

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

KANATLI PATOJENİK *ESCHERİCHİA COLİ*'LERDE
MOBİLİZE KOLİSTİN DİRENÇ GENİ-1'İN
ARAŞTIRILMASI

ECENUR YILMAZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-23009 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2024

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen danışmanım ve Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ'a çok teşekkür ederim. Ayrıca bana her konuda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda görevli tüm öğretim üyelerine ve özellikle Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Araş. Gör. Yiğit SEFEROĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam süresince gösterdiği sabır, özveri ve destekleri için aileme ayrıca teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanatlı Patojenik <i>Escherichia coli</i>	3
2.1.1. Zoonotik Tehlike ve Kontrol Yöntemleri Üzerine Güncel Bakış	3
2.1.2. Tavuklarda Antibiyotik Direnci ve APEC Kontrolü: Geleceğin Zorlukları ve Çözüm Yolları.....	5
2.1.3. APEC Enfeksiyonlarının Kontrolünde Yeni Yaklaşımlar ve Çözümler.....	6
2.2. Kolistin Nedir?.....	7
2.2.1. Yapısı, Etki Mekanizması ve Antimikrobiyal Spektrumu.....	7
2.2.2. Kromozomal ve Plazmit Aracılı Kolistin Direnç Mekanizmaları.....	8
2.2.3. Duyarlılık Testi Zorlukları	9
2.2.4. Kolistinin İnsan Hekimliğinde Kullanımı	10
2. 2.5. Kolistinin Veteriner Hekimliğinde Kullanımı	10
2.2.6. Kommensal ve Patojen <i>E. coli</i>	12

2.2.7.Kanatlılardan Elde Edilen Bakteri İzolatlarında Kolistin Direnci ve <i>mcr</i> Genleri.	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Gereç	17
3.1.1. Cihazlar	17
3.1.2. Hayvan Materyali	17
3.1.3. Referans Suşlar.....	18
3.1.4. Besiyerleri.....	18
3.1.4.1. Eosin Methylene Blue Agar	18
3.1.4.2. MacConkey Agar	18
3.1.4.3. Kanlı Agar	19
3.1.4.4. Nutrient Agar.....	19
3.1.4.5. Nutrient Broth.....	19
3.1.4.6. Brain Heart Infusion Broth.....	19
3.1.5. Ayıraç ve Boyalar.....	20
3.1.5.1. Gram Boyama Seti.....	20
3.1.5.2. Oksidaz Test Kiti.....	20
3.1.5.3. Hidrojen Peroksit.....	20
3.1.6. Antibiyogram ve Kolistin Direncinin Fenotipik Olarak Belirlenmesi	20
3.1.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	21
3.1.7.1. Kullanılan Solusyon ve Boyalar.....	21
3.1.7.1.1. 10x Tris Borik Asit EDTA Buffer.....	21
3.1.7.1.2. 0,5x TBE.....	21
3.1.7.1.3. Yükleme Tamponu.....	21
3.1.7.1.4. 5x FIREPol® Master Mix	22
3.1.7.1.5. Primerler.....	22
3.1.7.1.6. Agaroz Jel.....	22

3.1.7.1.7. Elektroforez.....	23
3.1.7.1.8. Görüntüleme.....	23
3.1.7.1.9. Marker.....	23
3.2. Yöntem	24
3.2.1. Bakteriyel İzolasyon	24
3.2.2. Bakteriyel İzolatların BD Phoenix 100™ ile İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Yapılması.....	24
3.2.3. DNA İzolasyonu, Miktar Tayinleri ve Saflık Kontrolleri.....	25
3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	26
4. BULGULAR	28
4.1. Bakteri İzolasyon ve İdentifikasyonu	28
4.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi	29
4.2.1. Çoklu Antibiyotik Direnci	33
4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	34
5. TARTIŞMA	35
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	41
KAYNAKLAR	43
BİLİMSEL ETİK BEYANI.....	54
ÖZ GEÇMİŞ	55

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AB	: Avrupa Birliği
ABD	: Amerika Birleşik Devletler
AG	: Aminoglikozid
AIV	: Avian İnfluenz
AMP	: Antimikrobiyal Peptitler
AMP	: Ampisilin
AN	: Amikasin
APEC	: Kanatlı Patojenik <i>Escherichia coli</i>
AS	: Ampisilin Tazobaktam
AXC	: Amoksisilin Klavulanat
BL	: β -laktam
BMD	: Mikrodilüsyon
CAMHB	: Kation-Ayarlı Muller Hilton Broth
CAZ	: Seftazidim
CFZ	: Sefozolin
CIP	: Siprofloksasin
CLSI	: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
COL	: Kolistin
CP	: Cephem
CRO	: Seftriakson
CT	: Seftolozan Tazobaktam
CVMP	: Veteriner İlaç Kullanımı için İlaç Ürünleri Komitesi
CXM	: Sefuroksim

<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
ECOFF	: Epidemiyolojik Kesim Noktaları
EMA	: Avrupa İlaç Kurumu
EMB	: Eozin Metilen Mavisi
ETP	: Ertapenem
EUCAST	: Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi
ExPEC	: Ekstra-intestinal Patojenik <i>Escherichia coli</i>
F	: Folat
FDA	: ABD Gıda ve İlaç İdaresi
FEP	: Sefepim
GI	: Gastrointestinal
GM	: Gentamisin
IBD	: Enfeksiyöz Bursit Hastalığı
IBV	: Enfeksiyöz Bronşit
IMP	: İmipenem
İYE	: İdrar Yolu Enfeksiyonları
K	: Kinolon
LF	: Levofloksasin
LP	: Lipopeptid
LPS	: Lipopolisakkarit
mcr-1	: Mobilize Kolistin Direnç Geni
MDR	: Çoklu Antibiyotik Direnci
MEM	: Meropenem
MG	: <i>Mycoplasma gallisepticum</i>
MİK	: Minimal İnhibasyon Konsantrasyonu
NC	: Negatif Kontrol

NDV	: Newcastle Hastalığı
NMEC	: Neonatal Meningitis <i>Escherichia coli</i>
P	: Penisilin
PDR	: Pan-İlaca Dirençli
PHA	: Kanada Halk Sağlığı Ajansı
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QS	: Quorum Sensing Sistemleri
SXT	: Trimetoprim Sülfametoksazol
T	: Tetrasiklin
TBE	: Tris Borik Asit EDTA
TGC	: Tigesiklin
TZP	: Piperasilin Tazobaktam
UPEC	: Üropatojenik <i>Escherichia coli</i>
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
XDR	: Aşırı İlaca Dirençli

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Kolistin dirençli <i>E. coli</i> izolatlarının antibiyotiklere karşı dirençlilik ve duyarlılık durumları.....	32
-----------------	---	----



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. <i>E. coli</i> izolatlarının biyokimyasal testleri.....	28
Resim 2. <i>mcr-1</i> geninin kodladığı kolistin direnci için jel elektroforezi.....	34



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.	Çalışmada kullanılan primerler.....	22
Tablo 2.	Mastermiksın hazırlanma oranları.....	27
Tablo 3.	<i>E. coli</i> izolatlarının biyokimyasal test sonuçları.....	29
Tablo 4.	Kolistin dirençli izolatların antibiyotik duyarlılık test sonuçları.....	30
Tablo 5.	Kolistin dirençli <i>E. coli</i> izolatlarının antibiyotiklere karşı duyarlılık dirençlilik ve durumları.....	31
Tablo 6.	İzolatların antibiyotik duyarlılık testine göre dirençli veya duyarlı oldukları antibiyotik sayıları.....	33
Tablo 7.	İzolatların antibiyotik duyarlılık testine göre dirençli veya duyarlı oldukları antimikrobiyal aile sayıları.....	33

ÖZET

KANATLI PATOJENİK *ESCHERİCHIA COLI* LERDE MOBİLİZE KOLİSTİN DİRENÇ GENİ-1'İN ARAŞTIRILMASI

Yılmaz E. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veterinerlik Mikrobiyolojisi Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2024.

Amaç: Bu çalışma, kanatlı patojenik *Escherichia coli* (APEC) izolatlarında plazmit aracılı kolistin direnci sağlayan mobilize kolistin direnç geni 1 (*mcr-1*) varlığının belirlenmesi ve kolistin dirençli izolatların antibiyotik direnç profillerinin incelenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada, kolibasillozis şüpheli 200 broyler karaciğer örneği materyal olarak kullanıldı. *E. coli* izolasyonları klasik konvansiyonel yöntemler ile gerçekleştirildikten sonra identifikasyonlar ve antibiyotik duyarlılık testleri otomatize mikrobiyoloji sistemi (BD Phoenix 100™, ABD) sistemi yardımı ile yapıldı. Fenotipik olarak kolistin dirençli olduğu tespit edilen izolatlarda *mcr-1* gen varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile incelendi.

Bulgular: İki yüz broyler karaciğer örneğinden elde edilen 156 (%78) *E. coli*'nin 10 (%6,4)'unun fenotipik olarak kolistin dirençli olduğu saptandı. Kolistin dirençli *E. coli* izolatların %80'inin levofloksasine, %70'inin sefazolin ve sefuroksime, %60'ının seftotazidime, %50'sinin gentamisin ve seftriaksona, %40'ının sefepime, %30'unun seftolozan tazobaktama, %20'sinin piperasilin tazobaktama dirençli oldukları belirlendi. Tüm izolatlar amikasin, ertapenem, imipenem, meropenem duyarlı; ampisilin, amoksisilin klavulanat, ampisilin sulbaktam, trimethoprim sulfamethoksazol ve tigesiklin dirençli olup; çoklu antibiyotik direncine (MDR) sahip idi. Fenotipik olarak kolistin dirençli oldukları tespit edilen tüm izolatların genotipik olarak da *mcr-1* genini taşıdıkları tespit edildi.

Sonuç: Bu bulgular, APEC izolatlarında kolistin direncinin mobilize olmasının, plazmidik direnç genlerinin hızlı yayılmasına ve geniş kapsamlı antibiyotik direncinin artmasına katkı sağladığını göstermektedir. Beşeri hekimlikte de kullanılan antibiyotiklere direnç saptanmış olması halk sağlığı için potansiyel bir tehdit oluşturabilir. Gelecekteki çalışmalar, farklı bölgelerden alınan örneklerle yapılmalı ve bu riskin daha iyi anlaşılması için geniş bir örneklem grubunu içermelidir.

Anahtar kelimeler: *Escherichia coli*, İlaç Direnci, Kolistin.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE MOBILE COLISTIN RESISTANCE GENE-1 IN AVIAN PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI*

Yılmaz E. Aydın Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Veterinary Medicine Microbiology Program, Master Thesis, Aydın, 2024.

Objective: This study aimed to determine the presence of mobilized colistin resistance gene 1 (*mcr-1*), which provides plasmid-mediated colistin resistance in poultry pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolates, and to examine the antibiotic resistance profiles of colistin-resistant isolates.

Material and Methods: In this research, 200 broiler liver samples suspected of colibacillosis were utilized as the material. Following the isolation of *E. coli* through classical conventional methods, identification and antibiotic susceptibility tests were conducted using an automated microbiology system (BD Phoenix 100TM, USA). The presence of the *mcr-1* gene in isolates phenotypically determined as colistin-resistant was investigated using polymerase chain reaction (PCR).

Results: Out of 156 (78%) *E. coli* isolates obtained from 200 broiler liver samples, 10 (6.4%) were phenotypically determined to be colistin-resistant. It was found that 80% of colistin-resistant *E. coli* isolates were resistant to levofloxacin, 70% to cefazolin and cefuroxime, 60% to ceftazidime, 50% to gentamicin and ceftriaxone, 40% to cefepime, 30% to ceftolozane-tazobactam, and 20% to piperacillin-tazobactam. All isolates were sensitive to amikacin, ertapenem, imipenem, meropenem, and resistant to ampicillin, amoxicillin-clavulanate, ampicillin-sulbactam, trimethoprim-sulfamethoxazole, and tigecycline, exhibiting multidrug resistance (MDR). All isolates that were found to be phenotypically resistant to colistin were also found to carry the *mcr-1* gene genotypically.

Conclusion: These findings indicate that the mobilize colistin resistance in APEC isolates contributes to the rapid spread of plasmid-mediated resistance genes and the escalation of broad-spectrum antibiotic resistance. The detection of resistance to antibiotics used in human medicine may be poses a potential threat to public health. Future studies should be conducted with samples from different regions and include a diverse sample group to better understand this risk.

Keywords: Colistin, Drug Resistance, *Escherichia coli*.

1. GİRİŞ

Son yıllarda, bakterilere karşı antimikrobiyal direnç, küresel halk sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturuyor. Özellikle hayvanlarda ve insanlarda antibiyotik kullanımının artması, antimikrobiyal direncin toplumda yayılmasına neden olmaktadır (Salam ve diğerleri, 2023). Hayvanlarda hastalık kontrolü veya büyüme arttırıcı olarak antimikrobiyal kullanımı, kommensal mikrofloranın dirençli suşlardan antimikrobiyal direnç genleri edinmesine yol açar; bu sürecin temelinde yatan mekanizma yatay gen transferidir (Salinas ve diğerleri, 2019). Araştırmalar, antimikrobiyal direncin insanlarda, gıda kaynaklı antibiyotik direnç genlerinin insan patojenlerine yatay transferi veya doğrudan dirençli bakterilerin transferi yoluyla oluşabileceğini göstermektedir (Marshall ve diğerleri, 2011).

Escherichia coli, hem hayvanların hem de insanların bağırsaklarında bulunan *Enterobacteriaceae* ailesine ait bir mikroorganizmadır. Ancak, özellikle tavuklar da dahil olmak üzere hayvanlarda ve insanlarda yaşamı tehdit eden enfeksiyonlara neden olabilir. Antimikrobiyal dirençli *E. coli* suşları, halk sağlığı için potansiyel bir risk oluşturur ve antimikrobiyal direnç belirleyicilerini kendi suşlarına veya diğer bakteri türlerine taşıyabilen taşıyıcılar olarak işlev görebilir (Rasheed ve diğerleri, 2014).

Daha önce sistemik toksisitesi nedeniyle insan tıbbında kullanılmasından kaçınılan kolistin, çoklu ilaç direnci (MDR) gösteren Gram-negatif bakterilerin tedavisinde etkili olduğu için tekrar kullanılmaya başlanmıştır (Poirel ve diğerleri, 2017). Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre, kolistin, insan tıbbı açısından hayati öneme sahip son çare antibiyotik olarak kullanılmaktadır (WHO, 2019).

