakpoint değeri adapte edilmiştir. Linkomisin için ise bimodal MİK dağılımı ve direnç genleri varlığı göz önünde bulundurularak cut-off tespiti yapılmıştır. Çalışmada linkomisine %70,

eritromisin ve tylosine ise %42 oranlarında direnç gözlenmiştir. Kazanılmış direncin göstergesi olan MİK değerinin; iki subpopulasyon olarak elde edilen belirgin bimodal dağılımı çalışmada makrolidlerde gözlenmiş ve düşük MIC değerleri (≤0.25–1 μg/ml) duyarlı, diğer yüksek MİK değerleri (32->64 μg/ml) ise dirençli olarak değerlendirilmiştir.

Cauwerts ve ark. (2006), Belçika'da broyler çiftliğinden izole ettikleri Laktobasillerde agar dilüsyon metodunu kullanarak yapmış oldukları duyarlılık testinde; %78'inin eritromisin ve tylosine, %87'sinin linkomisine direnç gösterdiği saptamıştır. Laktobasillere ait MİK sınır değerleri NCCLS kılavuzlarında veya diğer kılavuzlarda belirtilmediğinden, duyarlılık ve direnç arasında farklılaşan kritik konsantrasyonu kısmen çalışmaya özgü ve önceki araştırmalardaki (Dutta&Devriese) değerleri göz önünde bulundurarak belirlemişlerdir. Sorumlu direnç genlerini de taşıması sebebiyle; tylosin için 16 mg/ml ve linkomisin için 64 mg/ml değerlerinin kazanılmış dirence ait olduğu düşünmüşlerdir. Aynı örnekten izole ettikleri farklı Laktobasillus türlerinde aynı antibiyotiğe karşı direnç gelişiminin görülmesini cins içinde direnç genlerinin transfer edilebilme ihtimaline dayandırmışlardır. Çalışmamızda da örtüşen biçimde aynı örneğe ait identifiye edilen farklı *Lactobacillus* türlerinde direnç gelişiminin görülmesi, gen transferini akla getirmektedir. Bu görüş; Laktobasillus türleri ve aynı zamanda LAB'nin farklı türleri arasında direnç genleri transferinin kanıtlandığı çalışmalarla da desteklenmektedir.

Araştırıcıların daha önceden gerçekleştirdiği çalışmada, makrolid ve linkosamidlere karşı kazanılmış direnç gösteren kanatlı *Lactobacillus* izolatlarının oranı her iki antibiyotik için %46 olarak bildirilmiştir ki bu bulgu da; geçen 20 yıl içerisinde bu antibiyotiklere gözlenen dirençte artışa işaret etmektedir (Cauwerts ve ark. 2006).

Saleem ve ark. (2018), ticari broyler ve halk elinde beslenen tavuklara (backyard) ait elde ettikleri 105 *Lactobacillus* izolatının çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarını broth mikrodilüsyon yöntemi aracılığıyla değerlendirmişler ve sırasıyla ticari broyler ve halk elinde beslenen tavuklarda eritromisine gözlenen direnci %86.95, %38.98 olarak belirtmişlerdir.

Souza ve ark. (2007), ticari broylerlerin (%41) free-range tavuklara (%33,9) göre test edilen antibiyotiklere daha yüksek oranda direnç gösterdiğini bildirmişlerdir.

Bu tez çalışmasında eritromisin ve tylosin için MİK değerlerinin bimodal dağılımı dirençli ve duyarlı izolatları belirleyecek şekilde belirgin gözlenmiş ve linkomisin için MİK değeri 64 µg/ml ve yukarısı, tylosin için ise MİK değeri 16 µg/ml ve yukarısında olan izolatların dirençli olduğu kabul edilmiştir. Eritromisin ve tylosin için MİK değerlerinin belirgin bimodal dağılımının kazanılmış direnci işaret ettiği, diğer araştırmacılar tarafından da çeşitli kaynaklardan elde edilen MLS dirençli laktobasillerde rapor edilmiştir (Chin ve ark. 2005).

Çalışmada; eritromisin, klindamisin, linkomisin, tylosin ile virjinamisin antibiyotiklerine direnç oranları sırasıyla halk elinde beslenende %62,5, %72,9, %43,8, %18,8, %37,5, yumurtacıda %47,4, %78,9, %77,2, %40,4, %54,4 ve broylerde %87, %92,8, %91,3, %87, %73,9 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda da Saleem ve ark. (2018) ile Souza ve ark. (2007)'nın bulgularıyla örtüşen bir biçimde tüm antibiyotiklere gözlenen direncin yetiştirme şekli ile karşılaştırması önemli bulunmuş (eritromisin, linkomisin, tylosin, virjinamisin için $P<0,001$; klindamisin için $P<0,05$) ticari beslenen tavuklarda (broyler ve yumurtacı) halk elinde yetiştirilene kıyasla direnç varlığının daha yüksek olduğu görülmüştür. Entansif (ticari) üretim modeli ile tavukların bağırsağında yüksek oranda antimikrobiyallere dirençli bakterilerin varlığı arasında bir ilişkinin bulunduğunu akla getirmekte olup, bu hipotez Bedford, Edens ve Wage tarafından desteklenmektedir (Souza ve ark. 2007).

Dilik ve ark. (2010), tarafından belirtildiği üzere kinopristin/dalfopristine görülen düşük direnç oranının, virjinamisin kullanımının ülkemizde Avrupa ülkelerine kıyasla daha az olması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Yemlerde katkı maddesi olarak virjinamisin kullanımı olmamasına rağmen, direncin halen devam etmesi, broylerlerde kümeslerin infeksiyondan arındırılması ve temizlenmesiyle dahi dirençli bakteri klonlarındaki yaşamlarını sürdürmesi ile kümeslere devamlı olarak yeni gelen sürüler arasında dirençli klonların transferiyle açıklanmaktadır. Ülkeler kıyaslandığında antibiyotik direnç dağılımındaki değişikliklere, tedavi amacıyla kullanılan

antibiyotiklerdeki ve antimikrobiyal kullanım politikalarındaki farklılığın sebebiyet verdiği düşünülmektedir.

Souza ve ark. (2007), disk difüzyon metoduyla gerçekleştirdikleri antibiyotik duyarlılık testi sonucu eritromisine en yüksek direncin gözlendiği başlıca türün *Lactobacillus reuteri* olduğunu gözlemlemişlerdir.

Sornplang ve ark. (2016), gıda üreten hayvanlardan izole edilen *Lactobacillus* türlerinden en dirençlilerinin (en az 3 antibiyotiğe) *L.salivarus* ve takibinde *L.reuteri* olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada da, test edilen antibiyotiklere en dirençli türler başlıca; halk elinde beslenenlerde *L.salivarus* ve *L.agilis,* yumurtacılarda *L.salivarus, L.agilis* ve *L.vaginalis*, broylerde ise *L.salivarus, L.vaginalis* ve *L.reuteri* olarak tespit edilmiştir.

Klose ve ark. (2014), MİK değerlerini belirlemek amacıyla broth mikrodilüsyon yöntemini gerçekleştirmiş ve saptanan cut-off verilerini EFSA Paneli (FEEDAP, 2012) ile değerlendirmişlerdir. *L.murinus* türü üyelerine ait herhangi MİK verisi bulunmadığından, çalışmada "homofermentatif türler" genel kategorisindeki *(L.murinus* gibi nadir olarak incelenen türlerin dahil olmadığı) FEEDAP cutt-off değerlerini baz alarak değerlendirme yapmışlardır. İlave olarak düşük sayıdaki izolatların, bu belirli türlerde antibiyotik direnç/duyarlılık modelini kesin olarak belirlenmesini imkansız hale getirdiğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda da tek sayıda izole edilen *L.colehominis, L. saerimneri, L.gallinarum, L. delbrueckii, L.panis* gibi türler sırasıyla FHE, OHO, OHO, OHO, OHE kategorilerine dahil olmalarına rağmen FEEDAP için cut-off değerlerinde farklılık bulunmamaktadır. Klose ve ark. (2014), bulgularıyla paralel olarak kanatlı orjinli nadir izole edilen türlere ait yapılacak değerlendirmenin sayı azlığı sebebiyle sağlıklı olmadığı düşünülmektedir.

Gerçekleştirilen fenotipik testler, bakteriyel suşların antibiyotik direnç belirleyicilerinin varlığı yönünden doğrudan tarandığı moleküler yöntemlerle tamamlanmaktadır. Bu yöntemler arasında; tek veya çoklu antibiyotik direnç genleri için spesifik primerlerle polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) aracılığıyla amplifikasyonu,

real time PCR veya büyük antibiyotik direnç gen koleksiyonları içeren DNA mikrodizilerinin kullanımı yer almaktadır (Moračanin ve ark. 2017).

Fenotipik ve genotipik direnç bulgularının uyumu halinde durumun açıklığa kavuştuğu vurgulanmaktadır. Buna rağmen, fenotipik olarak dirençli bakteriler genotipik yönden duyarlı olabilmektedir. Bu durum genellikle, uygun genler test içeriğine dahil edilmediğinde veya bilinmeyen direnç genleri varlığı olgularında gözlenmektedir. Buna karşın, duyarlı bir fenotip, genotiplendirme ile gözlenen sessiz genleri de taşıyabilmektedir. Antibiyotik direncindeki sessizlik, bir promotör bölgesinde aşağı regülasyondan veya diğer mekanizmalardan kaynaklı olabilmektedir. "Sessiz genlere" rağmen, aktif hale gelebilecekleri diğer türlere transfer edilebildiklerinden, halen potansiyel bir endişe kaynağı olabilmektedirler (Korhonen 2010).