Kolistin aynı zamanda veteriner hekimlik alanında da hastalık kontrolü ve gıda üreten hayvanlarda büyüme arttırıcı olarak kullanılmaktadır (Liu ve diğerleri, 2018). Hayvanlarda kolistin kullanımının yaygın olması, hayvan kökenli bakterilerde kolistin direncinin ortaya çıkmasına ve bu direncin insanlara yayılmasına neden olabilir (Poirel ve diğerleri, 2016). İnsanlardaki dirençli mikroorganizmaların kaynağı, büyükbaş hayvanlar ve gıda üreten hayvanlardan gelmiş olabileceği düşünülmektedir. Bakterilerdeki kolistin direnci, 2015 yılında transfer edilebilir plazmid aracılığıyla keşfedilen *mcr-1* genin ortaya çıkışına kadar kromozomal mutasyon sonucu olarak kabul ediliyordu. *mcr* ile ilgili kolistin direncinin ortaya çıkışı, enfeksiyonların tedavisi açısından büyük bir tehdittir (Liu ve diğerleri, 2016).

Dünyada *mcr-1*'in ilk bildiriminden sonra, birçok çalışmada *E. coli*'de yeni *mcr* genlerini sürekli olarak rapor edilmiştir (Lemlem ve diğerleri, 2023). *mcr-1*'in Çin'de keşfinden sonra, Asya'da olmak üzere dünya genelinde, özellikle kümes hayvanlarını içeren gıda hayvanlarında kolistin direnci ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (Kempf ve diğerleri, 2016). Birçok ülke, hayvanlardaki artan kolistin direnci nedeniyle gıda katkı maddelerinde büyüme arttırıcı olarak kolistin kullanımını yasaklamıştır (Wang ve diğerleri, 2020). Hayvan üretiminde kolistin tamamen yasaklandıktan sonra kolistin direnci azalmış olsa da, özellikle domuzlardan ve kümes hayvanlarından olmak üzere dünya genelinde hala önemli düzeyde kolistin direnci bildirilmektedir (Wang ve diğerleri, 2020). Bugüne kadar bildirilen yaygın kolistin direnci kodlayan genler, *mcr-1*'den *mcr-10*'a kadar olanlardır (Valiakos ve diğerleri, 2021).

Türkiye'de ise kolistin direnci ile ilgili çalışmalar sınırlı olmakla birlikte, bu konuda artan bir farkındalık bulunmaktadır. Hatay'da rapor edilen *mcr-1* pozitif *E. coli* izolatu, ülkede bu konudaki ilk vaka olarak öne çıkmıştır (Kürekçi ve diğerleri, 2018). Erzurum ve İstanbul'da yapılan çalışmalar da, kolistin direncinin tavuk etinden elde edilen izolatlarda varlığını sürdürdüğünü ve bu durumun geniş bir coğrafyada önemli bir problem olduğunu göstermektedir (Adıgüzel ve diğerleri, 2021; Erzaim ve İkiz, 2021).

Şu anki bilgilerimize göre Türkiye'nin batısında Aydın ilinde kanatlı patojenik *Escherichia coli* (APEC) izolatlarında plazmit aracılı kolistin direnci sağlayan *mcr-1* varlığının belirlenmesi ve kolistin dirençli izolatların antibiyotik direnç profillerinin incelenmesi ile ilgili bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışma, APEC izolatlarında *mcr-1* geninin varlığını belirlemek ve kolistin dirençli izolatların antibiyotik direnç profillerini incelemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular, Türkiye'de bu konudaki bilgilerimizi artırarak, kolistin direncinin yayılma potansiyelini ortaya koymaktadır. Elde ettiğimiz sonuçlar, APEC izolatlarında *mcr-1* geninin varlığının incelenmesinin ve bu izolatların antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesinin, gelecekteki önleyici tedbirlerin ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayabileceğini vurgulamaktadır. Sonuç olarak, bu tez çalışması, hem veteriner hekimlik hem de halk sağlığı açısından önemli bir konuya odaklanarak, kolistin direnciyle mücadelede daha geniş kapsamlı ve etkili stratejilerin geliştirilmesine yönelik temel bir adım olarak önemli olmakla birlikte, antibiyotik dirençlilik test sonuçları, veteriner hekimlerin tedavi stratejilerini yönlendirmek ve antimikrobiyal direncin izlenmeye devam edebilmesi için bir rehber olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanatlı Patojenik *Escherichia coli*

Kanatlı Patojenik *Escherichia coli* (APEC), ekstra-intestinal patojenik *E. coli* (ExPEC) türüdür ve tavuk, hindi, ördek ve diğer kuş türlerinde çeşitli lokal ve sistemik enfeksiyonlara neden olur (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999). APEC, kümes hayvancılığı endüstrisinde önemli ekonomik kayıplara neden olan en yaygın bakteriyel patojendir. APEC'in etkili bir şekilde kontrol edilmesi, hem hayvan hem de insan sağlığı açısından faydalıdır.

2.1.1. Zoonotik Tehlike ve Kontrol Yöntemleri Üzerine Güncel Bakış

APEC'in tavuklarda sebep olduğu en yaygın enfeksiyonlar, perihepatit, airsakülitis, perikardit, yumurta peritoniti, salpingit, koligranülom, omfalit, selülit ve osteomiyelit/artrit gibi çeşitli hastalıklardır; bunlar genellikle avian kolibasiloz olarak adlandırılır (Dziva ve Stevens, 2008). Ayrıca, APEC tavuklarda şişmiş baş sendromu ve hindilerde osteomiyelit kompleksine neden olur (Dziva ve Stevens, 2008). Kolibasiloz, kümes hayvanlarında mortalite (%20'ye kadar) ve morbiditenin önde gelen nedenlerinden biridir ve aynı zamanda et (canlı ağırlıkta %2'lik bir düşüş, yem dönüşüm oranında %2.7'lik bir bozulma) ve yumurta üretiminde (%20'ye kadar) azalmaya, kuluçka oranlarının düşmesine ve genç tavuklarda yüksek mortaliteye (%53.5'e kadar) neden olur (Guabiraba, 2015; Mellata, 2013). Tedavi masraflarıyla birlikte, APEC dünya çapında kümes hayvancılığı endüstrisine yılda yüz milyonlarca dolarlık ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Ghunaim ve Abu-Madi, 2014). Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD), sadece karkas hasarı nedeniyle broyler endüstrisindeki ekonomik kaybın yılda 40 milyon dolara kadar olabileceği tahmin edilmektedir (de Brito, 2003).

APEC, tüm tavuk türlerini ve üretim sistemlerini etkileyebilir (Guabiraba, 2015). APEC, tavukların tüm yaş gruplarında yaygındır (%9.52 ila %36.73 arasında) (Lutful Kabir, 2010). Broyler tavukları arasında 4 ila 6 hafta arasındaki yaş grup daha duyarlıdır (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999), ancak yumurtacı tavuklar, özellikle pik yumurta üretimi

dönemi ve geç yumurta dönemi etrafında APEC'ten etkilenirler (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999). ABD'de, ticari sürülerin en az %30'unun herhangi bir zamanda APEC tarafından etkilendiği tahmin edilmektedir (Johnson ve diğerleri, 2008). APEC ile ilişkilendirilmiş çok sayıda serotip bulunsa da, üç serotip (O78, O2 ve O1) vakaların çoğunluğunu (%80'den fazla) oluşturur (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999; Guabiraba, 2015). APEC, tavuklarda sistemik enfeksiyonlara neden olurken ya birincil patojen ya da viral (enfeksiyöz bronşit (IBV), Newcastle hastalığı (NDV), avian influenza (AIV)) ve *Mycoplasma* (*Mycoplasma gallisepticum* (MG)) enfeksiyonlarına, immünsüpresif hastalıklara (enfeksiyöz bursit hastalığı (IBD)), veya çevresel streslere (aşırı kalabalık, yüksek seviyede toz ve amonyak) bağlı olarak oral ve solunum yollarından girer (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999; Guabiraba, 2015). İlginç bir şekilde, çalışmalar, APEC'in hastalık yapmadan tavukların gastrointestinal ve solunum yollarına yerleşebildiğini ve yalnızca stres faktörleri (üretimle ilgili stres, immünsüpresyon ve eş zamanlı enfeksiyonlar) varlığında ekstra-intestinal bölgelere transloke olduğunu göstermektedir (Collingwood ve diğerleri, 2014). APEC, stres faktörleri varlığında gastrointestinal ve solunum yollarına abrazyonlu trakeal ve intestinal epitel üzerinden invaze olur ve kan dolaşımına ve iç organlara ulaşır (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999; Guabiraba, 2015). Tavuklar kontamine yem ve su yoluyla enfekte olur ve dışkı-oral veya aerosol yoluyla diğer kuşlara yayılabilir (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999; Guabiraba, 2015). Ayrıca, APEC, enfekte ebeveynler aracılığıyla kontamine yumurtalar yoluyla dikey olarak bulaşabilir (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999; Guabiraba, 2015). APEC, hastalık oluşturmeyen tavukların gastrointestinal ve solunum yollarını kolonize edebilir ve yalnızca fırsatçı bir patojen olarak stres faktörleri varlığında ekstra-intestinal bölgelere transloke olabilir (Collingwood ve diğerleri, 2014).

APEC, tavuklarda hastalık oluşturmak için özellikle adezinler, invazinler, protektinler, demir edinim sistemleri ve toksinler olmak üzere çeşitli virülans ve patogeneze faktörlerini kullanır (Dziva ve Stevens, 2008). Bu faktörler, APEC'in tavuklarda enfeksiyonun oluşmasına izin vererek adezyon, invazyon, konak immün yanıtlarından kaçınma, kolonizasyon, çoğalma ve sistemik yayılmasını kolaylaştırır. Ayrıca, bu faktörlere ek olarak, APEC patogenezinde tip III ve VI sekresyon sistemleri, quorum sensing (QS) sistemleri, transkripsiyonel düzenleyiciler, iki bileşenli sistemler ve metabolizma ile ilişkilendirilen genler dahil olmak üzere çeşitli diğer bakteriyel faktörler de rol oynar (Palaniyandi ve diğerleri, 2013). Bu faktörlerin derinlemesine anlaşılması, APEC patogenezinde yeni etkili önleyici ve terapötik tedavilerin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

Yapılan araştırmalar, APEC'in (özellikle ST95 ve ST131 dizilerine ait izolatlar veya O1, O2 ve O18 serogrupları) potansiyel bir gıda kaynaklı zoonotik patojen olarak yanı sıra insanlarda ekstra-intestinal enfeksiyonların kaynağı veya rezervuarı olarak düşünüldüğünü göstermektedir (Mellata, 2013; Liu ve diğeri, 2018). Özellikle APEC, insan ExPEC'leri, üropatojenik *E. coli* (UPEC) ve neonatal meningitis *E. coli* (NMEC) ile genetik benzerlik paylaşır ve UPEC ve NMEC'yi tanımlayan virölans genlerini taşır, bu da fare ve sıçan modellerinde idrar yolu enfeksiyonları (İYE) ve menenjit oluşturma yeteneğı ile ilişkilidir (Mellata, 2013; Tivendale ve diğeri, 2010). Ayrıca, insan ExPEC izolatlarında APEC'e özgü ColV plazitlerinin tespit edilmesi, APEC'in tavuklardan insanlara olası bir zoonotik geçişini düşündürmektedir (Liu ve diğeri, 2018). Bu nedenle, APEC, kümes hayvancılığı endüstrisi ve halk sağığı için önemli bir patojendir.

Ayrıca, tavukları APEC enfeksiyonlarına karşı korumak için etkili bir aşı mevcut değildir, bu durum genellikle kolibasiloz vakalarıyla ilişkilendirilen APEC serotiplerinin çeşitliliğinden kaynaklanmaktadır (Ghunaim ve Abu-Madi, 2014). Şu anda sadece iki aşı (canlı zayıflatılmış APEC O78 ΔaroA Poulvac® *E. coli* aşısı ve F11 fimbrial ve FT flagellar antijenler içeren inaktif Nobilis® *E. coli* aşısı) tavuklarda kullanım için ticari olarak bulunmaktadır (Gregersen ve diğeri, 2010). Bu durumlar, tavuklardaki APEC enfeksiyonlarını kontrol etmek için yeni ve alternatif tedavilerin geliştirilmesini gerektirir. Probiyotikler, bakteriyofajlar ve çeşitli yeni tedaviler (doğuştan bağışıklık uyarıcıları, büyüme ve QS inhibitörleri ve antimikrobiyal peptitler), APEC enfeksiyonlarını azaltmada umut vadetmiştir (Wang ve diğeri, 2016; Wang ve diğeri, 2017; Peng ve diğeri, 2018); ancak bugüne kadar bunlardan hiçbiri saha uygulamalarına geçmiş değildir.

2.1.2. Tavuklarda Antibiyotik Direnci ve APEC Kontrolü: Geleceğin Zorlukları ve Çözüm Yolları

Antibiyotikler, genellikle APEC enfeksiyonlarını kontrol etmek için kümes hayvancılığında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Agunos ve diğeri, 2012). Tetrasiklinler (tetrasiklin, oksitetrasiklin, klorotetrasiklin), sulfonamidler (sulfadimetoksin, trimetoprim, sulfadiazin, sulfametazin, sulfaquinoksalin, ormetoprim), aminoglikozidler (apramisin, gentamisin, neomisin, spektinomisin), penisilinler (amoksisilin, ampicilin), sefalosporinler (seftiyofur), kinolonlar (danofloksasin, sarafloksasin,

enrofloksasin), polimiksinler (kolistin), kloramfenikoller (florfenikol), makrolidler (eritromisin) ve linkosamidler (linkomisin) gibi farklı sınıflara ait birçok antibiyotik, küresel olarak APEC enfeksiyonlarını kontrol etmek amacıyla tavuk endüstrisinde kullanılmıştır (Agunos ve diğerleri, 2012). Ancak, APEC'in birden çok antibiyotiğe direnci bildirilmiştir (Awad ve diğerleri, 2020), bu da bu antibiyotiklerin kullanımını sınırlandıran ve gelecekte bu antibiyotikleri kullanmada zorluk yaratabilecek bir zorluğu işaret etmektedir.

Bununla birlikte, APEC'in çeşitli antibiyotik sınıflarına, özellikle de tıbbi açıdan önemli antibiyotiklere (β -laktamlar, kolistin ve karbapenemler) karşı artan direnci, tavuklardaki APEC enfeksiyonlarını kontrol etmede önümüzdeki zorlukları göstermektedir (Nhung ve diğerleri, 2017). Yapılan son çalışmalarda APEC'in karbapenemler dışında neredeyse tüm antibiyotik sınıflarına direnç gösterdiğini göstermektedir. İmipenem direnci de son zamanlarda bildirilmiştir (Saha ve diğerleri, 2020). Direnç genellikle ampisilin, tetrasiklin, trimetoprim, sulfametoksazol ve streptomisin antibiyotikleri ile en yaygın görülenidir. Önemli bir şekilde, APEC'in tıbben önemli antibiyotiklere, özellikle β -laktamlar ve kolistine yüksek düzeyde direnç gösterdiği bildirilmiştir, bu da antibiyotik dirençli bakteri ve genlerin gıda zinciri aracılığıyla insanlara bulaşma riskini artırabilir (Osman ve diğerleri, 2018). ABD ve Avrupa Birliği (AB) tarafından antibiyotiklerin gıda-hayvan üretiminde kullanımının kısıtlanması (büyüme teşviki amacıyla olmayan) ve tıbben önemli antibiyotiklerin tedavi amacıyla kullanımının sınırlandırılması yönündeki stratejiler, bu riskin azaltılmasına yardımcı olabilir (Tang ve diğerleri, 2017); ancak bu tür önlemlerin antibiyotik direnç sorunlarını kontrol etmedeki faydalarının gerçekleşmesi zaman alabilir. Hayvan kullanımı için sadece antibakteriyellerin geliştirilmesi, çapraz direnç potansiyeli olmaksızın veya antibiyotiklerin yerine geçecek antibiyotik alternatiflerinin belirlenmesi, gıda-hayvan üretiminde antibiyotik direnç sorunlarıyla mücadelede yardımcı olabilir.