Çalışmada MLS antibiyotiklere dirençten sorumlu ve önceden yapılmış araştırmalarda sıklıkla rastlanan erm (A), erm (B) ve erm (C) olmak üzere üç genin varlığı yönünden tüm izolatları kapsayacak şekilde değerlendirilmeye gidilmiştir. Halk elinde beslenen, yumurtacı ve broiler yetiştiricilikte erm (B)-erm (C) direnç geni varlığı sırasıyla; %27,1-%37,5, %70,2-%71,9, %76,8-%55,1 olarak saptanmıştır. Erm (A) direnç geni varlığına sadece broiler tavuğa ait 1 *Lactobacillus vaginalis* izolatında rastlanmıştır. Yetiştirme şekillerinin direnç oranlarıyla istatistiki karşılaştırmasında erm (B) ve erm (C) için fark önemli ($P<0,05$) bulunurken erm (A) için önemli bulunmamıştır. Sebebinin direnç geni sayısı azlığı olduğu kanısına varılmıştır.

Dec ve ark. (2017), fenotipik dirençle karakterize *Lactobacillus* suşlarının büyük çoğunluğunun ilgili genleri de taşıdığını belirtmişlerdir. Erm genlerinin PCR ile araştırılması sonucu izolatların %39'unun erm (B) ve % 12'sinin erm (C) direnç genini taşıdığı görülmüştür.

Preethi ve ark. (2017); organik tavuk dışkısı, organik tavuk bağırsağı ile geleneksel yetiştirilmiş tavuk dışkısı, geleneksel yetiştirilmiş tavuk bağırsağından izole etmiş oldukları Laktobasillerde erm (B) [indüklenebilir veya konstitütif makrolide-lincosamide-streptogramin B (MLSB) dirençli fenotip] direnç genini tüm çalışmalarında en sıklıkla saptamıştır.

Garofalo ve ark. (2007), aynı hayvanlara ait 88 tavuk ve domuz etinden ve 20 adet dışkıdan aldıkları örneği PCR ve Nested PCR ile direnç genleri varlığı yönünden incelemişlerdir. Tüm örneklerde erm genleri erm (B) ve erm (C) hepsinde daha sonrasında ise erm (A) olacak şekilde saptanmıştır. Çalışma sonucunda en sıklıkla saptanan direnç geninin erm (B) olduğu ifade edilmiştir. Benzer şekilde çalışmada en sıklıkla saptanan direnç genleri erm (B) ile erm (C) ve son olarak da erm (A) olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları; diğer başka araştırmacıların (Lin ve ark. 1999; Dec ve ark. 2017) da belirttiği gibi kanatlılarda izole edilen laktobasillerde en sık rastlanan erm geninin erm (B) olduğunu broyler yetiştiricilik için desteklemekle birlikte, broyler harici yetiştiriciliklerde en fazla saptanan direnç geni erm (C) olarak belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında; halk elinde beslenen tavuklarda eritromisine fenotipik dirençli (MİK>1) 30 izolattan 17'sinin ilgili erm (B) ile erm (C) direnç direnç genlerini [en az 1'i(15), 2'sini de(2)], yumurtacılarda 27 izolattan 25'inin ilgili erm (B) ile erm (C) direnç genlerini [en az 1'i(10), 2'sini de(15)] ve broylerde 60 izolattan 51'inin ilgili erm (A), erm (B) ile erm (C) direnç genlerini [en az 1'i(24), 2'sini(26), 3'ünü(1)] taşıdığı bulunmuştur. Bunun yanında halk elinde beslenen eritromisine fenotipik duyarlı 18 izolattan 7'sinin, yumurtacıda 30 izolattan 3'ünün ve broylerde 9 izolattan hiçbirinin olmak üzere erm (B) ile erm (C) direnç genlerini taşımadığı saptanmıştır.

Halk elinde beslenen tavuklarda klindamisine fenotipik dirençli (MİK>1) 35 izolattan 24'ünün ilgili erm (B) ile erm (C) direnç direnç genlerini [en az 1'i(21), 2'sini de(3)], yumurtacılarda 45 izolattan 40'ının ilgili erm (B) ile erm (C) direnç genlerini [en az 1'i(14), 2'sini de(26)] ve broylerde 64 izolattan 56'sının ilgili erm (A), erm (B) ile erm (C) direnç genlerini [en az 1'i(26), 2'sini(29), 3'ünü(1)] taşıdığı bulunmuştur. Bunun yanında halk elinde beslenen klindamisine fenotipik duyarlı 13 izolattan 9'unun, yumurtacıda 12 izolattan hiçbirinin ve broylerde 5 izolattan 1'inin olmak üzere erm (B) ile erm (C) direnç genlerini taşımadığı saptanmıştır.

Halk elinde beslenen tavuklarda linkomisine fenotipik dirençli (MİK>64) 21 izolattan 16'sının ilgili erm (B) ile erm (C) direnç direnç genlerini [en az 1'i(13), 2'sini

de(3)], yumurtacılarda 44 izolattan 40'ının ilgili erm (B) ile erm (C) direnç genlerini [en az 1'i(15), 2'sini de(25)] ve broylerde 63 izolattan 55'inin ilgili erm (A), erm (B) ile erm (C) direnç genlerini [en az 1'i(26), 2'sini(28), 3'ünü(1)] taşıdığı bulunmuştur. Bunun yanında halk elinde beslenen linkomisine fenotipik duyarlı 27 izolattan 15'sinin, yumurtacıda 13 izolattan 1'inin ve broylerde 6 izolattan 1'inin olmak üzere erm (B) ile erm (C) direnç genlerini taşımadığı saptanmıştır.

Halk elinde beslenen tavuklarda tylosine fenotipik dirençli (MİK>16) 9 izolattan 8'inin ilgili erm (B) ile erm (C) direnç direnç genlerini [en az 1'i(7), 2'sini de(1)], yumurtacılarda 23 izolattan 22'sinin ilgili erm (B) ile erm (C) direnç genlerini [en az 1'i(7), 2'sini de(15)] ve broylerde 60 izolattan 53'ünün ilgili erm (A), erm (B) ile erm (C) direnç genlerini [en az 1'i(25), 2'sini(27), 3'ünü(1)] taşıdığı bulunmuştur. Bunun yanında halk elinde beslenen tylosine fenotipik duyarlı 39 izolattan 19'unun, yumurtacıda 34 izolattan 4'ünün ve broylerde 9 izolattan 2'sinin olmak üzere erm (B) ile erm (C) direnç genlerini taşımadığı saptanmıştır.

Halk elinde beslenen tavuklarda virjinamisine fenotipik dirençli (MİK>4) 18 izolattan 13'ünün ilgili erm (B) ile erm (C) direnç direnç genlerini [en az 1'i(12), 2'sini de(1)], yumurtacılarda 31 izolattan 28'inin ilgili erm (B) ile erm (C) direnç genlerini [en az 1'i(12), 2'sini de(16)] ve broylerde 51 izolattan 44'ünün ilgili erm (A), erm (B) ile erm (C) direnç genlerini [en az 1'i(25), 2'sini(19), 3'ünü(0)] taşıdığı bulunmuştur. Bunun yanında halk elinde beslenen virjinamisin fenotipik duyarlı 30 izolattan 15'inin, yumurtacıda 26 izolattan 2'sinin ve broylerde 18 izolattan 2'sinin olmak üzere erm (B) ile erm (C) direnç genlerini taşımadığı saptanmıştır.

Bu çalışmaya sıklıkla rastlanan 3 gen dahil edildiğinden, fenotipik olarak dirençli olduğu halde genotipte belirlenemeyen izolatların erm (A), erm (B) ve erm (C) haricinde var olan diğer direnç genleri sebepli olabileceği düşünülmektedir. Fenotipik ve genotipik direnç korelasyonda görülen uyumsuzluklar; EFSA yönergesinin bu alanda ihtiyaçlara yeterince cevap vermediğini ve dünyada yapılacak araştırma verileri sayesinde daha fonksiyonel hale gelebileceğini de akla getirmektedir.

Campedelli ve ark. (2019), broth mikrodilüsyon yöntemini kullanarak, 197 genusa ait Laktobasil izolatının antibiyotiklere duyarlılığını araştırmışlardır. Çalışma, birçok olguda halen antibiyotik direncinin genetik temelinin bilinemediğini ve ilişkili fenotipik sonucu açıklayabilecek bilinen hiçbir gen bulunmadığını açığa çıkarmıştır. Ayrıca çalışmadaki suşların büyük çoğunluğunda (%88) antibiyotik direncinin saptanmasında EFSA yönergesiyle uyum göstermediği saptanmıştır. PCR aracılığıyla gerçekleştirilen genotipik analiz ile duyarlılık testinin standart metodlarıyla belirlenen fenotip bulgular arasındaki uyumsuzluk; fenotipik testlerin, duyarlı LAB suşlarında aktarılabilir AR genleri yokluğunun belirlenmesinde başarısının yeterli düzeyde olmadığına işaret etmektedir.