2.1.3. APEC Enfeksiyonlarının Kontrolünde Yeni Yaklaşımlar ve Çözümler

APEC'in tavuklarda sistemik enfeksiyonlara neden olabilmesi için birçok virülans ve patojenez faktörü koordineli bir şekilde rol oynamaktadır; bu nedenle, gelecekte etkili anti-APEC terapötikleri formüle etmek için demir edinim sistemleri, QS sistemleri, bakteriyel metabolizma ve sekresyon sistemleri gibi tüm faktörleri kapsayan bütünlükçü bir yaklaşım gereklidir. Ayrıca, APEC'in insanlara zoonotik bulaşının somut kanıtlarını sağlamak için daha

fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Özellikle ST95 ve ST131 veya O1, O2 ve O18 serogruplarına ait APEC izolatları, insanlarda ekstra-intestinal enfeksiyon kaynağı olarak hizmet edebilir. Antibiyotiklere karşı önemli direnç sorunları ve antibiyotik dirençli bakteri ve genlerin insanlara bulaşma yüksek riski nedeniyle, gelecekteki çözüm antibakteriyellerin sadece hayvan kullanımı için geliştirilmesi olabilir, mevcut antibiyotiklere karşı çapraz direnç göstermeyen. Ayrıca, birden çok APEC serotipine karşı çapraz koruma sağlayabilen ideal bir APEC aşısına ihtiyaç vardır. APEC'in virülans ve patojenez mekanizmaları üzerine elde edilen bilgiler, yeni aşı adaylarını belirlemek için kullanılmalıdır. Son olarak, özellikle kümes hayvancılığında kolibasiloz kontrolünde etkili olabilecek yeni hedeflere sahip küçük molekül virülans inhibitörleri veya büyüme inhibitörleri ile AMP'ler (antimikrobiyal peptitler) gibi alternatif terapilere de odaklanılmalıdır (Kathayat ve diğerleri, 2021).

2.2. Kolistin Nedir?

Polimiksin B ve kolistin (ya da polimiksin E), antimikrobiyal ilaçların siklik lipopeptit grubunda polimiksin kompleksini oluşturur. Polimiksin, bir yağ asidi yan zincirine bağlı on aminoasit içeren bir dekaeptittir ve ilk olarak 1947'de *Bacillus polymyxa*'nın fermantasyon ürünü olarak izole edilmiştir (Bryskier, 2005).

2.2.1. Yapısı, Etki Mekanizması ve Antimikrobiyal Spektrumu

Polimiksin B ve kolistin, peptit halkasının 6. pozisyonundaki sadece bir amino asit farkıyla ayrılır ve çünkü ikinci molekül, kolistin metansülfonat olarak, ilacın etkisiz bir formu olarak uygulanır. Her iki bileşik de benzer bir etki mekanizması ve aktivite spektrumuna sahiptir (Poirel ve diğerleri 2017).

Kolistin, Gram-negatif bakterilerin dış membranındaki lipopolisakkaridin (LPS) lipid A'ya bağlanarak membran lipidlerinin divalen kationlarını rekabetçi bir şekilde yerinden çıkartır. Bu katyonik kolistin ile negatif yüklü LPS arasındaki elektrostatik etkileşim, dış hücre zarının düzensizleşmesine, bakteri içeriğinin sızmasına ve hücre ölümüne neden olur (Olaitan ve diğerleri, 2014).

Antibakteriyel etki mekanizmasının doğası gereği, kolistin Gram-pozitif bakterilere, Gram-negatif koklara ve *Mycoplasma* spp.'ye karşı etkisizdir. Ayrıca *Proteus* spp., *Serratia* spp. ve *Burkholderia* spp. bu ilaca doğuştan dirençlidir. Bu nedenle, kolistin, fermantasyon yapan (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp.) ve fermantasyon yapmayan (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*) Gram-negatif bakterilere yönelik dar bir spektrumlu antimikrobiyaldir (Poirel ve diğerleri, 2017).

2.2.2. Kromozomal ve Plazmit Aracılı Kolistin Direnç Mekanizmaları

Kolistin direncinin kromozomal ve plazmit aracılı mekanizmalarına dair bilgiler, literatürdeki çalışmalara dayanarak şu şekilde özetlenebilir:

Kromozomal direnç mekanizmaları genellikle L-Ara4N ve pEtN gibi katyonik grupların lipid A molekülüne bağlanması üzerinden gerçekleşir. Bu süreç, geniş bir gen ve operon grubu tarafından düzenlenir. PhoPQ ve PmrAB gibi iki bileşenli sistemler sentezi kontrol ederken, *pmrC-pmrE* genleri L-Ara4N ve pEtN'nin LPS'ye eklenmesinden sorumlu olan proteinleri kodlar. Bu mekanizma, LPS'nin nitel bir değişikliğine neden olarak polimiksinlerin bakteri yüzeyine olan bağlanma yeteneğini azaltır (Jeannot ve diğerleri, 2017).

Bu kromozomal direnç yolları, mutant suşlarda MIC'yi önemli ölçüde artırabilir, ancak kromozomal mutasyonların in vitro ortamda istikrarsız olduğu ve dirençli suşların sadece dikey (klonal) olarak yayılabildiği göz önüne alındığında, kolistin direnci riski düşük kabul edilmiştir.

Çin'deki 2016 yılında bir araştırma grubu, transfer edilebilir bir plazmit aracılı direnç geni olan *mcr-1*'in ortaya çıkışını bildirdi. Bu gen, fosfoetanolamin transferazını kodlar ve 1626 baz çiftinden oluşur. *mcr-1* geni, hayvanlardan, insanlardan ve etten izole edilmiştir. Retrospektif analizler, *mcr-1*'in 1980'lerden bu yana dolaşımda olduğunu ve en erken izolatların tavuklardan geldiğini göstermiştir (Shen ve diğerleri, 2016).

Bu gen, dünya genelinde çeşitli bakteri türleri ve konaklarda yaygın bir şekilde bulunmuştur, bu da *mcr-1*'in geniş bir yayılım gösterdiğini ortaya koymaktadır (Kempf ve diğerleri, 2016). Veteriner izolatlardaki genin geniş yayılımı, genellikle hayvanlarda bulunan β -laktamazlar (örneğin CMY-2) ile birlikte bulunması ve kolistinin veteriner hekimlik alanında insan hekimliğine kıyasla yaygın olarak kullanılması, "hayvan dünyası"nın dirençli

bakterilerin bir rezervuarı ve bunların insanlara aktarımının başlıca kaynağı olarak suçlanmasına neden olmuştur (Catry ve diğerleri, 2015; EMA, 2016; Poirel ve Nordmann, 2016).

Son yayınlar, yeni *mcr* genlerinin ve alel varyantlarının sürekli olarak ortaya çıkmasını ve rutin izlemede tanımlanmasının zor olmasını bildirmiştir. Ayrıca, *mcr* genlerinin çeşitli plazid şablonlarında yüksek in vitro transfer oranlarına sahip olduğu ve genellikle β -laktamazlar gibi diğer direnç belirleyicileri ile birlikte bulunduğu tespit edilmiştir (EMA, 2016).

2.2.3. Duyarlılık Testi Zorlukları

Polimiksin duyarlılık testleri, bu büyük katyonik moleküllerin ortama düşük oranda difüzyon göstermesi ve yaygın plastik malzemelere yapışma eğilimleri nedeniyle zorluklar içermektedir (Kempf ve diğerleri, 2016). Ayrıca, aynı suş için kolistin ve polimiksin B arasında değişen Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) değerleri, bazı türlerdeki daha az duyarlı altpopülasyonların (heterodirenç) varlığı ve *Salmonella* spp. için serovar düzeyinde duyarlılık farklılıkları gibi faktörler laboratuvar çalışmalarını karmaşık hale getirmektedir (Poirel ve diğerleri, 2017).

Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST), kolistin duyarlılık testi için kation-ayarlı Muller Hilton Broth (CAMHB) içinde mikrodilüsyon (BMD) kullanımını önermektedir (CLSI/EUCAST, 2016). Ayrıca, agar dilüsyon da güvenilir bir yöntem olarak kabul edilmekte, BMD ile yüksek oranda korele olmaktadır ve birçok çalışmada kullanılmaktadır (Poirel ve diğerleri, 2017). Öte yandan, disk difüzyon ve Etest şeritleri gibi rutin duyarlılık testi yöntemleri, genellikle dilüsyon yöntemleri ile karşılaştırıldığında direnç tespit oranlarında önemli ölçüde düşüşe neden oldukları için güvenilir kabul edilmektedir (Poirel ve diğerleri, 2017).

Veteriner antimikrobiyal duyarlılık testleri için klinik kesim noktaları şu anda mevcut olmadığı için, epidemiyolojik kesim noktaları (ECOFF) değerleri veteriner izolatlarını duyarlı (kazanılmış direnç olmadan) ve duyarsız (kazanılmış dirençle) olarak sınıflandırmak için kullanılmaktadır. Ayrıca, *mcr-1* pozitif suşlar genellikle kolistine düşük ila orta direnç gösterirler (0.5–32 $\mu\text{g/ml}$) ve genellikle mevcut ECOFF değerlerinin altında MIC değerlerine

sahiptirler ve bu suşlar genellikle saha suşları olarak sınıflandırılır (Jeannot ve diğerleri, 2017).

2.2.4. Kolistinin İnsan Hekimliğinde Kullanımı

Kolistin, ilk keşfinden sonra Gram-negatif bakterilere bağlı enfeksiyonların tedavisi için insan tıbbında kullanılmıştır. Ancak, nefrotoksisite gibi ciddi yan etkiler nedeniyle, 1970'lerde kinolonlar, β -laktamlar gibi daha etkili ve daha az toksik ilaçlar tarafından kolistin yerine geçmiştir. Kolistin'in kullanımı, sonraki 20 yıl boyunca topikal ve oftalmik kullanım ile sınırlı tutulmuş, sistemik kullanım ise sadece sistik fibrozisli hastalarda ikincil enfeksiyonların tedavisi için kullanılmıştır (Poirel ve diğerleri, 2017).

Ancak, son yirmi yılda durum dramatik bir şekilde değişmiştir. Çoklu ilaca dirençli (MDR), aşırı ilaca dirençli (XDR) veya hatta pan-ilaca dirençli (PDR) bakterilerin ortaya çıkması (Jeannot ve diğerleri, 2017), yılda 700.000 kişinin ölümüne neden olmaktadır; bu sayının 2050'ye kadar kanser kurbanlarını geçeceği tahmin edilmektedir (O'Neill, 2016; Webb ve diğerleri, 2017). "Post-antibiyotik dönem"e yaklaşan bir dünyada, kolistin, karbapenemaz üreten *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi dirençli bakterilere karşı kullanılan bir son çare ilacı olarak yeniden ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, Dünya Sağlık Örgütü (WHO), kolistini insanlar için kritik öneme sahip antimikrobiyaller listesine en yüksek öncelikle eklemiştir (WHO, 2017). Hayvanlar için ise kolistin, Gram-negatif enterik enfeksiyonlara karşı kullanılan son derece önemli bir antimikrobiyal ajan olarak kabul edilmektedir (OIE, 2015).

2.2.5. Kolistinin Veteriner Hekimliğinde Kullanımı

Kolistin, veteriner hekimlik alanında profilaksi, metafilaksi, bakteriyel enfeksiyon tedavisi ve büyüme teşviki için yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Avrupa Birliği'nde (AB) bu ilacın hayvancılıkta tarihsel kullanımıyla ilgili pek bilgi bulunmamakla birlikte, ilk uygulaması 1950'li yıllara kadar gitmektedir (Catry ve diğerleri, 2015). Günümüzde, kolistin içeren ürünler ulusal düzeyde yetkilendirilmiştir ve satışlar açısından, polimiksinler, gıda üreten hayvanlar için en çok satılan beşinci veteriner antimikrobiyaldir, üye ülkeler arasında

satışlarda geniş bir değişkenlik göstermektedir (EMA/ESVAC, 2017). ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ve Kanada Halk Sağlığı Ajansı (PHA), ağızdan kullanım için kolistin içeren bir ürünü hiç lisanslamamış olsa da, belgelenmiş off-label (etiket dışı) kullanıma izin veren düzenleme boşlukları bulunmaktadır (Webb ve diğerleri, 2017). Küresel düzeyde ise Çin, kolistin üretiminde lider konumda olup (17.5 milyon ton), aynı zamanda üretiminin %90'dan fazlasını tüketen en büyük tüketicidir (Liu ve diğerleri, 2016). Kolistin, bu uygulamanın izin verildiği ülkelerde yemlere düşük dozlarda eklenir ve büyüme teşvikçisi olarak kullanılır (Kempf ve diğerleri, 2013).

Kolistinin temel endikasyonu, domuzlarda, sığırlarda, küçük ruminantlarda ve tavuklarda non-invaziv, duyarlı *Enterobacteriaceae*'ye bağlı gastrointestinal (GI) enfeksiyonların tedavisidir (EMA, 2016). Kolistin ürünleri genellikle grup tedavileri olarak, oral yolla yem veya daha sık olarak içme suyu aracılığıyla uygulanır. 2013 yılında Avrupa'da tüketilen 495 ton polimiksinin büyük bir kısmı, özellikle domuzlara ve tavuklara oral olarak uygulanmıştır (Webb ve diğerleri, 2017). Örneğin Fransa'da, domuzların kolistine maruz kalması, toplam antibiyotik maruziyetinin üçte birini oluşturmuş ve tavuklar için bu oran daha da yüksek olmuştur (Kempf ve diğerleri, 2013). Ancak, her gıda üreten hayvan kategorisi için detaylı tüketim verilerinin eksikliği dikkat çekicidir ve şu anda yalnızca toplu veriler mevcuttur (EMA/ESVAC, 2017). Bununla birlikte, son Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis (Ortak Kurumlar Antimikrobiyal Tüketim ve Direnç Analiz) (JIACRA) raporunda, satış tahminlerini kullanarak hayvan türü düzeyinde antimikrobiyal tüketim verilerini çıkarmaya yönelik bir çaba, tavuk ve domuz kökenli indikatör *E. coli*'de polimiksin tüketimi ile direnç arasında önemli derecede pozitif bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur (ECDC/EFSA/EMA, 2017).