Bu çalışmanın sonucu olarak; izole edilen Laktobasillus türlerinin seçilmiş antibiyotiklere değişen düzeylerde duyarlılık/dirençlilik göstermesi, bu çeşitlilik gösteren bulguların günümüze değin Laktobasillus türleri için halen standart antibiyotik duyarlılık testi bulunmayışı kaynaklı olabileceğini akla getirmektedir. Çalışmamız tavukların florasında, besin zincirinin ve çevrenin bu yolla kontamine olduğunu gösteren yüksek düzeyde seçili antibiyotiklere karşı dirence sahip Laktobasillus mevcudiyetini göstermiştir. Direnç prevalansının yüksek oluşunun, büyük ölçüde düzensiz/kontrolsüz şekilde antibiyotiklerin tedavi ve bakteriyel infeksiyonların kontrolünde kullanılması sebepli olduğu düşünülmektedir. Daha önceden belirtildiği üzere bu bakteriler, direnç determinantlarını patojenlerin de dahil olmasıyla birlikte toplum sağlığı açısından tehdit oluşturacak şekilde diğer başka bakterilere aktarabilme yeteneğine sahiptirler. Bu durum; direncin yayılmasını sınırlamak amacıyla gıda üreten hayvanları kapsayacak şekilde, antimikrobiyal kullanımının ulusal/uluslararası kapsamda denetimi aracılığıyla acil ve kararlı eylem planı yapılmasını gerekli kılmaktadır.

KAYNAKLAR

Abdel-Rahman, H., Shawky, S., Ouda, H., Nafeaa, A., Orabi, S. **(**2013). Effect of two probiotics and bioflavonoids supplementation to the broilers diet and drinking water on the growth performance and hepatic antioxidant parameters. *Global Veterinaria,* 10(6): 734–741.

Afsharmanesh, M., Sadaghi, B. (2014). Effects of dietary alternatives (probiotic, green tea powder and Kombucha tea) as antimicrobial growth promoters on growth, ileal nutrient digestibility, blood parameters, and immune response of broiler chickens. *Comparative Clinical Pathology,* 23(3): 717–724.

Agyare, C., Boamah, V.E., Zumbi, C.N., Osei, F.B. (2018). Antibiotic use in poultry production and its effects on bacterial resistance. *Intechopen.* DOI:10.5772/intechopen.79371.

Ahir, V.B., Singh, K.M., Tripathi, A.K., Mathakiya, R.A., Jakhesara, S.J., Koringa, P.G., Rank, D.N., Jhala, M.K., Joshi, C.G. (2012). Study of bacterial diversity in poultry gut using denaturing gradient gel electrophoresis. *Iranian Journal of Applied Animal Science,* 2(3): 227-232.

Ahn, Y.T., Lim, K.L., Ryu, J.C., Kang, D.K., Ham, J.S., Jang, Y.H., Kim, H.U. (2002). Characterization of Lactobacillus acidophilus isolated from piglets and chicken. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 15: 1790–1797.

Al-Mustafa, Z.H., Al-Ghamdi, M.S. (2002). Use of antibiotics in the poultry industry in Saudi Arabia: Implications for public health. *Annals of Saudi Medicine,* 22 (1-2): 4-7.

Ammor, M.S., Florez, A.B., Hoek, A.H.A.M., Reyes-Gavilan, C.G., Aarts, H.J.M., Margolles, A., Mayo, B. (2008). Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in Lactic acid bacteria and Bifidobacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology,* 4:6–15.

An, B., Cho, B., You, S., Paik, H., Chang, H., Kim, S., Yun, C., Kang, C. (2008). Growth performance and antibody response of broiler chicks fed yeast derived β-glucan and single-strain probiotics. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 21(7): 1027–1032.

Anderson, A.C., Sanunu, M., Schneider, C., Clad, A., Karygianni, L., Hellwig, E., Al-Ahmad, A. (2014). Rapid species-level identification of vaginal and oral lactobacilli using MALDI-TOF MS analysis and 16S rDNA sequencing. *BMC Microbiology.* 14: 312.

Apata, D. (2008). Growth performance, nutrient digestibility and immune response of broiler chicks fed diets supplemented with a culture of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(7): 1253–1258.

Asli, M.M., Hosseini, S.A., Lotfollahian, H., Shariatmadari, F. **(**2007). Effect of probiotics, yeast, vitamin E and vitamin C supplements on performance and immune response of laying hen during high environmental temperature. *International Journal of Poultry Science,* 6(12): 895–900.

Aykanat, Ö. (2008).Tavuktan izole edilen *Lactobacillus* cinsi bakterilerin, çeşitli patojen bakteriler üzerine antagonistic etkisinin incelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.*

Aquilanti, L., Garofalo, C., Osimani, A., Silvestri, G., Vignaroli, C., Clementi, F. (2007). Isolation and molecular characterization of antibiotic-resistant lactic acid bacteria from poultry and swine meat products. *Journal of Food Protection.* 70(3): 557–565.

Bai, S., Wu, A., Ding, X., Lei, Y., Bai, J., Zhang, K., Chio, J. (2013). Effects of probiotic-supplemented diets on growth performance and intestinal immune characteristics of broiler chickens. *Poultry Science,* 92(3): 663-670.

Baidya, N., Mandal, L., Banerjee, G.C. (1993). Efficiency of feeding antibiotic and probiotics in broilers. *Journal of Veterinary and Animal Science*, 24: 120-124.

Beijerinck, M. W. (1901). Sur les ferments lactiques de l'industrie. *Arch Néer Sci.* 6: 212-243.

Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J., Servin, A. (1994). *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut,* 35(4): 483–489.

Bibiloni, R., Pérez, P.F., Garrote, G.L., Disalvo, E.A., De Antoni, G.L. (2001). Surface characterization and adhesive properties of bifidobacteria. *Methods in Enzymology,* 336: 411–427.

Biloni, A., Quintana, C., Menconi, A., Kallapura, G., Latorre, J., Pixley, C., Layton, S., Dalmagro, M., Hernandez-Velasco, X., Wolfenden, A. (2013). Evaluation of effects of EarlyBird associated with FloraMax-B11 on *Salmonella Enteritidis*, intestinal morphology, and performance of broiler chickens. *Poultry Science*, 92(9): 2337–2346.

Biswas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C., Ray, B. (1991). Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, Pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici*. *Applied and Environmental Microbiology*. 57(4): 1265-1267.

Bjerrum, L., Engberg, R.M., Leser, T.D., Jensen, B.B., Finster, K., Pedersen, K. (2006). Microbial Community Composition of the Ileum and Cecum of Broiler Chickens as Revealed by Molecular and Culture-Based Techniques. *Poultry Science*, 85: 1151-1164.

Blok, M.C., Vahl, H.A., De Lange, L., Van de Braak, A.E., Hemke, G., Hessing, M. (Eds.). (2002). *Nutrition and health in the gastrointestinal tract. Wageningen: Wageningen Academic Publishers.* pp.37-69.

Bolder, N., Van Lith, L., Putirulan, F., Jacobs-Reitsma, W., Mulder, R.(1992). Prevention of colonization by *Salmonella enteritidis* PT4 in broiler chickens. *International Journal of Food Microbiology,* 15(3): 313–317.

Borchers, A.T., Selmi, C., Meyers, F.J., Keen, C.L., Gershwin, M.E. (2009). Probiotics and immunity. *Journal of Gastroenterology,* 44(1): 26–46.

Campedelli, I., Mathur, H., Salvetti, E., Clarke, S., Rea, C.M., Torriani, S., Ross, R.P., Hill, C., O'Toole, P.W. (2019). Genus-Wide Assessment of Antibiotic Resistance in *Lactobacillus spp.. Applied and Environmental Microbiology*, 85:e01738-18.

Cao, G.T., Zeng, X.F., Chen, A.G., Zhou, L., Zhang, L., Xiao, Y.P., Yang, C.M. (2013). Effects of a probiotic, *Enterococcus faecium*, on growth performance, intestinal morphology, immune response, and caecal microflora in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88. *Poultry Science,* 92(11): 2949–2955.

Capcarova, M., Chmelnicna, L., Kolesarova, A., Massanyi, P., Kovacik, J. (2010). Effects of *Enterococcus faecium* M 74 strain on selected blood and production parameters of laying hens. *British Poultry Science,* 51(5): 614–620.

Cauwerts, K., Pasmans, F., Devriese, L.A., Martel, A., Haesebrouck, F., Decostere, A. (2006). Cloacal Lactobacillus isolates from broilers show high prevalence of resistance towards macrolide and lincosamide antibiotics, *Avian Pathology*, 35:02, 160-164.

Chawla, S., Katoch, S., Sharma, K., Sharma, V. (2013). Biological response of broiler supplemented with varying dose of direct fed microbial. *Veterinary World*, 6(8): 521–524.

Chen, J., Fluharty, F.L., St-Pierre, N., Morrison, M., Yu, Z. (2008).Technical note: Occurrence in fecal microbiota of genes conferringresistance to both macrolide-lincosamide-streptogramin Band tetracyclines concomitant with feeding of beef cattle with tylosin. *Journal of Animal Science,* 86: 2385-2391.

Chin, C.S., Abdullah, N., Tan, S.W., Wan, Y.H. (2005). Plasmid profiling and curing of *Lactobacillus* strains isolated from the gastrointestinal tract of chicken. *The Journal of Microbiology*, 43(3): 251-256.

Coconnier, M.H., Klaenhammer, T., Kerneis, S., Bernet, M., Servin, A. (1992). Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Applied Environmental and Microbiology,* 58(6): 2034–2039.

Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M., Vernoux, J. (2003). Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products*. Le Lait, INRA Editions,* 83(4): 269-306.

Coillie, E.V., Goris, J., Cleenwerck, I., Grijspeerdt, K., Botteldoorn, N., Immerseel, F.V.,Buck, J.D., Vancanneyt, M., Swings, J., Herman, L., Heyndrickx, M. (2007). Identification of lactobacilli isolated from the cloaca and vagina of laying hens and characterization for potential use as probiotics to control *Salmonella* Enteritidis. *Journal of AppliedMicrobiology*, 102:1095-1106.

Corr, S.C., Li, Y., Riedel, C.U., O'Toole, P.W., Hill, C., Gahan, C.G. (2007). Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America,* 104(18): 7617– 7621.

Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews in Microbiology*, 3(10): 777–788.

Çataloluk, O., Gogebakan, B. (2004). Presence of drug resistance in intestinal lactobacilli of dairy and human origin in Turkey. *FEMS Microbiology Letters*, 236(1):7-12.

Dalloul, R., Lillehoj, H., Shellem, T., Doerr, J. (2003). Enhanced mucosal immunity against *Eimeria acervulina* in broilers fed a Lactobacillus-based probiotic. *Poultry Science,* 82(1): 62–66.

Dec, M., Nowaczek, A., Stępień-Pyśniak, D., Jacek Wawrzykowski, J., Urban-Chmiel, R. (2018). Identification and antibiotic susceptibility of lactobacilli isolated from turkeys. *BMC Microbiology*, 18:168.

Dec, M., Puchalski, A., Urban-Chmiel, R., Wernicki, A. (2016). 16S-ARDRA and MALDI-TOF mass spectrometry as tools for identification of *Lactobacillus* bacteria isolated from poultry. *BMC Microbiology.* 16: 105.

Dec, M., Urban-Chmiel, R., Stepien-Pysniak, D., Wernicki, A. (2017). Assessment of antibiotic susceptibility in *Lactobacillus* isolates from chickens. *Gut Pathogens.* 9:54.

Dec, M., Wernicki, A., Puchalski, A., Urban-Chmiel, R. (2015). Antibiotic susceptibility of Lactobacillus strains isolated from domestic geese. *British Poultry Science*. 56 (4): 416-424.

Demir, E., Kılıç, G.B., Uşan, E. (2018). Farklı gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik direnç profilleri. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi.* 9(2): 197-204.

Demirok, T.N. (2014). Bebeklerden izole edilen *Lactobacillus spp.*'nin fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi. *Doktora tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.*

Denev, S.A. (2006). Role of Lactobacilli in Gastrointestinal Ecosystem. *Bulgarian Journal of Agricultural Science.* 12: 63-114.

De Souza, F.V., Roque, R., Moreira, J.L.S., De Souza, M.R., Nicoli, J.R., Neumann, E., Nunes, A.C. (2012). Transfer of antibiotic resistance determinants between actobacilli isolates from the gastrointestinal tract of chicken. *Beneficial Microbes,* 3(2): 137-144.

Diaz-Sanchez, S., Moscoso, S., Santos, F.S., Andino, A., Hanning, I. (2015). Antibiotic use in poultry; A driving force for organic poultry production. *Food Protection Trends.* 35 (6): 440-447.

Dilik, Z., İstanbulluoğlu, E. (2010). Entansif Broyler İşletmeleri İle Kırsal Tavukçuluk İşletmelerindeki Hayvanlardan İzole Edilen Enterokokların Fenotipik Ve Genotipik Özellikleri Üzerinde Çalışmalar. *Bornova Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü Dergisi,* 32(46): 37-46.

Dizaji, S.B., Pirmohammadi, R. **(**2009). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and Bioplus 2B on performance of laying hens. *International Journal of Agricultural Biology,* 11(4): 495–497.

Doron, S., Snydman, D.R. **(**2015). Risk and Safety of Probiotics. *Clinical Infectious Diseases,* 60 (suppl. 2): 129–134.

Drago, L., Mattina, R., Nicola, L., Rodighiero, V., Vecchi, E.D. (2011). Macrolide Resistance and In Vitro Selection of Resistance to Antibiotics in *Lactobacillus* Isolates. *The Journal of Microbiology*, 49(4): 651-656.

Dušková, M., Šedo, O., Kšicová, K., Zdráhal, Z. (2012). Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and Maldi-Tof Ms. *International Journal of Food Microbiology.* 159 (2): 107-14.

Egervärn, M., Roos, S., Lindmark, H. (2009). Identification and characterization of antibiotic resistance genes in *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology.* 107: 1658-1668.

European Food Safety Authority. EFSA(2012). Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J*. 10: 2740 –2750.

Fajardo, P., Pastrana, L., Mendez, J., Rodriguez, I., Fucinos, C., Guerra, N. P. (2012). Effects of feeding of two potentially probiotic preparations from lactic acid bacteria on the performance and faecal microflora of broiler chickens. *TheScientific World Journal*, Art. No. 562635. doi:10.1100/2012/562635.

FAO (2016). Probiotics in animal nutrition – Production, impact and regulation. FAO Animal Production and Health Paper No. 179, ed. Makkar P. S. Harinder (Rome: FAO).

FAO/WHO (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food, Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf

Felis, G.E., Dellaglio, F. (2015). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Curr Issues Intestinal Microbiology,* 8:44–61.

Ferrario, C., Mancabelli, L., Gering, E., Mangifesta, M. (2017). Untangling the cecal microbiota of feral chickens by culturomic and metagenomic analyses. *Environmental Microbiology*, 19(11).

Flynn, S., Van Sinderen, D., Thornton, G.M., Holo, H., Nes, I.F., Collins, J.K. (2002). Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. *Microbiology,* 148(4): 973–984.

Foschi, C., Laghi, L., Parolin, C., Giordani, B., Compri, M., Cevenini, R., Marangoni, A., Vitali, B. (2017). Novel approaches for the taxonomic and metabolic characterization of lactobacilli: Integration of 16S rRNA gene sequencing with MALDI-TOF MS and ^{1}H-NMR. *PLOS ONE* 12(2): e0172483.

Galdeano, C.M., Perdigon, G. (2006). The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. *Clinical Vaccine Immunology,* 13(2): 219–226.

Gallazzi, D., Giardini, A., Mangiagalli, M.G., Marelli, S., Ferrazzi, V., Orsi, C., Cavalchini, L.G. (2009). Effects of *Lactobacillus acidophilus* D2/CSL on laying hen performance. *Italian Journal of Animal Science,* 7(1): 27–38.

Garofalo, C., Vignaroli, C., Zandri, G., Aquilanti, L., Bordoni, D., Osimani, A., Clementi, F., Biavasco, F. (2007). Direct detection of antibiotic resistance genes in specimens of chicken and pork meat. *International Journal of Food Microbiology.* 113: 75–83.

Gevers, D. (2002). Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausaages. *Doctoral Thesis.Ghent University, Department of Biochemistry, Physiology and Microbiology, Faculty of Sciences.*

Ghareeb, K., Awad, W., Mohnl, M., Porta, R., Biarnes, M., Böhm, J., Schatzmayr G. (2012). Evaluating the efficacy of an avian-specific probiotic to reduce the colonization of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. *Poultry Science,* 91(8): 1825–1832.

Giannenas, I., Papadopoulos, E., Tsalie, E., Triantafillou, E., Henikl, S., Teichmann, K., Tontis, D. **(**2012). Assessment of dietary supplementation with probiotics on performance, intestinal morphology and microflora of chickens infected with *Eimeria tenella*. *Veterinary Parasitology,* 188(1/2): 31–40.

Goldstein, E.J.C., Tyrrell, K.L., Citron, D.M. (2015). Lactobacillus species: Taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases*. 60 (2): 98–107.

Green, M.R., Sambrook, J. (2012). *Moleculer cloning; a laboratory manual.* New York: Fourth Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Guan, L.L., Hagen, K.E., Tannock, G.W., Korver, D.R., Fasenko, G.M., Allison, G.E. (2003). Detection and identification of *Lactobacillus* species in crops of broilers of different ages by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Applied and Environmental Microbiology.* 69(11):6750-7.

Gueimonde, M., Sanchez, B., Reyes-Gavilan, C.G., Margolles, A. (2013). Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology.* 4: 202.

Haddadin, M., Abdulrahim, S., Hashlamoun, E., Robinson, R. (1996). The effect of *Lactobacillus acidophilus* on the production and chemical composition of hen's eggs. *Poultry Science,* 75(4): 491–494.

Hagen, K.E., Guan, L. L., Tannock, G. W., Korver, D.R., Allison, G. E. (2005). Detection, characterization, and in vitro and in vivo expression of genes encoding S-proteins in *Lactobacillus gallinarum* strains isolated from chicken crops. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6633–6643.

Haghighi, H. R., Abdul-Careem, M. F., Dara, R. A., Chambers, J.R., Sharif, S. (2008). Cytokine gene expression in chicken caecal tonsils following treatment with probiotics and *Salmonella* infection. *Veterinary Microbiology,* 126(1): 225–233.

Halkman, K. (1991). Tarım Mikrobiyolojisi, *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*. 1214: 82.

Hammes, W.P., Hertel, C. (2006). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *Prokaryotes*, 4:320–403.

Hassan, M., Kjos, M., Nes, I., Diep, D., Lotfipour, F. (2012). Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology,* 113(4): 723–736.

Hofvendahl, K, Hahn-Hägerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 87–107.

Hotel, A. , Cordoba, A. (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live Lactic acid bacteria. *Prevention*, 5: 1-10.

Hudault, S., Liévin, V., Bernet-Camard, M.F., Servin, A.L. (1997). Antagonistic activity exerted *in vitro* and *in vivo* by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Applied Environmental Microbiology,* 63(2): 513–518.

Johnson-Henry, K.C., Hagen, K.E., Gordonpour, M., Tompkins, T.A., Sherman, P.M. (2007). Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 adhesion to epithelial cells. *Cellular Microbiology,* 9(2): 356–367.