Kolistin özellikle domuz ve sığır üretiminde *E. coli* ve *Salmonella* kaynaklı enterik enfeksiyonları kontrol etmek (örneğin, sütten kesilmiş yavru domuzlarda görülen post-sütlenme ishal) veya metafilaksi için kullanılmaktadır (Catry ve diğerleri, 2015; Rhouma ve diğerleri, 2016). Tavuklar için ise, antimikrobiyal kullanımın yasak olduğu *Salmonella* enfeksiyonları dışında kolistin için uygun endikasyonlar bulunmamaktadır (Löhren ve diğerleri, 2009). Gerçekten de, birkaç yayın, tavuklarda kolistinin başlıca endikasyonunun hafif kolibasilozis tedavisi olduğunu belirtmektedir (Kempf ve diğerleri, 2013; Catry ve diğerleri, 2015). Bununla birlikte, tavuklarda oral uygulama sonrasında kolistinin biyoyararlılığının çok düşük olduğu kanıtlanmıştır (örneğin, kolistin oral uygulamasından sonra yumurtalarda çekilme süresi bulunmamaktadır) (Goetting ve diğerleri, 2011). Bu

nedenle elde edilen kan ve doku seviyeleri, tavuklarda kolibasillozisin yaygın belirtilerini tedavi etmek için yetersizdir (Nolan ve diğerleri, 2017). Bununla birlikte, polimiksinlerin hafif kolibasillozis tedavisinde yedi günden uzun süre ve daha yüksek dozlarda uygulanması halinde kullanılabileceğine dair anekdot kanıtlar bulunsa da, sulfa ilaçları, tetrasiklinler ve penisilinler gibi diğer ilaçlar kesinlikle daha uygun kabul edilmektedir (Löhren ve diğerleri, 2009).

Veteriner hekimlikte kolistin kullanımının tarihinde bir dönüm noktası, Birleşik Krallık'ın 2009'da Avrupa İlaç Kurumu (EMA)'na başvurusu olmuştur. Bu başvuru, gıda üreten hayvanlarda içme suyu aracılığıyla kullanılan kolistin dozajı ve geri çekilme sürelerindeki farklılıklardan kaynaklanan kamusal ve hayvan sağlığı endişelerini dile getirmiştir. Veteriner İlaç Kullanımı için İlaç Ürünleri Komitesi (CVMP) *Salmonella* spp. tarafından meydana gelen GI enfeksiyonlarını ulusal Salmonella kontrol programlarına müdahale nedeniyle, Ürün Özellikleri Özetinden çıkarmayı, negatif bir risk-fayda dengesi temelinde önermiştir (EMA, 2010). 2014 ve 2016'daki daha sonraki değişiklikler, profilaksi için tüm endikasyonları kaldırmış ve kolistin kullanımını sadece duyarlı, non-invaziv *E. coli*'ye bağlı enterik enfeksiyonların tedavisi ile sınırlamıştır. Ayrıca, kolistinin diğer antimikrobiyallerle kombinasyon halinde kullanımını yasaklamıştır (EMA, 2016).

2.2.6. Kommensal ve Patojen *E. coli*

Kolistin direnci, kanatlı hayvanlardan elde edilen *E. coli*'lerde, üzerinde önemle çalışılan bir konudur. Avrupa'daki iki antimikrobiyal direnç izleme raporu arasındaki sonuçlar, broyler ve hindi sürülerinden elde edilen *E. coli*'lerdeki kolistin direnci için karşılaştırılabilir niteliktedir. Her iki izleme yılı için (2014 ve 2016) prevalans genellikle tavuklarda ve hindilerde düşük olsa da hindilerde üç ila yedi kat daha yüksek yüzdelere görülmüştür (Apostolakos ve Piccirillo, 2018). Ayrıca, son çalışmalar, tavuk eti için düşük kolistin direnç oranlarını (3.9%) ancak hindi eti için orta seviyede oranları (10.1%) göstermiştir. Avrupa'daki diğer çalışmalardan elde edilen verilere göre, tavuk, hindi, tavuk gibi *E. coli*'lerdeki kolistin direnci, çok düşük seviyelerde olan kuzey ülkelerinden ($\leq 1\%$) Avrupa'nın geri kalanındaki düşük seviyelere ($\leq 10\%$) kadar değişmektedir (Apostolakos ve Piccirillo, 2018). Almanya (Irrgang ve diğerleri, 2016), İtalya (Battisti, 2016), İsviçre (Zurfluh ve diğerleri, 2016) gibi ülkelerde hindi sürüleri ve etlerinde orta seviyede yaygınlık bulunmuş

ve Portekiz'de yüksek prevalans saptanmıştır (Manageiro ve diğerleri, 2017). İtalya'da, klinik *E. coli* izolatlarında *mcr-1* ve *mcr-2* yaygınlığına odaklanan tek Avrupa çalışması olarak, hindi izolatlarının %22.9'u *mcr-1* pozitif bulunmuş, bunun karşılığında tavuklar ve tavukların yumurtlayan sürüleri için oranlar yaklaşık olarak 10 kat daha düşük olmuştur (Apostolakos ve Piccirillo, 2018). Diğer kümes hayvanı türlerine ait veriler (örneğin ördekler, kazlar) Avrupa'da mevcut değildir. Asya'da, gösterge *E. coli*'deki kolistin direnci yaygınlığı, Avrupa'ya kıyasla daha yüksekti. Çin'de, bu dirence sahip broyler izolatları düşük yüzdelerde bulunmuş, ancak Zhang ve diğerleri (2017) çalışmasında %14 prevalans saptanmıştır. Shen ve diğerleri'nin (2016) retrospektif çalışması, *mcr-1* geninin 1980'lerden beri kolistin direnci *E. coli*'lerde dolaştığını ve dirençli izolatların 2009'dan 2014'e kadar hızla arttığını göstermiştir, bu bulgu Huang ve diğerleri (2017) tarafından da doğrulanmıştır. Japonya ve Güney Kore'den gelen veriler, tavuklarda kolistin dirençli kommensal *E. coli*'nin düşük prevalansını göstermektedir; ancak çalışma sayısı sınırlıdır. Asya'daki tavuk klinik *E. coli* çalışmaları, Liu ve diğerleri'nin (2017) Çin'de bildirdiği %73.1 gibi istisnai yüksek prevalans dışında düşük kolistin direnç oranları rapor etmektedir. Tavuk dışındaki kümes hayvanları üzerine tek çalışma olan Yassin ve diğerlerinin (2017) çalışmasında, hastalıklı ördeklerden izole edilen kolistin dirençli klinik *E. coli*'lerin %6.8 prevalans bildirilmiştir. Güney Amerika'dan Brezilya'da yapılan çalışmalarda Lentz ve diğerleri (2016), çok düşük MIC değerlerini (0.25–2 mg/l) ve 343 izolatın 10'unun *mcr-1* pozitif olduğunu bildirirken; Monte ve diğerlerinin (2017) çalışmasında tavuk etinde gen prevalansı orta düzeyde bulunmuştur. Afrika'dan sınırlı sayıda çalışma, Güney Afrikalı ve Tunuslu broylerlerde düşük prevalanslı klinik ve kommensal *E. coli*'ler göstermiştir. Yapılan bu retrospektif araştırma, *mcr-1*'in düşük prevalansını ve uluslararası bir kümes hayvanı kaynaklı izolat koleksiyonunda bu genin kommensal izolatlardaki yokluğunu ortaya koymuştur (Barbieri ve diğerleri, 2017).

2.2.7. Kanatlılardan Elde Edilen Bakteri İzolatlarında Kolistin Direnci ve *mcr* Genleri

İtalya'da son yıllarda yayınlanan bir makalede, tavuklardan elde edilen bakteri izolatlarındaki kolistin direnci ve *mcr* genleri üzerine 62 çalışmanın verileri incelenmiştir (Apostolakos ve Piccirillo, 2018). Çoğunlukla 2016 ve 2017 yıllarında yapılan çalışmalarda, özellikle Çin, Japonya, Danimarka ve Portekiz gibi ülkelerde kolistin direnci ve *mcr* genlerinin yaygınlığına dair bilgiler sunulmuştur (Apostolakos ve Piccirillo, 2018). Ayrıca,

2008 ile 2012 yılları arasında toplanan 229 klinik *E. coli* suşu üzerinde yapılan bir çalışmada, *mcr-1* geninin varlığı incelenmiştir (Cavicchio ve diğerleri, 2015; Niero ve diğerleri, 2018). Bulgulara göre, suşların %12.6'sında *mcr-1* geni tespit edilmiş, ancak *mcr-2* pozitif suş bulunmamıştır. *mcr-1* geni taşıyan *E. coli* suşları özellikle hindilerde daha yüksek oranda bulunmuştur. Genetik analiz, tüm suşların orijinal *mcr-1* sekansına tamamen uyduğunu göstermiştir (NCBI accession number: NG_050417). Bu suşların çoğu, Avrupa Birliği'nin kolistinle ilgili önerilen standartlarını aşan MIC değerlerine sahip olduğu bildirilmektedir (EUCAST, 2018).

Kolistin direnci ve *mcr* genlerinin kanatlı hayvanlardaki prevalansı, özellikle kuzey ülkeleri olmak üzere Avrupa'da genel olarak düşük kalmaktadır. Kuzey ülkelerinde kolistin veteriner uygulamalarında ya hiç kullanılmamakta ya da minimal düzeyde kullanılmaktadır. Daha yüksek tespit oranlarının seyrek görülmesi, bazı AB ülkelerinde artan kolistin kullanımı ile ilişkilendirilebilir. Daha önceki tahminler, kolistin kullanımı ile kanatlı hayvanlarda direnç arasında önemli bir ilişki olduğunu öne sürmüştü, ancak bu bağlantıyı doğrulamak ve hayvanlardaki kolistin kullanımını azaltmaya yönelik önlemlerin etkisini değerlendirmek için kanatlı hayvanlara yönelik ayrıntılı tüketim verileri elde etmek gerekmektedir (Apostolakos ve Piccirillo, 2018).

İtalya'da yapılan bir çalışmada *mcr-1* için genel bir prevalansın %12,7 olduğunu ortaya koydu ve bu da *mcr-1* geninin 2016 yılında bildirilmeden önce İtalyan kanatlı hayvan popülasyonunda dolaştığını göstermektedir (Apostolakos ve Piccirillo, 2018). İlginç bir şekilde, *mcr-1* pozitif *E. coli*'nin prevalansının broyler ve tavuklara kıyasla hindi popülasyonunda daha yüksek olduğu bulunmuştur, ancak bazı izolatların mevcut EUCAST ECOFF değerine göre vahşi tip olarak sınıflandırıldığı görülmüştür. Son Avrupa çalışmaları, hindi ve hindi etinde diğer kanatlı üretim türlerine kıyasla yüksek kolistin direnç oranlarına işaret etmiş ve bu fenomenin altında yatan nedenleri anlamak için kapsamlı bir incelemeyi önermiştir (Apostolakos ve Piccirillo, 2018).

Kolistin direnci, özellikle tavuklarda *Salmonella* spp. için, genellikle doğal olarak dirençli *S. Enteritidis* ile ilişkilidirken, diğer serotipler için direncin muhtemelen *mcr* genleri aracılığıyla olduğu düşünülmektedir. Küresel olarak en büyük tavuk eti üreticilerinden Çin ve Brezilya'da, tavuklarda kolistin kullanımının tedavi ve büyüme teşvik pratiği nedeniyle çeşitli bakteri türlerinde yüksek direnç prevalansı görülmüştür. Bu endişe verici eğilim karşısında, kolistin genel yönetimini azaltmaya ve büyümeyi teşvik eden kullanımını yasaklamaya yönelik düzenlemeler yapılmıştır. Verilerin hala sınırlı veya eksik olduğu bölgelerde, özellikle

zoonotik patojenler açısından (örneğin, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *Salmonella* spp. gibi), kolistin direncinin epidemiyolojisi ve prevalansı üzerine daha derinlemesine bilgi edinmek gereklidir (Apostolakos ve Piccirillo, 2018).

İncelenen veriler, *mcr-1*'in genellikle kolistin dirençli tavuk kökenli bakteriler arasında yüksek prevalans gösterdiğini ancak bu direnç belirleyicisinin tek başına katkıda bulunan mekanizma olmadığını göstermektedir. Kromozomal mutasyonlar ve diğer *mcr* genlerinin de katkıda bulunduğu görülmektedir. Gelecekteki araştırmalarda, tavuklarda yeni *mcr* genlerinin keşfi ve bunların hızlı tespiti için çoklu polimeraz zincir reaksiyonu protokollerinin geliştirilmesi göz önüne alındığında, tüm *mcr* genlerinin izlenmesi için sürekli gözetim gereklidir (Apostolakos ve Piccirillo, 2018).

İncelenen çalışmalarda benzer gözlemler, *mcr-1* taşıyan tavuk izolatlarının genellikle duyarlılık sınırına yakın ve bazen 0.25 mg/l gibi düşük değerlerde MIC'lere sahip olduğunu göstermektedir. Bu tür direnç fenotiplerine sahip bakterilerin veteriner izolatlarında tespit edilmesi, rutin izleme işlemlerinden kaçınabilecekleri ve tespit edilmemiş bir şekilde yayılabilecekleri anlamına gelir, bu da *mcr* genlerinin yaygınlığının yanlış bir şekilde düşük tahmin edilmesine neden olabilir (Apostolakos ve Piccirillo, 2018).

İtalya'da yapılan çalışmada *mcr-1* pozitif *E. coli* suşlarının kinolonlar ve geniş spektrumlu sefalosporinlere direnç de dahil olmak üzere çeşitli antimikrobiyallere karşı dirençli bulunmuştur (Apostolakos ve Piccirillo, 2018). Birçok çalışma, genellikle kritik öneme sahip antimikrobiyalları içeren çoklu antibiyotik direnç fenotipleri ve genotipleri içeren kolistin dirençli izolatların varlığını rapor etmektedir. Bu durum, tavuk üretim zincirinde çoklu antibiyotik dirençli bakterilerin dolaşımı endişe verici bir fenomen olup, dünya genelinde en önemli protein kaynaklarından birine yönelik potansiyel risklerin ayrıntılı bir şekilde değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir (Apostolakos ve Piccirillo, 2018).

Kolistin etkinliğini koruma amacıyla küresel bir "One Health" çabası devam etmektedir. Avrupa'da, Üye Devletlere 2020'ye kadar kolistin satışlarında %65'lik bir azalma elde etme çağrısı yapılmıştır. Veteriner hekimler genellikle non-invaziv *E. coli*'ye karşı kolistin tedavisi uygulamaktadırlar. Ancak kanatlı hayvanlardaki kolistin direncindeki artış, *E. coli* dışındaki diğer endikasyonların az olması ve bu antimikrobiyalın kolibasilloza karşı etkinliğinin zayıf olması göz önüne alındığında, kanatlı hayvanlardaki kolistin kullanımı dikkatlice gözden geçirilmelidir. Kolistin direnci eğilimleri göz önüne alındığında, hayvanlardaki kolistin

kullanımını azaltmaya ve büyümeyi teşvik eden kullanımını yasaklamaya yönelik düzenlemelerin önemi daha da artmaktadır (Apostolakos ve Piccirillo, 2018).