Hofacre, C.L., Fricke, J.A., Inglis, T. (2013).Antimicrobial drug use in poultry. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, Fifth edition, pp.569-587, Wiley Blackwell.

Hughes, D.T., Sperandio, V. (2008). Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nature Reviews in Microbiology,* 6(2): 111–120.

Hung, A.T., Lin, S.Y., Yang, T.Y., Chou, C.K., Liu, H.C., Lu, J.J., Wang, B., Chen, S.Y., Lien, T.F. (2012). Effects of *Bacillus coagulans* ATCC 7050 on growth performance, intestinal morphology, and microflora composition in broiler chickens. *Animal Production Science*, 52(9): 874–879.

IBM SPSS (2017). IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.

International Organization of Standardization/International Dairy Federation (ISO 10932/IDF 223) (2010). Milk and Milk Products. Determination of the minimal inhibitory concentration (Mic) of antibiotics applicable to Bifidobacteria and Non-Enterococcal Lactic Acid bacteria (Lab). 1st Edn. (Geneva, Switzerland, ISO and IDF).

Jayaraman, S., Thangavel, G., Kurian, H., Mani, R., Mukkalil, R., Chirakkal, H. (2013). *Bacillus subtilis* PB6 improves intestinal health of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. *Poultry Science*, 92(2): 370–374.

Jin, L., Ho, Y., Abdullah, N., Jalaludin, S. (2000). Digestive and bacterial enzyme activities in broilers fed diets supplemented with Lactobacillus cultures. *Poultry Science,* 79(6): 886–891.

Jose, N.M., Bunt, C.R., Hussain, M.A. (2015). Implications of antibiotic resistance inprobiotics. *Food Reviews International*. 31: 52–62.

Jose, N.M. (2015). Isolation, screening and characterization of probiotic isolates from commercial dairy food and bovine rumen. *Doctoral Thesis. Lincoln University, Department of Wine, Food and Molecular Biosciences, Faculty of Agriculture and Life Sciences.*

Kabir, S.M.L. Rahman, M.M., Rahman, M.B. (2005). Potentiation of probiotics in promoting microbiological meat quality of broilers. *Journal of Bangladesh Society for Agricultural Science Technology*, 2: 93-96.

Kabir, S.L.M. (2009). The role of probiotics in the poultry industry. *International Journal of Molecular Sciences,* 10: 3531-3546.

Kant, R., Blom, J., Palva, A., Siezen, R.J., Vos, W.M. (2010). Comparative genomics of *Lactobacillus*. *Microbial Biotechnology,* 4(3): 323–332.

Keskinöz, C. (2010). Tavuk çiftliğinden Enterobacterıaceae üyelerinin izolasyonu ve dirençlilik dağılımı. *Yükseklisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı.*

Kıran, F., Osmanağaoğlu, Ö. (2011). Laktik asit bakterilerinin (LAB) identifikasyonunda / tiplendirmesinde kullanılan moleküler yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi.*27 (1): 62-74.

Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., Hildebrandt, B., Müller-Bertling, S., Witte, W., Goossens, H. (2007). Antimicrobial susceptibilities of Lactobacillus, Pediococcus and Lactococcus human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 59 (5): 900–912.

Klose, V., Bayer, K., Kern, C., Goelβ, F., Fibi, S., Wegl, G. (2014). Antibiotic resistances of intestinal lactobacilli isolated from wild boars. *Veterinary Microbiology,* 168: 240-244.

Kobierecka, P.A., Wyszyńska, A.K., Aleksandrzak-Piekarczyk, T., Kuczkowski, M., Tuzimek, A., Piotrowska, W., Gorecki, A., Adamska, I., Wieliczko, A., Bardowski, J., Jagusztyn-Krynicka, E. (2017). In vitro characteristics of *Lactobacillus spp.* strains isolated from the chicken digestive tract and their role in the inhibition of *Campylobacter* colonization. *Microbiology Open*, 6:e512.

Kontula, P., Suihko, M.L., Suortti, T., Tenkanen, M., Sandholm, T.M., Wright, A. (2000). The isolation of lactic acid bacteria from human colonic biopsies after enrichment on lactose derivatives and rye arabinoxylo-oligosaccharides. *Food Microbiology,* 17 (1): 13-22.

Korhonen, J. (2010). Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria. *Doctoral Thesis. University of Eastern Finland, Department of Biosciences, Faculty of Forestry and Natural Sciences.*

Korhonen, J.M., Sclivagnotis Y., Von Wright A. (2007). Characterization of dominant cultivable lactobacilli and their antibiotic resistance profiles from faecal samples of weaning piglets. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 2496–2503.

Kumprechtova, D., Zobac, P., Kumprecht, I. (2000). The effect of Saccharomyces cerevisiae Sc47 on chicken broiler performance and nitrogen output. *Czech Journal of Animal Science*, 45(4): 169-177.

Kurtoglu, V., Kurtoglu, F., Seker, E., Coskun, B., Balevi, T., Polat, E.(2004). Effect of probiotic supplementation on laying hen diets on yield performance and serum and egg yolk cholesterol. *Food Additves and Contamination,* 21(9): 817–823.

Kurt, Ş., Zorba, Ö. (2005). Bakteriyosinler ve Gıdalarda Kullanım Olanakları. *YYÜ Veterinerlik Fakültesi Dergisi*. 16 (1): 77-83.

Kutsal, A., Alpan, O., Arpacık, R. (1990) İstatistik Uygulamalar, *Bizim Büro Basımevi, Ankara.*

Landoni, M.F., Albarellos, G. (2015). The use of antimicrobial agents in broiler chickens. *The Veterinary Journal.* http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.tvjl.2015.04.016.

Lan, P.T.N., Hayashi, H., Sakamoto, M., Benno, Y. (2002). Phylogenetic analysis of cecal microbiota in chicken by the use of 16S rDNA clone libraries. *Microbiology and Immunology*, 46 (6): 371-382.

Lee, C.M., Sieo, C.C., Wong, C.M.V.L., Abdullah, N., Ho, Y.W. (2008). Sequence analysis of 16S rRNA gene and 16S–23S rRNA gene intergenic spacer region for differentiation of probiotics *Lactobacillus* strains isolated from the gastrointestinal tract of chicken. *Annals of Microbiology,* 58: 133–140.

Lee, S., Lillehoj, H., Dalloul, R., Park, D., Hong, Y., Lin, J.(2007). Influence of *Pediococcus*-based probiotic on coccidiosis in broiler chickens. *Poultry Science,* 86(1): 63–66.

Lewus, C.B., Montville, T.J. (1991). Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, *Journal of Microbiology Methods*, 13: 145-150.

Lin, C.F., Chung, T.C. (1999). Cloning of erythromycin-resistance determinants and replication origins from indigenous plasmids of *Lactobacillus reuteri* for potential use in construction of cloning vectors. *Plasmid*, 42(1):31-41.

Lloyd, A., Cumming, R., Kent, R. (1977). Prevention of *Salmonella typhimurium* infection in poultry by pretreatment of chickens and poults with intestinal extracts. *Australian Veterinary Journal,* 53(2): 82–87.

Lodemann, U. (2010). Effects of Probiotics on Intestinal Transport and Epithelial Barrier Function. pp. 303 *et seq. in: Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics*. Academic Press, Waltham, USA.

Lu, J., Idris, U., Harmon, B., Hofacre, C., Maurer, J.J., Lee, M.D. (2003). Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Applied and Environmental Microbiology,* 69(11):6816-24.

Mahajan, P., Sahoo, J., Panda, P.C. (2000). Effect of probiotic (Lacto-Sacc) feeding, packaging methods and season on the microbial and organoleptic qualities of chicken meat balls during refrigerated storage. *Journal of Food Science and Technology (Mysore)*, 37 (1): 67-71.

Marteau, P. (2001). Safety aspects of probiotic products. *Scandinavian Journal of Nutrition,* 45: 22–24.

Mathur, S., Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - a review. *International Journal of Food Microbiology.*105: 281– 295.

Mayrhofer, S., Van Hoek, A.H.A.M., Mair, C., Huys, G., Aarts, H.J.M., Kneifel, W., Domig, K.J. (2010). Antibiotic susceptibility of members of the *Lactobacillus acidophilus* group using broth microdilution and molecular identification of their resistance determinants. *International Journal of Food Microbiology*. 144: 81–87.

Mayrhofer, S., Zitz, U., Birru, F.H., Gollan, D., Golos, A.K., Kneifel, W., Domig, K.J. (2014). Comparison of the CLSI guideline and ISO/IDF standard for antimicrobial susceptibility testing of Lactobacilli. *Microbial Drug Resistance,* 20(6): 591-603.

Medellin-Peña, M.J., Wang, H., Johnson, R., Anand, S., Griffiths, M.W. (2007). Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O157: H7. *Applied and Environmental Microbiology,* 73(13): 4259–4267.

Meral, H., Korukluoğlu, M. (2014). Laktik asit bakterilerinin antibiyotik direnç mekanizmaları. *U.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi.* 28 (2): 71-82.

Miller, M.B., Bassler, B.L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology,* 55(1): 165–199.

Mikulski, D., Jankowski, J., Naczmanski, J., Mikulska, M., Demey, V. **(**2012). Effects of dietary probiotic (*Pediococcus acidilactici*) supplementation on performance, nutrient digestibility, egg traits, egg yolk cholesterol, and fatty acid profile in laying hens. *Poultry Science,* 91(10): 2691–2700.

Mohan, B., Kadirvel, R., Bhaskaran, M., Natarajan, A. (1995). Effect of Probiotic Supplementation on Serum/Yolk Cholesterol and on Egg Shell Thickness in Layers. *British Poultry Science*, 36 (5): 799-803.