Türkiye'de kolistin direnci ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. (Kürekçi ve diğerleri 2018), tavuk eti örneklerinden ilk *mcr-1* pozitif *E. coli* izolatını bildirmiştir. Adıgüzel ve diğerleri (2021), test edilen 500 örnekten perakende tavuk etinde kolistine dirençli *E. coli* taşıyan bir *mcr-1* bulmuştur. (Erzaim ve İkiz 2021), İstanbul'da kesime gönderilen tavuklardan alınan toplam 166 dışkı örneğinden izole edilen *E. coli*'de fenotipik olarak kolistin direncini ve genotipik olarak *mcr-1* geninin varlığının araştırmışlar ve *mcr-1* genini, fenotipik kolistin direnci sergileyen izolatlar dâhil (15 izolat, %7.5), çalışılan örneklerin hiçbirinde saptanmadıklarını bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, tavuklardan elde edilen *E. coli* suşlarında kolistin direnci ve *mcr* genlerinin varlığı, küresel ölçekte dikkate alınması gereken bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır. Bu durum, veteriner ve halk sağlığı açısından ciddi bir endişe kaynağı oluşturabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Cihazlar

Bu çalışmada Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan aletler (mikroskop (Olympus), kuru blok ısıtıcı (Allsheng MK 200-1, Çin), vorteks (Velp Scientifica, İtalya), mikrodalga fırın (Arçelik, Türkiye), mikrosantrifüj (Hettich Micro 200R, Almanya), biyogüvenlik kabini (Nüve, Türkiye), pH metre (Hanna, Çin), otoklav (Nüve, Türkiye), hassas terazi (Shimadzu, Japonya), etüv (Nüve, Türkiye), buzdolabı (Samsung, Japonya), distile su cihazı (Nüve, Türkiye), derin dondurucu (Samsung, Japonya), nanodrop (Maestro, ABD), termal döngüleme cihazı (Boeco, USA), görüntüleme cihazı (Vilber Lourmat Infinity VX2, Almanya), elektroforez tankı (VWR, USA)) ve otomatize mikrobiyoloji sistemi (BD Phoenix 100™, ABD) kullanıldı.

3.1.2. Hayvan Materyali

Bu çalışmanın materyalini, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi rutin teşhis laboratuvarına, bir yıl boyunca (Ocak-Aralık 2023), aynı kanatlı entegrasyon şirketine ait olan dört çiftlikte bulunan, 14-41 günlük yaşta, Ross 308 ırkı 200 broylerin hastalık teşhisi amacı ile gönderilmiş olan karaciğer örnekleri oluşturdu. Örnekler, steril bir petri kutusuna konularak soğuk zincir altında laboratuvara aynı gün laboratuvara gönderildi.

Broylerlerde klinik belirti olarak antibiyotik tedavisine yanıt vermeyen tekrarlayan öksürük, anoreksi, nefes darlığı, ishal, kilo kaybı, topallık ve mortalite görülmekteydi. Örneklerin alındığı tüm kümeslerde üst solunum yolu veya sindirim sistemi enfeksiyonlarının tedavisi için kolistin sülfat, sprey uygulama şeklinde, enfeksiyon tedavisi amacı ile zaman zaman kullanılmış olduğu bilgisi alındı.

Çalışmada kullanılan izolatlar, daha önceki çalışmalar için, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na rutin hastalık teşhisi amacıyla,

getirilmiş olan karaciğer örneklerinden elde edilmiştir. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Etik Kurul Yönetmeliği'nin 8(o) maddesi gereğince, "teşhis ve tedavi amaçlı klinik uygulamalar için" etik kurul izni gerekmemektedir.

3.1.3. Referans Suşlar

Moleküler çalışmalarda pozitif kontrol olarak *mcr-1* geni pozitif *E. coli* NCTC 13846 suşu negatif kontrol olarak da *mcr-1* geni negatif *E. coli* ATCC 25922 suşu; antibiyotik duyarlılık testinde ise kalite kontrol suşu olarak *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı.

3.1.4. Besiyerleri

Çalışmada *E. coli* izolasyonu ve identifikasyonu amacı ile Eosin-Methylene Blue Agar (Merc1.01347, Almanya), MacConkey Agar (Merc 1.05465, Almanya), izolatların pasajlanmasında kanlı agar (Merc 1.10886, Almanya), nutrient agar (Oxoid CM003, İngiltere), nutrient broth (Merc 1.05443, Almanya), izolatların uzun süreli saklanması için %20 gliserinli brain heart infusion broth (Oxoid CM1135, İngiltere) kullanıldı.

3.1.4.1. Eosin Methylene Blue Agar

Bir litre distile su içerisine 36 g olacak şekilde tartılan besiyeri mikrodalga fırında eritildi. pH'sı $7,2\pm0,2$ olarak ayarlandı. Otoklavda 121°C 'de 15 sterilize edilip $45-50^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutularak petrilere döküldü.

3.1.4.2. MacConkey Agar

Bir litre distile su içerisine 50 g olacak şekilde tartılan besiyeri mikrodalga fırında eritildi. pH'sı $7,2\pm0,2$ olarak ayarlandı. Otoklavda 121°C 'de 15 sterilize edilip $45-50^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutularak petrilere döküldü.

3.1.4.3. Kanlı Agar

Bir litre distile su içerisine 40 g olacak şekilde tartılan besiyeri mikrodalga fırında eritildi. pH'sı $7,2\pm0,2$ olarak ayarlandı. Otoklavda 121°C 'de 15 sterilize edilip $45-50^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutuldu. İçerisinde %7 oranında steril insan kanı olacak şekilde kan ilave edilerek petrilere döküldü.

3.1.4.4. Nutrient Agar

Bir litre distile su içerisine 28 g olacak şekilde tartılan besiyeri mikrodalga fırında eritildi. pH'sı $7,2\pm0,2$ olarak ayarlandı. Otoklavda 121°C 'de 15 sterilize edilip $45-50^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulularak petrilere döküldü.

3.1.4.5. Nutrient Broth

Bir litre distile su içerisine 8 g olacak şekilde tartılan besiyeri mikrodalga fırında eritildi. pH'sı $7,2\pm0,2$ olarak ayarlandı. Tüplere 5'er ml olacak şekilde dağıtılıp otoklavda 121°C 'de 15 dakika sterilize edildi.

3.1.4.6. Brain Hearth Infusion Broth

Yüzde yirmi gliserinli brain heart infusion broth hazırlamak için bir litre distile su içerisine 3,7 g olacak şekilde besiyeri tartılarak mikrodalga fırında eritildi. Üzerine 20 ml gliserin eklendi ve tekrar mikrodalga fırın yardımı ile homojenize edildi. pH'sı $7,2\pm0,2$ olacak şekilde ayarlandı. Besiyeri ependorf tüplere yaklaşık bir ml olacak şekilde dağıtılarak otoklavda 121°C 'de 15 dakika sterilize edildi. Hazırlanan besiyerleri kullanılıncaya kadar buzdolabı ısısında ($2-8^{\circ}\text{C}$) saklandı.

3.1.5. Ayıraç ve Boyalar

3.1.5.1. Gram Boyama Seti

Elde edilen izolatların Gram morfolojilerinin belirlenebilmesi için Gram boyama seti (Merck-111885) ticari olarak temin edilerek oda ısısında (2-8°C) muhafaza edildi.

3.1.5.2. Oksidaz Test Kiti

Elde edilen izolatların oksidaz aktivitelerinin belirlenebilmesi amacı oksidaz test kiti (Oxoid, BR 64) ticari olarak temin edilerek oda ısısında (2-8°C) muhafaza edildi.

3.1.5.3. Hidrojen Peroksit

İzolatların katalaz aktivitelerini belirlenebilmesi amacı ile için ticari olarak %3'lük hidrojen peroksit solüsyonu kullanıldı.

3.1.6. Antibiyogram ve Kolistin Direncinin Fenotipik Olarak Belirlenmesi

Otomatize mikrobiyoloji sisteminde BD Phoenix 100™ NMIC/ID-433 Gram-negatif identifikasyon kartı kullanılarak bakteriyel identifikasyon ile eş zamanlı olarak antibiyotik duyarlılık testleri yapıldı. Bu test sistemi BD Phoenix cihazı ve panellerinden oluşmaktadır. Sistem bakteri tanımlamada, bakteri üremesinin kontrolü için oksidasyon-redüksiyon indikatörü ile birlikte türbidometrik yöntemi kullanmaktadır (BD Phoenix, 2023).

3.1.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

3.1.7.1. Kullanılan Solusyon ve Boyalar

3.1.7.1.1. 10x Tris Borik Asit EDTA Buffer

Stok solüsyonu olan 10x Tris Borik Asit EDTA Buffer (TBE) aşağıdaki gibi hazırlanarak kullanım süresince oda ısısında muhafaza edildi.

Tris (hidroksimetil aminometan).....	108 g
Borik asit.....	55 g
EDTA.....	7,5 g

Tartılan maddeler 800 ml distile suda eritildi. Daha sonra toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanarak pH 8,0'e ayarlandı. Otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edildi. Hazırlanan stok solüsyon oda ısısında muhafaza edildi.

3.1.7.1.2. 0,5x TBE

Kullanım solüsyonu olan 0,5x TBE buffer aşağıdaki gibi hazırlanarak kullanım süresince oda ısısında muhafaza edildi.

10X TBE.....	50 ml
Distile su.....	950 ml

Hazırlanan kullanım kullanma solüsyonu, agaroz jel hazırlanmasında ve elektroforez işlemi esnasında tank içerisinde kullanıldı.

3.1.7.1.3. Yükleme Tamponu

Polimeraz zincir reaksiyonu sonrası amplifikasyon ürünlerini agaroz jele yüklemek ve sonrasında elektroforez yapabilmek için, 1 µl yükleme tamponu (6x, ThermoFisher R0611)

ile 5 µl ampikon karıştırılarak toplamda 6 µl olacak şekilde ürün elde edildi. Ticari olarak temin edilen yükleme tamponu buzdolabı ısısında (2-8°C) muhafaza edildi.

3.1.7.1.4. 5x FirePol® Master Mix

Bu çalışmada kullanılan 5x FirePol® Master Mix (12,5 mM MgCl₂) PZR için gerekli tüm reaktifleri içeren kullanıma hazır bir çözeltidir. Reaktif bileşiminde şunlar bulunur: FirePol® DNA polimerazı, 5x Reaksiyon Tamponu B (0,4 M Tris-HCl, 0,1 M (NH₄)₂SO₄, %0,1 ağırlık/volume Tween-20), 12,5 mM MgCl₂ (1x PCR çözeltisi – 2,5 mM MgCl₂), 1 mM dNTP (1x PCR çözeltisi – 200 µM dATP, 200 µM dCTP, 200 µM dGTP ve 200 µM dTTP) içermektedir.

3.1.7.1.5. Primerler

Kolistine fenotipik olarak dirençli olan ve en önemli kolistin mobil direnç geni olan *mcr-1* geni taşıyan *E. coli* izolatlarının belirlenebilmesi amacı ile Liu ve diğerleri tarafından 2016 yılında önerilen primerler kullanıldı (Tablo 1).

Tablo 1. Çalışmada kullanılan primerler.

Primer	Hedef Gen	Dizi (5'-3')	Amplikon büyüklüğü (bp)	T _m
<i>mcr-1.F</i>	<i>mcr-1</i>	CGGTCAGTCCGTTTGTTC	309	56,0
<i>mcr-1.R</i>		CTTGGTCGGTCTGTAGGG		58,2

3.1.7.1.6. Agaroz Jel

0,5X konsatrasyonda 100 ml TBE buffer içerisinde agaroz iki gr tartılarak ilave edildi. Karışım mikrodalga fırında orta sıcaklıkta yaklaşık 3 dk ısıtıldı ve agarozun erimesi sağlandı. Sonra 45-50°C'ye kadar karışım soğutuldu ve içerisine DNA boyası olarak 6 µl

miktarda Safe View (ABM, Canada) karıştırıldı. Hazırlanan karışım, elektroforez tablasına döküldü. Jelin katılaşması için yaklaşık 30-45 dakika beklendi.

3.1.7.1.7. Elektroforez

Hazırlanan jel elektroforez tankına konuldu. 0,5x TBE tampon solüsyonu, jelin üstüne gelecek şekilde tank içerisine döküldü. Amplikonlardan 5 µl alınarak, 1 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırıldı. Sonrasında elde edilen karışım jel üzerinde uygun kuyucuklara ilave edildi. Elektroforez işlemi 100 voltta 45 dakika olacak şekilde yapıldı.

3.1.7.1.8. Görüntüleme

Elektroforez işlemi uygulanan agaroz jel bilgisayarlı UV transillüminatör kutusu içine yerleştirilerek görüntülendi. Görüntüleme işleminden sonra amplikon büyüklükleri, pozitif ve negatif kontroller değerlendirildikten sonra, amplifiye edilen ürün Tablo 2’de bildirildiği gibi beklenen boyutta, net bir bant oluşturduğunda *mcr-1* genini taşıdığı kabul edildi.

3.1.7.1.9. Marker

Oluşan bantların büyüklüklerini görüntüleyebilmek için 100 bp’lık Fermentas® (USA) marka, 100-1000 bp arasında işaretli, DNA ladder kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bakteriyel İzolasyon

Kesim sırasında aseptik bir şekilde alınan karaciğer örneklerinin yüzeyleri, herhangi bir kontaminasyon riskini önlemek amacıyla, ateşte ısıtılmış bir spatül kullanılarak steril hale getirildi. Daha sonra, steril bir özge ile bu bölgeden alınan parçalardan MacConkey agarlara tek koloni ekimleri yapıldı. Ekim işlemi sonrasında petriler aerobik ortamda 37°C’de 18-24 saat inkübe edildi. MacConkey agarda laktozu fermente eden pembe kolonilerden bir tanesi seçilerek Eozin Metilen Mavis (EMB) agara pasajlandı. Petriler aerobik ortamda 37°C’de 18-24 saat inkübe edildi. EMB agarda metalik yeşil refle veren bir koloni Gram boyama ve biyokimyasal testler (oksidaz, katalaz, indol) yapıldı. Gram negatif çomak morfolojisinde olan, oksidaz negatif, katalaz ve indol testleri pozitif izolatlar *E. coli* şüpheli olarak kabul edildi (Koneman ve diğerleri, 1997). İzolatlar laboratuvar çalışmaları (BD Phoenix otomatize mikrobiyoloji sistemi kullanılarak bakteriyel identifikasyonları ve antibiyotik duyarlılık testleri; polimeraz zincir reaksiyonu ile de mcr-1 gen varlığı) yapılmaya kadar -80°C’de %20 gliserollü BHIB içerisinde saklandı.