Mokoena, M.P. (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriosins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. *Molecules.* 22 (8): 1255.

Moračanin, S.V., Djukić, D., Zdolec, N., Milijašević, M., Mašković, P. (2017). Antimicrobial resistance of lactic acid bacteria in fermented food. *Journal of Hygienic Engineering and Design,* 18:25-35.

Morishita, T.Y., Aye, P.P., Harr, B.S., Cobb, C.W., Clifford, J.R. **(**1997). Evaluation of an avian-specific probiotic to reduce the colonization and shedding of *Campylobacter jejuni* in broilers. *Avian Diseases*, 41(4): 850–855.

Mountzouris, K. C., Balaskas, C., Xanthakos, I., Tzivinikou, A., Fegeros, K. (2009). Effects of a multi-species probiotic on biomarkers of competitive exclusion efficacy in broilers challenged with *Salmonella enteritidis*. *British Poultry Science*, 50(4): 467–478.

Niba, A., Beal, J., Kudi, A., Brooks, P. (2009). Bacterial fermentation in the gastro-intestinal tract of non-ruminants: influence of fermented feeds and fermentable carbohydrates. *Tropical Animal Health and Production*, 41(7): 1393–1407.

Noh, S.H. (1997). Effect of antibiotics, enzyme, yeast, probiotics and beta-agonist on the growth performance and nutrient availability in broilers. *Korean Journal of Animal Science*, 36: 630-638.

O'Neill, J. (2014). Review on Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Resistance; Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations.

Ouoba, L.I.I., Lei, V., Jensen, L.B. (2008). Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials: Determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. *International Journal of Food Microbiology,* 121:217-224.

Özteber, M., Başbülbül, G. (2017). Antibiotic Resistance Patterns of Lactic Acid Bacteria Isolated From Different Fermented Milk Products of Turkish Origin. *Microbiology Research Journal International,* 20 (4): 1-13.

Panda, A., Reddy, M., Rao, S.R., Praharaj, N. (2003). Production performance, serum/yolk cholesterol and immune competence of white leghorn layers as influenced by dietary supplementation with probiotic. *Tropical Animal Health and Production,* 35(1): 85–94.

Petronio, G. (2012). Study of fluoroquinolone resistance in Lactobacillus spp. *Tesi Di Dottorato. Università Degli Studi Di Catania, Dipartimento di Scienze*

Bio-Mediche Dottorato Di Ricerca Internazionale In Discipline Microbiologiche.

Preethi, C., Thumu, S.C.R., Halami, P.M. (2017). Occurrence and distribution of multiple antibiotic-resistant *Enterococcus a*nd *Lactobacillus spp.* from Indian poultry: in vivo transferability of their erythromycin, tetracycline and vancomycin resistance. *Annals of Microbiology,* 67: 395-404.

Radulović, Z., Petrović, T., Bulajić, S. (2012). Antibiotic susceptibility of probiotic bacteria. In Pana M, editor. Antibiotic resistant bacteria: a continuous challenge in the new millennium. Rijeka, Croatia: *InTech*.

Rea, M.C., Clayton, E., O'Connor, P.M., Shanahan, F., Kiely, B., Ross, R.P., Hill, C. (2007). Antimicrobial activity of lacticin 3147 against clinical *Clostridium difficile* strains. *Journal of Medical Microbiology,* 56(7): 940–946.

Saleem, N., Nawaz, M., Ghafoor, A., Javeed, A., Mustafa, A., Yousuf, M.R., Khan, I. (2018). Phenotypic and molecular analysis of antibiotic resistance in lactobacilli of poultry origin from Lahore, Pakistan. *Pakistan Veterinary Journal*, 38(4): 409-413.

Salma, U., Miah, A., Tareq, K., Maki, T., Tsujii, H. **(**2007). Effect of dietary *Rhodobacter capsulatus* on egg-yolk cholesterol and laying hen performance. *Poultry Science,* 86(4): 714–719.

Salvetti, E., Harris, H.M.B., Felis, G.E., O'Toole, P.W. (2018). Comparative genomics of the genus Lactobacillus reveals robust phylogroups that provide the basis for reclassification. *Applied and Environmental Microbiology,* 84:e00993-18.

Salvetti, E., Torriani, S., Felis, G.E. (2012). The genus Lactobacillus: a taxonomic update. *Probiotics and Antimicrobial Proteins.* 4: 217-226.

Sarıcı, B. (2015). Tavuk etlerinde genişlemiş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklere dirençli enterik bakterilerin identifikasyonu ve direnç profillerinin tespiti. *Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Aydın Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.*

Schillinger, U., Holzapfel, W.H. (2003). Culture media for lactic acid bacteria. *Handbook of Culture Media for Food Microbiology.* Chapter 8, 127-139.

Schrezenmeir, J., De Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics - approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73 (2), 361–364.

Shazali, N., Foo, H.L., Loh, T.C., Choe, D.W., Rahim, R.A. (2014). Prevalence of antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from the faeces of broiler chicken in Malaysia. *Gut Pathogens*.6:1.

Siepert, B., Reinhardt, N., Kreuzer, S., Bondzio, A., Twardziok, S., Brockmann, G., Nöckler, K., Szabó, I., Janczyk, P., Pieper, R. (2014). *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 supplementation affects intestinal immune-associated gene expression in post-weaning piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology,* 157(1): 65–77.

Snel, J., Harmsen, H.J.M., Van Der Wielen, P.W.J.J., Williams, B.A. (2002) Dietary strategies to influence the gastrointestinal microflora of young animals, and its potential to improve intestinal health. *Wageningen: Wageningen Academic Publishers.*

Snoeyenbos, G., Weinack, O.M., Smyser, C. **(**1979). Further studies on competitive exclusion for controlling salmonellae in chickens. *Avian Disease,* 23(4): 904–914.

Sornplang, P., Sakulsawasdiphan, K., Piyadeatsoontorn, S., Surasorn, B. (2016). Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from human and

food-producing animal feces in Khon Kaen Province, Thailand. *Tropical Animal Health and Production,* 48(8): 1739-1745.

Soro-Yao, A.A.,Schumann, P., Thonart, P., Dje, K.M., Pukall, R. (2014). The Use of MALDI-TOF Mass Spectrometry, Ribotyping and Phenotypic Tests to Identify Lactic Acid Bacteria from Fermented Cereal Foods in Abidjan (Côted'Ivoire). *The Open MicrobiologyJournal*, 8: 78-86.

Souza, R.M., Moreira, J.L., Barbosa, F.H.F., Cerqueira, M.M.O.P., Nunes, A.C., Nicoli, J.R. (2007). Influence of intensive and extensive breeding on lactic acid bacteria isolated from *Gallus gallus domesticus* ceca. *VeterinaryMicobiology,* 120: 142-150.

Stanley, D., Hughes, R.J., Moore, R.J. (2014). Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. *Applied Mcrobiology and Biotechnology,* 98: 4301-4310.

Stephenson, D.V., Moore, R.J., Allison, G.E. (2009). Comparison and Utilization of Repetitive-Element PCR Techniques for Typing *Lactobacillus* Isolates from the Chicken Gastrointestinal Tract. *Applied and Environmental Microbiology,* 75(21): 6764-6776.

Stiles, M.E, Holzapfel, W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. 36: 1-29.

Sutcliffe, J., Grebe, T., Tait-Kamradt, A., Wondrack, L. (1996). Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 40 (11): 2562–2566.

Tannock, G.W. (2004). A Special Fondness for Lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6): 3189-3194.

Thumu, S.C.R., Halami, P.M. (2012). Acquired resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin antibiotics in lactic acid bacteria of food origin. *Indian Journal of Microbiology,* 52 (4): 530-537.

Todorov, S.D., Dicks, L.M.T. (2006). Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria bomparison of the bacteriocins, *Process Biochemistry*. 41: 11-19.

Tuomola, E.M., Salminen, S.J. (1998). Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology,* 41(1): 45–51.

Ülger, İ., Beyzi, S.B., Kaliber, M., Konca, Y. (2015). Kanatlı sektöründe probiyotiklerin etkinliği ve geleceği. *Tavukçuluk Araştırma Dergisi,* 12 (2): 7-12.

Van der Klis, J.D, Jansman, A.J. (2002). Optimising nutrient digestion, absorption and gut barrier function in monogastrics: Reality or illusion. *Nutr Health Gastrointest tract*. p: 15–36.

Van der Wielen, P.W.J.J, Biesterveld, S., Notermans, S., Hofstra, H., Urlings, B.A.P., Van Knapen, F. (2000). Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. *Applied and Environmental Microbiology,* 66 (6): 2536-2540.

Wiedemann, I., Breukink, E., Van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Bierbaum, G., De Kruijff, B., Sahl, H.G. (2001). Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *Journal of Biological Chemistry,* 276(3): 1772–1779.

Yavuzdurmaz, H. (2007). Anne sütündeki laktik asit bakterilerinin izolasyonu, karakterizasyonu ve probiyotik özelliklerinin belirlenmesi. *Doktora Tezi. İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü.*

Yerlikaya, O. (2014). Laktik asit bakterilerinin tanılanmasında kullanılan başlıca fenotipik ve moleküler yöntemler. *Journal of Food and Feed Science – Technology.* 14: 8-22.

Yıldız, T. (2014). Tavuk etinde antibiyotik kalıntılarının Hplc yöntemiyle belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.*

Yılmaz, R., Temiz, A. (2003). *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 'un Klasik ve Moleküler Yöntemler Kullanılarak Tanımlanması ve Karakterizasyonu. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi.* 1 (3): 19-42.