3.2.2. Bakteriyel İzolatların BD Phoenix 100™ ile İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Yapılması

BD Phoenix 100™ NMIC/ID-433 kiti ile izolatların dokuz antimikrobiyal aileye ait 20 antibiyotiğe (aminoglikozid (AG): amikasin (AN), gentamisin (GM); karbapenem: ertapenem (ETP), imipenem (IMP), meropenem (MEM); cephem (CP): sefazolin (CFZ), sefuroksim (CXM), seftazidim (CAZ), seftriakson (CRO), sefepim (FEP); penisilin (P): ampisilin (AMP); β Laktam (BL): seftolozan tazobaktam (CT), amoksisilin klavulanat (AXC), ampisilin sulbaktam (AS), piperasilin tazobaktam (TZP); lipopeptid (LP): kolistin (COL); folat (F): trimetoprim sülfametoksazol (SXT); kinolon (K): siprofloksasin (CIP), levofloksasin (LF); tetrasiklin (T): tigesiklin (TGC)) karşı direnç durumları değerlendirilmektedir.

Testte, kalite kontrol suşu olarak da *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı. Antimikrobiyal duyarlılık test sonuçlarının yorumlanmasında Avrupa Antimikrobiyal

Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST) tarafından 2022 yılında tanımlanan duyarlılık sınır değerleri kullanıldı. Kolistin direncinin fenotipik olarak saptanması için EUCAST tarafından tanımlanan minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) sınır değerleri duyarlı ≤ 2 mg/L ve dirençli > 2 mg/L olarak tanımlanmıştır (EUCAST 2022).

Bakteriyel identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık testleri aşağıdaki gibi yapıldı:

Saf olarak üretilen kolonilerden tek bir tanesi alınarak kanlı agara pasajlandı.

Phoneix Spec cihazı ile kültürden ID Broth'a (Katalog No: 246001) 0,5-0,6 arası Mc Farland bulanık olacak şekilde süspansiyon yapıldı ve broth vorteks ile karıştırılarak homojenize edildi.

AST indikatör solüsyonu AST broth tüpü (8 ml) içine, bir damla olacak şekilde eklendi. Tüpün kapağı kapatıldı solüsyon hafifçe çalkalandı.

ID Broth tüp içindeki süspansiyonundan 25 µl alınıp AST broth tüpü içine aktarıldı. Tüpün kapağı kapatılarak AST tüpü birkaç kez hafifçe çalkalandı.

Bakteriyel identifikasyon ve antimikrobiyal duyarlılık testleri için hazırlanan kullanılacak paneller panel tablası üzerine yerleştirildi.

Hazırlanan bakteri süspansiyonları, panelin uygun ID ve AST broth kuyucuklara boşaltıldı. Panel üzerindeki delikler plastik kapak yardımı ile kapatıldı.

Paneller en en kısa sürede (en fazla 30 dakika içerisinde) cihaza yerleştirildi.

Ana ekran açılarak örneklerin kayıt işlemi gerçekleştirildi. Bakteri süspansiyonlarını içeren paneller cihaza yerleştirilerek 18-24 saatlik inkübasyondan sonra sonuçlar değerlendirildi. Cihazda aynı anda bakteri identifikasyonu yapıldığı gibi antibiyotik duyarlılık test sonuçları da sistem üzerinden alınmıştır.

İzolat en az üç veya daha fazla antimikrobiyal aileye dirençli olması durumunda çoklu antibiyotik dirençli olarak kabul edildi (Magiorakos ve diğerleri, 2012).

3.2.3. DNA İzolasyonu, Miktar Tayinleri ve Saflık Kontrolleri

DNA ekstraksiyonu için sonikasyon yöntemi kullanıldı (Maniatis ve Sambrook, 1989). Sonikasyon yöntemi ile DNA ekstraksiyonu aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

E. coli stok kültüründen kanlı agara ekim yapılarak 37°C'de 24 saat inkübe edildi.

İnkübasyon süresi sonunda kültürden tek koloni alınarak Nutrient Broth'a ekim pasajlandı. Aynı şekilde 37°C'de 18-24 saat inkübasyonun ardından tüpler üç dk 12000 rpmde 5 dak santrifüj edildi süpernatant atıldı.

Tortu 1 ml steril deiyonize su ile sulandırıldı ($\sim 10^8$ /ml). Süspansiyon vortekslendi. Süspansiyona 40 Hz'de 10 dakika sonikasyon işlemi (IsoLab, Türkiye) uygulanarak bakteri hücre duvarının parçalanması sağlandı. Süspansiyon tekrar 12000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatantta bulunan DNA her PZR reaksiyonunda 3 µl olarak kullanıldı.

Ekstraksiyonu yapılan genomik DNA'lar miktar tayinleri ve saflık kontrolleri için nanodrop kullanıldı. Bunun için DNA ekstraksiyonu yapılan her DNA'dan 3 µl alınarak 260 nm ve 280 nm'deki absorbans değerleri tespit edildi. OD260/OD280 oranının 1,6-2,0 arasında olması DNA'nın saf ve PZR için uygun olduğunu; aşağıda olması ise RNA kontaminasyonu ve yukarıda olması ise protein kontaminasyonu olduğunu göstermektedir (Turner ve ark, 2004).

3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

BD Phoenix 100 otomatize sistem kullanılarak identifikasyonları ve antibiyotik duyarlılık testleri yapılan, fenotipik olarak da kolistin dirençli olduğu saptanan izolatlar çalışma materyali olarak kullanıldı. En sık görülen kolistin direnç genlerinden birisi olan mobilize kolistin direnç geni 1'in saptanması PZR ile gerçekleştirildi.

PZR reaksiyonu için 25 µl toplam hacimde mastermiks hazırlamak için, 5x master miks enzimi tampon çözeltisi için son konsantrasyon 1x, 10 pmol/µl konsantrasyonda her bir primer için için son konsantrasyon 0,4 pmol, DNA son konsantrasyon 50 ng/µl olacak şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan malzemeler, konsantrasyonları ve kullanılan miktarları Tablo 2'de belirtilmiştir.

Tablo 2. Mastermiksın hazırlanma oranları.

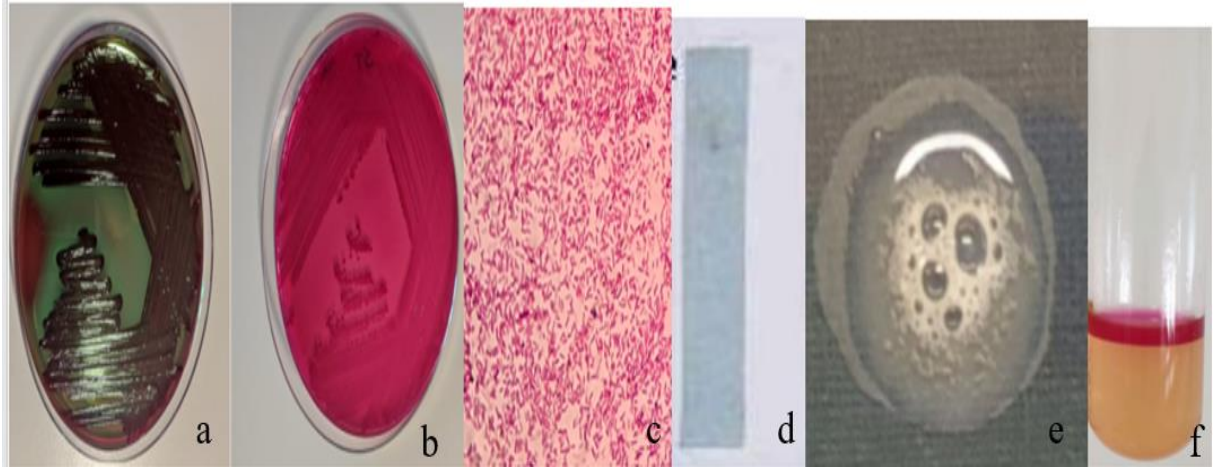
Malzeme (Konsantrasyon)	İstenen Son Konsantrasyon	1 örnek (µl)
Buffer (5x)	1 X	5
Primer-F (10 pmol)	0,4 pmol	1
Primer-R (10 pmol)	0,4 pmol	1
DNA	50 ng/µl	3
dH₂O	Son miktara tamamlanır	15

Mastermiksler hazırlandı. PZR tüpleri numaralandırıldı. Her örnek için 22 µl master miks her tüpe konuldu. Ekstrakte edilen DNA'dan 3'er µl eklendi. Tüplerin kapakları kapatıldı ve termal döngüleme cihazlarına yerleştirildi. Termal döngüleme cihazı primerlerin T_m dereceleri ve ürün boyutları dikkate alınarak programlandı. DNA amplifikasyonu için cihaz programı: “95°C’de 5 dk ön denatürasyonu takiben; 30 siklus 95°C’de 30 sn denatürasyon, 54°C 30 sn bağlanma, 72°C 60 sn uzama ve 72 °C’de 10 dk son uzama” olacak şekilde ayarlandı.

4. BULGULAR

4.1. Bakteriyeel İzolasyon ve İdentifikasyon

Bu çalışmada, kolibasillozis şüpheli 200 broylerden 156 (%78,8) *E. coli* izolasyonu yapıldı. EMB agarda metalik yeşil refle veren ve MacConkey agarda pembe koloni oluşturan Gram negatif çomak morfolojisinde, oksidaz negatif, katalaz ve indol testleri pozitif izolatlar *E. coli* şüpheli olarak değerlendirildi (Resim 1).



Resim 1. *E. coli* izolatlarının biyokimyasal testleri. **a.** EMB agarda üreyen *E. coli* **b.** MacConkey agarda üreyen *E. coli* **c.** Gram negatif çomak morfolojisi **d.** Oksidaz test negatif **e.** Katalaz test pozitif **f.** İndol test pozitif.

E. coli şüpheli 156 izolatın hepsi BD Phoenix 100™ otomatize mikrobiyoloji sisteminde NMIC/ID 433 panelleri kullanılarak *E. coli* olarak identifiye edildi. Otomatize test sistemi yardımı ile gerçekleştirilen identifikasyon işlemi sonucunda izolatların biyokimyasal test sonuçları aşağıda gösterilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. *E. coli* izolatlarının biyokimyasal test sonuçları.

Test	Sonuç	Test	Sonuç	Test	Sonuç
A-ARARR	V	A-GLPRB	-	A-GLYB	-
A-GUGAH	-	A-LARGH	-	A-LGTA	V
A-LEUH	V	A-LPHET	-	A-LPROB	-
A-LPYR	-	A-LTRY	-	A-LYALD	V
A-ACT	-	C-ADO	-	C-CIT	-
C-CLST	V	C-DMNT	V	C-KGA	V
C-MLO	-	C-PXB	V	C-TIG	-
M-NAG	-	N-LGGH	-	N-LPROT	V
P-BDGLU	-	P-BPHO	V	R-BALL	V
R-BGEN	-	R-DEX	+	R-DFRU	+
R-DGAL	V	R-DGUA	+	R-DMLB	V
R-DSBT	V	R-DSUC	-	R-GRA	+
R-LARA	+	R-LRHA	V	R-MBGU	-
R-MTU	-	R-NGA	V	R-NGU	+
S-ORN	V	S-URE	-	t-ESC	-

V: Değişken

4.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi

E. coli olarak identifiye edilen izolatların antibiyotik duyarlılık testleri BD Phoenix 100TM otomatize sistemi ile NMIC/ID 433 panelleri kullanılarak gerçekleştirildi. Otomatize sistem kullanılarak, 156 *E. coli* izolatının dokuz antimikrobiyal aileye ait 20 antimikrobiyal ilaca karşı direnç durumları incelendi.

Antibiyotik duyarlılık testi sonucunda 156 *E. coli*'nin 10 (%6,4) tanesinin fenotipik olarak kolistin dirençli oldukları tespit edildi. Kolistin dirençli on izolatın antibiyotik duyarlılık test sonuçları aşağıda gösterilmiştir (Tablo 4, Tablo 5).

Tablo 4. Kolistin dirençli izolatların antibiyotik duyarlılık test sonuçları.

Antimikrobiyal Aile	Antibiyotik	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Aminoglikozid	Amikasin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Gentamisin	S	R	S	R	R	S	S	S	R	R
Carbapenem	Ertapenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Imipenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Meropenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cephem	Sefazolin	R	R	R	R	I	R	R	I	R	S
	Sefuroksim	R	R	I	R	S	R	R	R	R	S
	Sefotazidim	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S
	Seftriakson	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S
	Sefepim	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S
Penisilin	Ampisilin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Beta laktam	Seftolozan tazobaktam	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
	Amoksisilin klavulanat	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	Ampisilin sulbaktam	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	Piperasilin tazobaktam	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Folat	Trimethoprim sulfamethoksazol	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Kinolon	Siprofloksasin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	Levofloksasin	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S
Tetrasiklin	Tigesiklin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

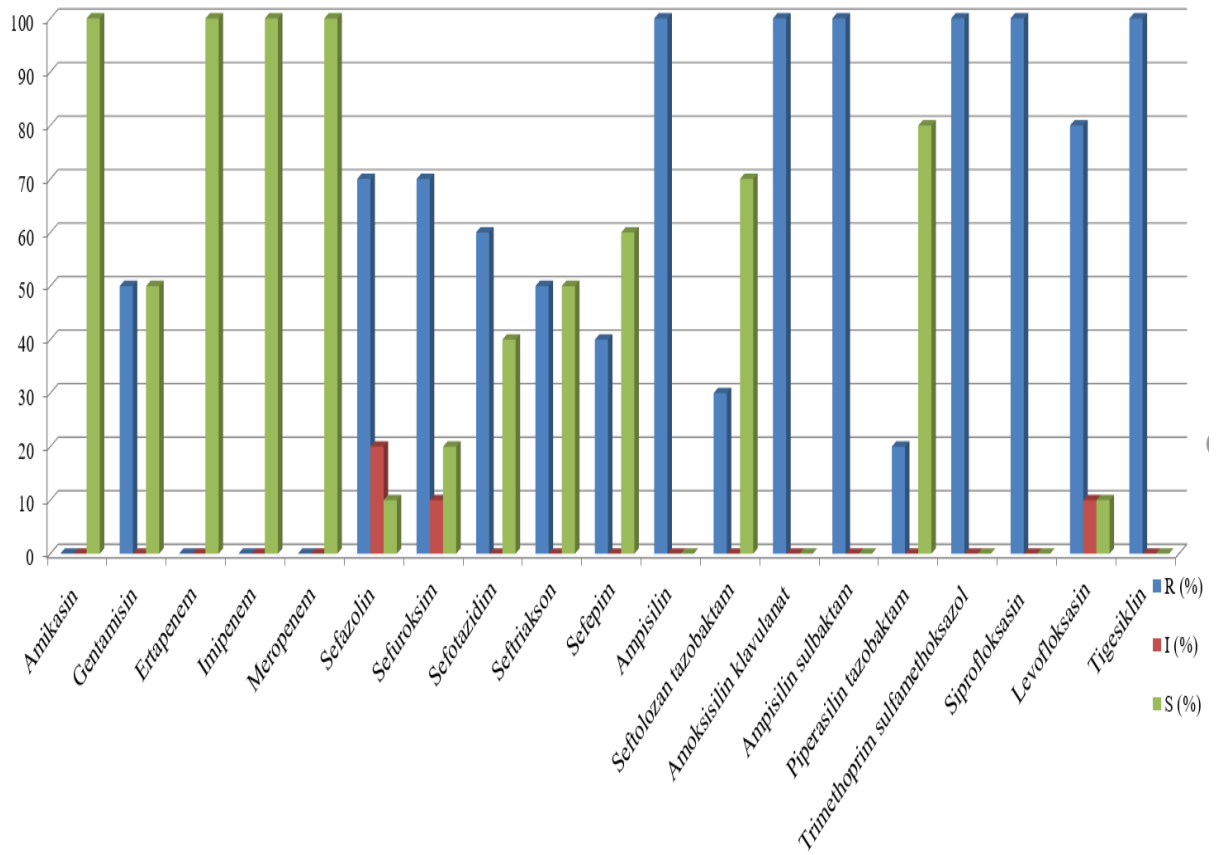
Kolistin dirençli *E. coli* izolatların 8 (%80)'inin levofloksasine; 7 (%70)'sinin sefazolin ve sefuroksime; 6 (%60)'sının sefotazidime; 5 (%50)'inin gentamisin ve seftriaksona; 4 (%40)'ünün sefepime; 3 (%30)'ünün seftolozan tazobaktama; 2 (%20)'sinin ise piperasilin tazobaktama dirençli oldukları saptandı. Kolistin dirençli izolatların hepsi amikasin, ertapenem, imipenem, meropenem duyarlı iken; ampisilin, amoksisilin klavulanat, ampisilin sulbaktam, trimethoprim sulfamethoksazol ve tigesiklin dirençli idi (Tablo 4, Tablo 5, Şekil 1).

Tablo 5. Kolistin dirençli *E. coli* izolatlarının antibiyotiklere karşı duyarlılık ve dirençlilik durumları.

Antimikrobiyal Aile-Antibiyotik Adı	Toplam (n=10)		
	R (%)	I (%)	S (%)
<u>Aminoglikozid</u>			
Amikasin	0 (0)	0 (0)	10 (100)
Gentamisin	5 (50)	0 (0)	5 (50)
<u>Karbapenem</u>			
Ertapenem	0 (0)	0 (0)	10 (100)
Imipenem	0 (0)	0 (0)	10 (100)
Meropenem	0 (0)	0 (0)	10 (100)
<u>Cephem</u>			
Sefazolin	7 (70)	2 (20)	1 (10)
Sefuroksim	7 (70)	1 (10)	2 (20)
Sefotazidim	6 (60)	0 (0)	4 (40)
Seftriakson	5 (50)	0 (0)	5 (50)
Sefepim	4 (40)	0 (0)	6 (60)
<u>Penisilin</u>			
Ampisilin	10 (100)	0 (0)	0 (0)
<u>Beta laktam</u>			
Seftolozan tazobaktam	3 (30)	0 (0)	7 (70)
Amoksisilin klavulanat	10 (100)	0 (0)	0 (0)
Ampisilin sulbaktam	10 (100)	0 (0)	0 (0)
Piperasilin tazobaktam	2 (20)	0 (0)	8 (80)
<u>Folat</u>			
Trimethoprim sulfamethoksazol	10 (100)	0 (0)	0 (0)
<u>Kinolon</u>			
Siprofloksasin	10 (100)	0 (0)	0 (0)
Levofloksasin	8 (80)	1 (10)	1 (10)
<u>Tetrasiklin</u>			
Tigesiklin	10 (100)	0 (0)	0 (0)

E. coli izolatları bazı antibiyotiklere (seftolozan tazobaktam, piperasilin tazobaktam) düşük (%10-%30), bazı antibiyotiklere (gentamisin, sefazolin, sefuroksim, sefotazidim, seftriakson, sefepim) orta (%31-%75) ve bazı antibiyotiklere (ampisilin, amoksisilin klavulanat, ampisilin sulbaktam, kolistin, trimethoprim sulfamethoksazol, siprofloksasin, levofloksasin, tigesiklin) ise yüksek (%76-%100) düzeylerde dirençli idi.

İzolatlar üzerinde en etkili antibiyotikler amikasin, ertapenem, imipenem, meropenem olurken; ampisilin, amoksisilin klavulanat, ampisilin sulbaktam, trimethoprim sulfamethoksazol ve tigesiklin etkisiz antibiyotikler idi.



Şekil 1. Kolistin dirençli *E. coli* izolatlarının antibiyotiklere karşı dirençlilik ve duyarlılık durumları.

Kolistin dirençli *E. coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılık testine göre dirençli, orta derecede duyarlı ve duyarlı oldukları antibiyotik sayıları aşağıda gösterilmiştir.

Tablo 6. İzolatların antibiyotik duyarlılık testine göre dirençli veya duyarlı oldukları antibiyotik sayıları.

	Antibiyotik Sayıları									
Antibiyotik duyarlılık test sonucu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dirençli	12	13	9	9	8	11	11	12	13	7
Orta derecede duyarlı	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
Duyarlı	7	6	9	9	10	8	7	6	6	12

Bir izolat 7, bir izolat 8, iki izolat 9, iki izolat 11, iki izolat 12, iki izolat 13 antibiyotiğe dirençli iken; üç izolat 6, iki izolat 7, bir izolat 8, iki izolat 9, bir izolat 10, bir izolat ise 12 antibiyotiğe karşı duyarlı idi.

4.2.1. Çoklu Antibiyotik Direnci

Kolibasillozisli broylerlerden elde edilen kolistin dirençli on *E. coli* izolatının hepsi (%100) çoklu antibiyotik direncine sahip idi (Tablo 8).

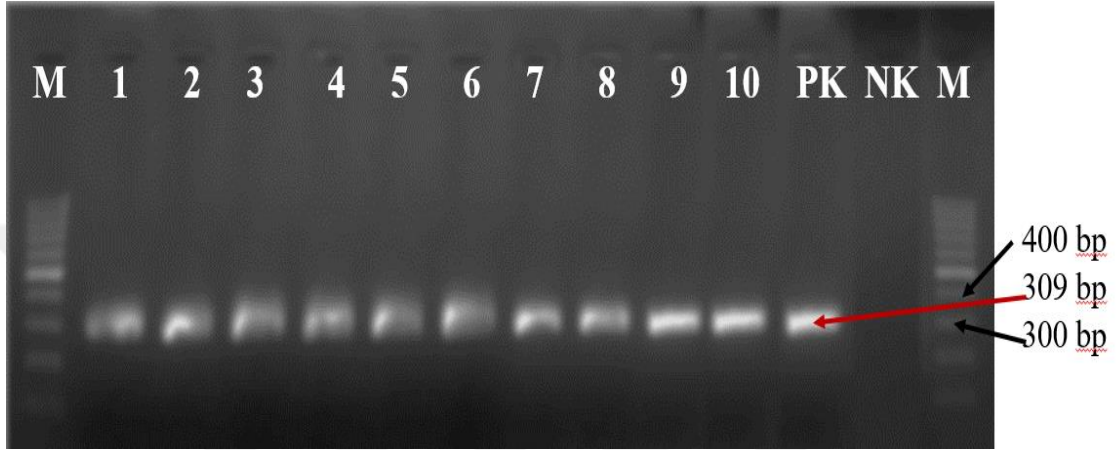
Tablo 7. İzolatların antibiyotik duyarlılık testine göre dirençli veya duyarlı oldukları antimikrobiyal aile sayıları.

	Antibiyotik duyarlılık test sonucu									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dirençli olunan antimikrobiyal aile sayısı	6	7	6	7	6	6	6	6	7	6

Kolistin dirençli on *E. coli* izolatının 7 (%70)'si 6, 3 (%30)'ü 7 antimikrobiyal aileye karşı dirençli idi.

4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Tüm izolatlardan elde edilen DNAlar *mcr-1* geni varlığı yönünden moleküler olarak polimeraz zincir reaksiyonu ile incelendi. Fenotipik olarak kolistin dirençli oldukları tespit edilen on izolatın hepsininin genotipik olarak da *mcr-1* genini taşıdıkları tespit edildi (Resim 1.)



Resim 2. *mcr-1* geninin kodladığı kolistin direnci için jel elektroforezi. M: 100 bp DNA Ladder, 1-10: *mcr-1* genine sahip saha izolatları (309 bp) 11: Pozitif Kontrol (*E. coli* NCTC 13846), NC: Negatif Kontrol (*E. coli* 25922).

Fenotipik olarak kolistin dirençli izolatların hepsinde plazmit aracılı *mcr-1* geni bulunuyordu (Resim 2.).

5. TARTIŞMA

Kolistin ya da polimiksin E, İkinci Dünya Savaşı'ndan kısa bir süre sonra keşfedilen dekaeptit antimikrobiyal bir bileşiktir. Ancak, sistemik toksisitesi nedeniyle halk sağlığına ciddi bir risk oluşturduğunun belirlenmesi sebebiyle kullanımı sınırlandırılmıştır. Son yıllarda, özellikle *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi çoklu ilaca dirençli Gram-negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlara karşı son çare antibiyotik olarak tekrar kullanılması artmıştır (Poirel ve diğerleri, 2017). İnsanlarda ve hayvanlarda mobil kolistin direnci belirleyicilerinin keşfi, antimikrobiyalın geleceği konusunda endişelere neden olmuştur (Apostolakos ve Piccirillo, 2018). Bu nedenle bu çalışmada, kolistin dirençli bakterilerle ilgili mevcut tedavi zorluklarını vurgulamak ve broyler tavuklarda kolistin direncine dair güvenilir veriler eldebilmek için APEC izolatlarında plazmit aracılı kolistin direnci sağlayan mobilize kolistin direnç geni 1 varlığının belirlenmesini ve kolistin dirençli izolatların antibiyotik direnç profillerinin incelenmesini amaçladık. *mcr-1* geninin birçok ülkeye yayıldığı ve çeşitli çevresel kaynaklardan izole edilen bakteri izolatlarında varlığı bildirilmiştir (Skov ve Monnet, 2016). Bu durum, hayvan yetiştiriciliği ve tarım alanlarından kaynaklanan kolistin direncinin çevreye ve insanlara geçişini artırabilir. Bu nedenlerle, *mcr-1* geninin yayılması ciddi bir halk sağlığı sorununa yol açabilir ve bu genin kontrol altına alınması, antibiyotik direnci ile mücadelede kritik bir öneme sahiptir.

Gıda üreten hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, özellikle Asya'da kümes hayvanları arasında kolistin direncinin arttığı gösterilmiştir (Kempf ve diğerleri, 2016; Webb ve diğerleri, 2017). Kümes hayvanlarının ucuz bir protein kaynağı olmaları ve kolistin direncinin artma eğiliminde olması, tavuklarda kolistin kullanımının detaylı bir şekilde değerlendirilmesini gerektirmektedir (Apostolakos ve Piccirillo, 2018).

Veteriner hekimlikte, kolistin genellikle hastalıkları önleme, tedavi veya büyüme teşvikinde kullanılmaktadır (Rhouma ve diğerleri, 2016). Ancak, 2016 yılında, bakteri türleri arasında transfer edilebilir bir plazmid aracılı gen keşfedilmiş ve bu durum küresel endişeye neden olmuştur (Liu ve diğerleri, 2016). Mobil kolistin direnç genlerinden olan *mcr-1* geni 2016 yılında bildirilmiştir (Liu ve diğerleri, 2016) ve birçok durumda hala direnç gelişim mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (Fukuda ve diğerleri, 2018). Epidemiyolojik

veriler, kolistin hayvancılıkta yaygın kullanımının, transfer edilebilir kolistin direncinin ortaya çıkmasına ve bu direncin hayvanlardan insanlara aktarılmasına dair kanıtlar olduğunu göstermiştir (Poirel ve Nordmann, 2016).

mcr-1 geni, bir bakteriden diğerine geçebilen küçük bir DNA parçası olan bir plazmid üzerinde bulunur. Genin hızla diğer bakterilere yayılma potansiyeli vardır ve halihazırda pek çok antibiyotiğe dirençli olan bakterilerin kolistine de dirençli hale gelme olasılığını artırmaktadır. Bu durum, antibiyotik direnci ile mücadelede kritik bir öneme sahiptir (Tenover, 2006).

Ülkelerde kolistin direncinin belirlenmesi ve bu konuda gen havuzlarının oluşturulması kolistin direnci ile ilgili genlerin yaygınlığını tespit edilmesi açısından çok önemlidir (Etebu ve Ukpang, 2016). *E. coli*'de kolistin direncini belirlemek için en çok kullanılan fenotipik yöntemler broth ve agar mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleridir. Fenotipik yöntemler standart yöntemlerdir. *Enterobacteriaceae* için MIC değerlerini belirleme referans olarak broth mikrodilüsyon yöntemi önerilmiştir (EUCAST, 2016). Ancak bu yöntemler zaman alıcıdır, pratik değildir ve laboratuvar becerisi gerektirir. Disk difüzyon yöntemi ise daha hızlı sonuçlar verir ve uygulanması basit bir yöntemdir. Ancak, standardize edilmiş disk difüzyon zon çaplarının olmaması ile birlikte duyarlılığını tespit etmede disk difüzyon testi kullanmak, kolistin büyük moleküler yapısı nedeniyle agara difüze olamamasından dolayı, sorunlu bir durumdur. Kolistin, agar üzerinde zayıf difüzyon gösterir. Bu nedenle disk difüzyon yönteminin yorum hataları yüksek seviyededir ve güvenilirliği azaltır (Hindler ve Humphries, 2013; EUCAST, 2022). Kolistin molekülü plastik yüzeylere kolayca bağlandığından, minimal inhibe edici konsantrasyonları (MIC) elde etmek için broth mikrodilüsyon yöntemi tek güvenilir test olarak kalır (Turlej-Rogacka ve diğerleri, 2017).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, *E. coli* izolatlarında kolistin direncinin belirlenmesi amacı ile otomatize sistemlerin kullanımının büyük hataya sebep olmadığı ve kabul edilebilir performans gösterdiği bildirilmiştir (Yiş, 2022; Zhang ve diğerleri, 2023). BD Phoenix 100 otomatize mikrobiyoloji sistemi, antimikrobiyal duyarlılık testlerini belirlemek için kullanılan otomatize bir sistemlerden birisidir. Bu sistem, minimum inhibe edici konsantrasyon değerlerini belirlemek için broth mikrodilüsyon yöntemini kullanır. BD Phoenix 100 otomatize bir sistem olması nedeniyle test süreçlerini hızlandırabilir ve operatör müdahalesini azaltabilir. Otomatize sistemler, standartlaştırılmış test koşulları sağlar ve bu da daha tutarlı sonuçlar elde edilmesine olanak verir. BD Phoenix 100, birçok farklı antibiyotiğe karşı duyarlılık testlerini aynı anda gerçekleştirebilir (BD Phoenix, 2023). Bu çalışmada, fenotipik

kolistin direncinin belirlenmesinde hızlı sonuçlar, standartlaştırılmış test koşulları ve çoklu antibiyotik testleri gibi avantajlara sahip olması nedeni ile otomatize mikrobiyoloji sistemlerinden birisi olan BD Phoenix 100 kullanılmıştır. Ancak, yüksek maliyet ve bazı hetero-direnç gibi özel durumları tespit etme zorluğu gibi dezavantajları da vardır. Bu çalışmada, otomatize sistem kullanılarak, izolatların 10 (%6.4) tanesinin fenotipik olarak kolistin dirençli olduğu tespit edildi. Ayrıca kolistin direncinin genetik mekanizmasını ortaya çıkarabilmek için, tüm izolatlar *mcr-1* gen varlığı yönünden de PZR ile incelendi. *mcr-1* geni taşıyan *E. coli* izolatlarının hepsi, otomatize sistem ile yapılan antibiyotik duyarlılık testinde MIC değerlerinin $>2 \mu\text{g/ml}$ olduğu saptandı.