Yousefi, M., Karkoodi, K. **(**2007). Effect of probiotic Thepax® and *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on performance and egg quality of laying hens. *International Journal of Poultry Science,* 6(1): 52–54.

Yörük, G.N., Güner, A. (2011). Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması ve *Weissella* türlerinin gıda mikrobiyolojisinde önemi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Derg*isi, 6(2): 163-176.

Yörük, M., Gül, M., Hayirli, A., Macit, M. **(**2004). The effects of supplementation of humate and probiotic on egg production and quality parameters during the late laying period in hens. *Poultry Science,* 83(1): 84–88.

Zhang, Z., Kim, I. (2014). Effects of multistrain probiotics on growth performance, apparent ileal nutrient digestibility, blood characteristics, cecal microbial shedding, and excreta odor contents in broilers. *Poultry Science*, 93(2): 364–370.

Zhao, X., Guo, Y., Guo, S., Tan, J. (2013). Effects of *Clostridium butyricum* and *Enterococcus faecium* on growth performance, lipid metabolism, and cecal microbiota of broiler chickens. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 97(14): 6477–6488.

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O'Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanebe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Ganzle, M.G., Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology,* 70(4): 2782-2858.

Xu, C.L., Ji, C., Ma, Q., Hao, K., Jin, Z.Y., Li, K. (2006). Effects of a dried *Bacillus subtilis* culture on egg quality. *Poultry Science,* 85(2): 364–368.

HAM VERİLER

UltrafleXtreme MALDI TOF mass spectrometer cihazının saptadığı tüm yetiştirme şekillerinden izolatlara ait log score değerleri

Serbest gezen			Broiler			Yumurtacı		
C-1A	SALİVARUS	2,012	A-1A	ORİS	2,194	B-1D	SALİVARUS	2,245
C-1B	ORİS	2,154	A-1B	SALİVARUS	2,331	B-1E	AGİLİS	2,301
C-2A	REUTERİ	2,011	A-1C	VAGİNALİS	2,112	B-2A	PANİS	1,797
C-2C	JOHNSONİİ	2,208	A-1E	CRİSPATUS	2,247	B-2B	REUTERİ	2,263
C-3A	REUTERİ	2,043	A-2A	REUTERİ	2,287	B-2E	SALİVARUS	2,327
C-3B	ORİS	2,197	A-2B	SALİVARUS	2,297	B-3A	SALİVARUS	2,252
C-3C	KİTASATONİS	2,419	A-2D	ORİS	2,128	B-3B	AGİLİS	2,247
C-4A	REUTERİ	1,869	A-3A	SALİVARUS	2,344	B-3C	VAGİNALİS	2,037
C-4C	CRİSPATUS	2,093	A-3C	İNGLUVEİ	2,112	B-4B	AGİLİS	2,259
C-4D	ORİS	2,246	A-3D	VAGİNALİS	2,242	B-4C	MUCOSAE	1,776
C-5A	SALİVARUS	2,054	A-3E	ORİS	2,254	B-4D	SALİVARUS	2,199
C-5B	ORİS	2,006	A-4A	REUTERİ	2,193	B-5A	SALİVARUS	2,374
C-5C	AGİLİS	1,965	A-4C	İNGLUVEİ	2,111	B-5D	VAGİNALİS	2,247
C-6A	SALİVARUS	2,139	A-5A	REUTERİ	2,327	B-6A	SALİVARUS	2,099
C-7B	AGİLİS	2,311	A-5B	VAGİNALİS	1,853	B-6B	AGİLİS	2,279
C-7A	REUTERİ	2,194	A-5C	ORİS	2,306	B-6C	VAGİNALİS	1,961
C-7C	SALİVARUS	2,149	A-6A	VAGİNALİS	2,125	B-7A	REUTERİ	2,007
C-8A	AGİLİS	2,21	A-6B	SALİVARUS	2,221	B-7C	JOHNSONİİ	2,329
C-8B	REUTERİ	1,879	A-6C	REUTERİ	2,336	B-7D	MUCOSAE	1,738
C-8C	JOHNSONİİ	2,386	A-7A	REUTERİ	2,131	B-7E	VAGİNALİS	1,895

C-9B	SALİVARUS	1,943	A-7B	VAGİNALİS	2,231	B-8A	REUTERİ	2,353
C-9C	VAGİNALİS	1,964	A-7C	ORİS	2,149	B-8D	VAGİNALİS	1,989
C-9D	REUTERİ	2,051	A-7D	JOHNSONİİ	2,199	B-9B	REUTERİ	1,971
C-10A	SALİVARUS	1,971	A-8A	VAGİNALİS	2,149	B-9C	ORİS	1,899
C-10C	CRİSPATUS	2,24	A-8B	SALİVARUS	2,084	B-9E	VAGİNALİS	2,211
C-11A	SALİVARUS	1,765	A-8C	İNGLUVEİ	1,714	B-9F	KİTASONİTİS	2,207
C-11D	AGİLİS	2,148	A-8D	ORİS	2,247	B-10C	SALİVARUS	2,079
C-12A	SALİVARUS	2,014	A-8E	REUTERİ	2,261	B-10F	AGİLİS	2,34
C-12B	VAGİNALİS	1,990	A-9C	JOHNSONİİ	2,218	B-11A	AGİLİS	2,232
C-12C	AGİLİS	2,098	A-9D	ORİS	2,2	B-11B	REUTERİ	2,133
C-13A	AGİLİS	2,304	A-9E	SALİVARUS	2,252	B-11D	MUCOSAE	1,721
C-13B	CRİSPATUS	2,978	A-10A	VAGİNALİS	2,205	B-11E	JOHNSONİİ	2,124
C-14A	İNGLUVİEİ	1,923	A-10B	SALİVARUS	2,432	B-12A	REUTERİ	2,129
C-14B	AGİLİS	2,219	A-10C	ORİS	2,049	B-12D	DELBRUECKİİ	2,022
C-15	REUTERİ	2,087	A-11A	VAGİNALİS	2,208	B-12E	JOHNSONİİ	2,35
C-16	AGİLİS	2,384	A-11C	REUTERİ	2,304	B-13E	SALİVARUS	2,294
C-17B	AGİLİS	2,25	A-11E	JOHNSONİİ	2,336	B-14A	SALİVARUS	2,239
C-17C	MUCOSAE	1,847	A-12B	REUTERİ	2,172	B-14B	ORİS	2,058
C-18A	SALİVARUS	2,189	A-12C	SALİVARUS	2,35	B-14C	JOHNSONİİ	2,263
C-18D	KİTASATONİS	2,347	A-12D	VAGİNALİS	1,969	B-14F	AGİLİS	2,209
C-18E	AGİLİS	2,438	A-13A	REUTERİ	2,242	B-14E	CRİSPATUS	2,184
C-20B	SALİVARUS	2,231	A-13B	JOHNSONİİ	2,32	B-15	SALİVARUS	2,261
C-20C	İNGLUVİEİ	2,016	A-13C	VAGİNALİS	2,073	B-16	AGİLİS	2,23
C-21B	AGİLİS	2,463	A-13F	COLEOHOMİNİS	Sekans	B-17A	GALLİNARUM	1,887
C-21C	SALİVARUS	2,236	A-14A	SALİVARUS	2,207	B-17B	KİTASATONİS	2,334
C-22A	SALİVARUS	2,169	A-14B	VAGİNALİS	2,199	B-17D	VAGİNALİS	1,895

C-22B	İNGLUVİEİ	2,144
C-22C	AGİLİS	2,429

A-14C	REUTERİ	2,079
A-14D	JOHNSONİİ	2,422
A-15C	VAGİNALİS	2,01
A-15D	SALİVARUS	2,269
A-15F	JOHNSONİİ	2,42
A-16A	SALİVARUS	2,128
A-16D	VAGİNALİS	2,144
A-16F	REUTERİ	2,098
A-17D	İNGLUVEİ	2,245
A-17F	SALİVARUS	2,208
A-18A	SALİVARUS	2,243
A-18B	İNGLUVEİ	2,11
A-18C	REUTERİ	2,188
A-18D	VAGİNALİS	2,214
A-19A	REUTERİ	2,154
A-19B	SALİVARUS	2,247
A-19D	VAGİNALİS	2,191
A-19E	JOHNSONİİ	2,34
A-19F	İNGLUVEİ	2,251
A-20B	REUTERİ	2,223
A-20C	SAERİMNERİ	2,217
A-20D	VAGİNALİS	1,784
A-20E	JOHNSONİİ	2,477

B-17E	AGİLİS	2,273
B-17F	CRİSPATUS	2,117
B-18A	ORİS	1,832
B-18B	KİTASATONİS	2,27
B-18F	SALİVARUS	2,294
B-19A	REUTERİ	2,248
B-19B	MUCOSAE	1,778
B-19C	AGİLİS	2,248
B-20A	KİTASATONİS	2,208
B-20C	AGİLİS	2,343
B-20E	VAGİNALİS	2,217

FORMLAR

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Sayı :
Konu : B.30.2.İST.O.30.12.08/ 156

İstanbul 20.02.2018

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü,

İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Serkan İKİZ'in danışmanlığı altında Doktora eğitimine devam eden Canan KENAR'ın "Ticari ve Halk Elinde Beslenen Tavuklarda Enterik Laktobasillerin Dağılımı ve Makrolide-Lincosamide-Streptogramin (MLS) Antibiyotiklere Direnç profillerinin Araştırılması" adlı tezini çalışmak üzere Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Merkez Laboratuvarı'nda MALDI-TOF cihazını kullanması Anabilim Dalımızca uygun görülmüştür.

Durumu bilgilerinize arz ederim.

Prof. Dr. Gökhan AYGÜN
Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Gökhan AYGÜN
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı

ASLININ AYNIDIR
Sait TUNCEL
Fakülte Sekreteri

ETİK KURUL KARARI

Tarih ve Sayı: 08/02/2018-53270

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

Sayı :35980450-050.01.04-
Konu :Etik Kurul Onayı almayı gerektirmeyen çalışma Hk.

Sayın Prof. Dr. Serkan İKİZ

İlgi :17.01.2018 tarihli proje başvurunuz.

Sorumluluğunu üstlendiğiniz **Doktora Öğrencisi/Veteriner Hekim Canan KENAR'** a ait"Ticari ve Halk Elinde Beslenen Tavuklarda Enterik Laktobasillerin Dağılımı ve Makrolide-Lincosamide-Streptogramin (MLS) Antibiyotiklere Direnç Profillerinin Araştırılması"başlıklı projeniz; incelenmiş olup, Orman ve Su İşleri Bakanlığının 15.02.2014 tarih ve 28914 sayılı Resmi Gazete'de yayınlanarak yürürlüğe giren "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliği'nin 8.Maddesi (k-5) bendi hükümlerince, araştırmanızda kullanılacak materyal dikkate alındığında, çalışmanızın Etik Kurul Onayı almayı gerektirmediğine karar verilmiştir.

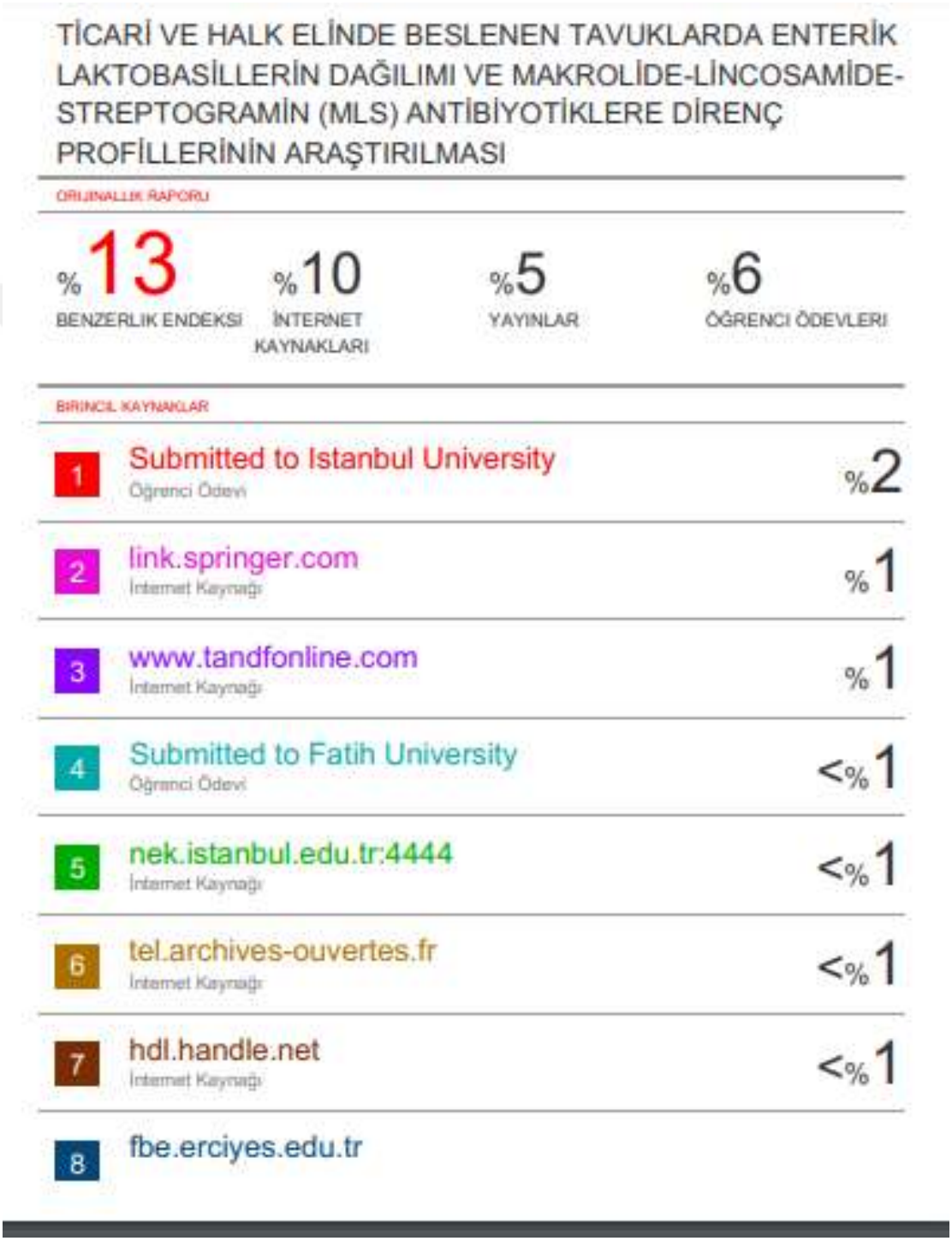
Bilgilerinizi rica ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Fatma Alev KAYMAZ
Başkan

Doğrulamak İçin:http://194.27.128.66/evraklar.Sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BENUZ07ED
Ayrıntılı bilgi için irtibat : Canan SÖNMEZTÜRK
İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dekanlı nolu oda Avcılar/İSTANBUL
Tel : (212) 473 7070 Faks : (212) 440 03 77
e-posta : hadyek@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbul.edu.tr

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



TİCARİ VE HALK ELİNDE BESLENEN TAVUKLARDA ENTERİK LAKTOBASİLLERİN DAĞILIMI VE MAKROLİDE-LİNCOSAMİDE-STREPTOGRAMİN (MLS) ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇ PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

%13	%10	%5	%6
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%2
2	link.springer.com İnternet Kaynağı	%1
3	www.tandfonline.com İnternet Kaynağı	%1
4	Submitted to Fatih University Öğrenci Ödevi	<%1
5	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<%1
6	tel.archives-ouvertes.fr İnternet Kaynağı	<%1
7	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	<%1
8	fbe.erciyes.edu.tr	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Canan	**Soyadı**	KENAR
Doğ.Yeri	Çorlu/TEKİRDAĞ	**Doğ.Tar.**	15/05/1992
Uyruğu	T.C.	**TC Kim No**	33772900810
Email	knrcanan@gmail.com	**Tel**	5383781148

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü	2020
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2015
Lisans	İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2015
Lise	Lüleburgaz Anadolu Lisesi	2010

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	Ruhsatlandırma Uzman Yardımcısı	Teknovet İlaç Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi	2019-2020
2.	Veteriner Hekim	T.C Tarım ve Orman Bakanlığı-Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü	2020-devam ediyor

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**YDS Puanı**	**YÖKDİL Puanı**
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi	76,25	77,5

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
ALES Puanı	73,55	74,55	69,42
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft Office	Çok iyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Kenar C., S. K. Tekeli., Öztabak K.Ö., Esen Gürsel F. "Effects of High Dose Copper Addition Feed of Laying Hens on Egg Production, Egg Shell Weight and Egg Shell Tickness." International VETistanbul Group Congress 2015, Saint Petersburg, Russia, 07-09 Nisan 2015

Adıgüzel C.M., Sığırcı B.D., Çelik B., Kahraman B.B., Halaç B., Kenar C., Kekeç I., Metiner K., İkiz S., Bağcıgil A.F., Özgür N.Y., Ak S. "Antibiotic Resistance in Thermophilic Campylobacter." 18th International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, İstanbul, Türkiye, 26-28 Nisan 2016

Adıgüzel C.M., Çelik B., Sığırcı B.D., Kahraman B.B., Halaç B., Kenar C., Kekeç I., Metiner K., İkiz S., Bağcıgil A.F., Özgür N.Y., Ak S. "Control Strategies For Thermophilic Campylobacter Species In Poultry Farm" 18th International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, İstanbul, Türkiye, 26-28 Nisan 2016

Kekeç I., Çelik B., Sığırcı B.D., Kahraman B.B., Adıgüzel C.M., Halaç B., Kenar C., Metiner K., İkiz S., Bağcıgil A.F., Özgür N.Y., Ak S. "Antimicrobial Resistance and Suggestions for Solution" 18th International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, İstanbul, Türkiye, 26-28 Nisan 2016

Kenar C., Kahraman B.B., Adıgüzel C.M., Çelik B., Sığırcı B.D., Çelik B., Halaç B., Kekeç I., Metiner K., İkiz S., Bağcıgil A.F., Özgür N.Y., Ak S. "Importance of Competitive Exclusion in Poultry." 18th International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, İstanbul, Türkiye, 26-28 Nisan 2016

Kenar C., İkiz S., İlgü E., Adıgüzel C.M., Kekeç I., Ak S. "A Self-evaluation Questionnaire Study on Experience and Competency of Farm Animal Practitioners About Zoonoses." 7th International Scientific Meeting Days of Veterinary Medicine, Struga, Macedonia, 22-24 Eylül 2016

Maşlak B., Kaymaz B., Kekeç I., Kenar C., İkiz S. “One Health and Veterinary Medicine” 18th International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, İstanbul, Türkiye, 26 - 28 Nisan 2016

Kenar C., Sığırcı B.D., İkiz S. Emerging and Re-emerging Zoonotic Animal Diseases. 19th International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, İstanbul, Türkiye, 02 - 04 Mayıs 2017