Bu çalışmada izole edilen *mcr-1* geni taşıyan *E. coli*'ler, insan hastalıkları ve kümes hayvancılığı sektöründe kullanılan antibiyotiklerin (ampisilin, amoxicillin clavulanate, ampicillin sulbactam, trimethoprim sulfamethoxazole, ciprofloxacin, levofloxacin, tigecycline) çoğuna karşı dirençli olup tüm izolatlar aynı zamanda çoklu antibiyotik direncine de sahip idi. Benzer çoklu ilaç direnci daha önce tavuk etinden (Parvin diğerleri, 2020), tavuk çevresel ortamlarından (Amin diğerleri, 2020) ve insanlardan (Zhang diğerleri, 2023) elde edilen *mcr-1* geni taşıyan *E. coli*'lerde bildirilmiştir. Bu durum, kolistin direnci taşıyan bakterilerin çoklu ilaç direncine sahip olduğunu ve tedavi seçeneklerinin sınırlı olabileceğini göstermektedir.

Polimeraz zincir reaksiyonu tüm genom dizileme yöntemleri gibi genotipik yöntemler *mcr* genlerini hızlı ve spesifik olarak tespit edebilir (Sekyere ve diğerleri, 2016). Plazmid aracılığıyla kolistin direncinin *E. coli* ve *Klebsiella* spp'de *mcr-1* geninin varlığıyla gerçekleştiğini ilk kez Liu ve diğerleri (2016) bildirmiş ve Çin'de yapılan bu çalışmada domuzlardan elde edilen *E. coli*'lerde %20.6, domuz eti ve tavuk ürünlerinde ise %14.9 *mcr-1* geni saptandığı bildirilmiştir (Liu ve diğerleri, 2016). Avrupa'da *Salmonella* ve *E. coli* için direnç oranları genellikle düşük olup, yüksek kolistin direnci düzeylerinin seyrek görüldüğü belirtilmektedir. Kolistin kullanılmayan (örneğin Norveç) veya gıda üretiminde minimal miktarda kullanılan (örneğin Danimarka) ülkelerde dirençsizlik veya çok düşük oranlar kaydedilmiştir. Çin ve Brezilya gibi büyük tavuk eti üreten ülkelerde, kolistinin yaygın kullanımı, direnç belirleyicilerinin çeşitli bakteri türlerinde yayılmasına neden olmuştur. Endişe verici bir şekilde, bu bakteriler genellikle geniş spektrumlu sefalosporinler gibi diğer kritik öneme sahip antimikrobiyallere de dirençlidir (Apostolakos ve Piccirillo, 2018).

Türkiye'de kolistin sülfat toz halinde genellikle kanatlı hayvanların *E. coli* ve salmonella türlerinden ileri gelen sindirim ve solunum sistemi enfeksiyonlarını tedavi etmek

için uygulanmaktadır. Bu çalışmada da, materyal alınan çiftliklerde tedavi amacı ile broyler tavuklarda kolistin kullanılmış olduğu bilinmektedir. Türkiye'de ise kolistin direnci ile ilgili çalışmalar sınırlı olmakla birlikte, bu konuda artan bir farkındalık bulunmaktadır. Hatay'da rapor edilen *mcr-1* pozitif *E. coli* izolatu, ülkede bu konudaki ilk vaka olarak öne çıkmıştır (Kurekci ve diğerleri, 2018). İstanbulda yapılan bir çalışmada broyler bağırsak örneklerinden elde edilen 200 *E. coli* izolatının 15'inde (%7,5) fenotipik olarak kolistin direnci saptanmış ancak fenotipik kolistin direnci sergileyen izolatlar dahil, incelenen örneklerin hiçbirinde *mcr-1* genine rastlanmadığı bildirilmiştir. Kolistin direnci tespit edilmesine rağmen plazmit aracılı *mcr-1* geninin bulunmaması, direncin kromozom kökenli olduğunu ya da dirençten sorumlu başka genlerin olduğunu düşündürmüştür (Erzaim ve İkiz, 2021). Son olarak Hatay'da tavuk sürülerinden izole edilen kommensal *E. coli* suşlarında kolistin direncinin araştırılması ve moleküler karakterizasyonunun belirlemek amacı ile yapılan bir çalışmada kloakal sürüntülerden izole edilen toplam 454 kommensal *E. coli* suşunda kolistin direnci fenotipik ve genotipik olarak incelenmiş ve beş izolatın PZR ile *mcr-1*'i taşıdığı bulunmuştur. Bu çalışmada gerçekleştirilen tüm genom ve çoklu lokus dizi tiplemesine dayalı filogenetik analiz, suşların dünyanın farklı bölgelerinden önceden bildirilen tavuk ve insan klinik izolatlarından *mcr-1* taşıyan izolatlarla yakın ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Aslantaş ve Küçükaltay, 2023). Kromozomal dirence sahip izolatlar, plazmid aracılığıyla direnç transferi yapmazlar, bu nedenle direncin diğer bakterilere yayılma riski daha düşüktür. Bu çalışmada ise İstanbul'da yapılan çalışmanın aksine fenotipik olarak kolistin dirençli olarak tespit edilen izolatların hepsinde *mcr-1* geni tespit edilmiş ve direncin plazmid aracılı yani mobilize olduğu saptanmıştır. Plazmid aracılığıyla transfer edilen *mcr-1* geni, diğer bakterilere kolistin direnci kazandırabilir, bu da hastalık yayılma riskini artırabilir. Ayrıca, *mcr-1* geni, hayvansal kaynaklardan insanlara geçebilir ve bu durumda zoonotik enfeksiyon riskini artırabilir. Bu çalışma da dahil olmak üzere, yurdumuzda yapılan diğer çalışmalar da göz önüne alındığında (Adıgüzel ve diğerleri, 2021; Erzaim ve İkiz, 2021), kolistin direncinin tavuk etinden elde edilen izolatlarda varlığını sürdürdüğünü ve bu durumun geniş bir coğrafyada önemli bir problem olduğunu görülmektedir.

E. coli'nin antimikrobiyal ajanlara karşı direnci, hem gelişmekte olan hem de gelişmiş ülkelerde ortaya çıkan bir tehdittir (Rahaman ve diğerleri, 2014). Bu nedenle, izolatların antibiyotik direnç desenlerini araştırmak, onların ortaya koyabileceği direnç tehdidini anlamak önemlidir. Bu çalışmada incelenen kolistin dirençli *E. coli* izolatlarında ampisilin, amoksisilin klavulanat, ampisilin sulbaktam, kolistin, trimethoprim sulfamethoksazol, siprofloksasin, levofloksasin, tigesikline yüksek düzeyde direnç tespit ettik. Bu yüksek direnç

oranları, bu antibiyotiklerin veteriner hekimlik alanında yaygın kullanımı veya yanlış kullanımı nedeniyle ortaya çıkmış olabilir; bu durum, insanları enfekte edebilen ve edinilmiş bulaşıcı hastalıklara katkıda bulunabilen antimikrobiyal dirençli bakterilerin birikimine yol açmıştır (Rahaman ve diğerleri, 2014; Kamal, 2016). Ayrıca, daha önce yapılan çalışmalarda da benzer şekilde tavuk izolatlarının sırasıyla trimetoprim/sülfametoksazol (Clifford ve diğerleri, 2018), enrofloksasin (Zhang ve diğerleri, 2018) ve tetrasiklin (Jahantigh ve diğerleri, 2020) ve siprofloksasine (Pormohammad ve diğerleri, 2019) yüksek oranlarda direnç dikkat çekmektedir. Muhtemelen, bu antibiyotikler için yüksek direnç oranları, materyal alınan işletmelerdeki bu antibiyotiklerin kullanılmaları ile ilgili olabilir. Şu anda, siprofloksasin tavuk endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu antibiyotiğin, aynı sınıftan antibiyotiklerin çapraz dirence neden olabileceği, bu durumun yüksek direnç oranlarına katkıda bulunabileceği unutulmamalıdır (Uddin ve diğerleri, 2022). Tetrasiklinler ve trimetoprim sülfametoksazol gibi antibiyotikler, tavuk yetiştiriciliğinde yaygın olarak ve yemde büyüme promotorü olarak kullanılmaktadır. Genellikle, tavuk çiftçileri bu ilaçları bir veterinerin reçetesiz önerisi olmadan kullanır (Sarker ve diğerleri, 2019). Bangladeş'teki bir çalışma, tavuk çevrelerindeki çoklu ilaç direncine sahip *E. coli*'nin %94'ünün kolistin MIC'sinin ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ olduğunu ve bunların %13,5'inin *mcr-1* pozitif olduğunu bildirmiştir (Amin ve diğerleri, 2020). Yine benzer şekilde son yıllarda yapılan başka bir çalışmada da şaşırtıcı bir şekilde, test edilen tüm *mcr-1* pozitif *E. coli* izolatlarının çoklu ilaç direncine sahip olduğu bulunmuştur (Uddin ve diğerleri, 2022). Bu çalışmada bu çalışmalara paralel bir şekilde incelenen tüm *mcr-1* pozitif *E. coli* izolatlarının çoklu ilaç direncine sahip idi. Benzer şekilde kolistin dirençli izolatların aynı zamanda çoklu antibiyotik dirençli oldukları farklı yıllarda yapılan çalışmalarla da bildirilmiştir (Maciucă ve diğerleri, 2019; Al Azad ve diğerleri, 2019). Daha önce *mcr-1* kolistin direnç geninin çoklu ilaç dirençli bir plazmidde bulunduğu rapor edilmiştir (Rahaman ve diğerleri, 2014). Çoklu ilaç direncine sahip suşların, muhtemelen antimikrobiyal ajanların keyfi kullanımı sonucunda ortaya çıkan bir durum olduğu görülmektedir. Dirençli izolatların hayvandan insana doğrudan geçme riski göz önüne alındığında, bu, hem veteriner hekimlik hem de insan sağlığı için ciddi bir sorundur (Marshall ve Levy, 2011).

Çin'de tarım üretim sisteminde 1980'lerin başlarından bu yana kolistin yaygın bir şekilde kullanılmış (Wang ve diğerleri, 2017) ve bu durum da bundan sonraki yıllarda da *mcr-1*'in küresel yayılımının ortaya çıkmasına neden olmuştur (Maciucă ve diğerleri, 2019). Son yıllarda tavuk bağırsaklarından izole edilen *E. coli*'lerde fenotipik kolistin direnci %60 gibi

oldukça yüksek oranlarda tespit edilmiştir (Islam ve diğerleri, 2020; Uddin ve diğerleri, 2022). Bu çalışmalarda, daha önceki yıllarda bu bölgede tavuk endüstrisinde muhtemelen diğer antimikrobiyallerle birlikte kolistin sıkça kullanıldığını ve kolistin kullanımının, *mcr* genlerine ve fenotipik dirence sahip bakterilerin oranında önemli bir artışa neden olduğu bildirilmiştir. Çin'de tavuk örneklerinin %28'inde *mcr*-1 taşıyan bir çalışma, bunun insanlarla ve hayvanlarla ilişkilendirildiğini göstermiştir (Liu ve diğerleri, 2016). Hollanda'daki bir çalışma, tavuk örneklerinde *mcr*-1'in beklenmedik yüksek bir insidansını bulmuştur (%24,8) (Schrauwen ve diğerleri, 2017). Özellikle Bangladeş'te insanlarda ve hayvanlarda antibiyotik kullanımının düzensiz olduğu ülkelerde, tavuk *Enterobacteriace*'deki *mcr*-1 geninin daha yüksek oranda bulunması endişe vericidir.

Bu çalışmada, örnek alınan çiftliklerde tigesiklin tedavi veya profilaksi amacı ile broyler tavuklarda kullanılmamıştı. Ancak izolatların hepsinin tigesikline dirençli olduğu saptandı. Bu duruma yol açan nedenler şunlar olabilir: Öncelikle, *E. coli* izolatları bulundukları ve temas ettiği ortamdan veya başka herhangi bir kaynaktan tigesiklin direnç genini kazanmış olabilirler. Antibiyotik direncinin bakteriler arasında hızlı bir şekilde yayılmasını sağlayan önemli mekanizmadan birisi, antibiyotik direnç genlerinin plazmitler aracılığıyla taşınmasıdır. Bir diğer sebep ise çiftliklerde çeşitli amaçlar için sıklıkla kullanılan tetrasikline karşı gelişmiş olan direncin bakterilerde ribozomal hedeflerde veya taşıma sistemlerinde değişikliklere yol açması ve bunun da tigesiklin direncini de tetikleyebilmiş olma ihtimalidir. Tetrasiklin ve tigesiklin, aynı ribozomal hedeflere bağlanarak bakteri hücrelerinin protein sentezini engelleyen ve aynı etki mekanizmasına sahip iki antimikrobiyal ajandır. Bu nedenle tetrasikline karşı gelişmiş olan direnç, bir şekilde, tigesikline karşı direncin gelişimine katkı sağlamış olabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, APEC izolatlarında *mcr-1* geninin varlığı belirlenmiş ve fenotipik olarak kolistin dirençli izolatların antibiyotik direnç profilleri incelenmiştir. Bulgular, özellikle kolistin direncinin yaygınlığını ve diğer antibiyotiklere olan etkisini vurgulamaktadır.

Çalışmada fenotipik olarak kolistin dirençli olan tüm izolatların genotipik olarak *mcr-1* genini taşıdığı tespit edilmiştir, bu da kolistin direncinin plazmit aracılığıyla mobilize olduğunu göstermektedir.

Elde edilen sonuçlar, kolistin direncinin APEC izolatlarında yaygın bir sorun olabileceğini ve bu durumun antibiyotik tedavi seçeneklerini sınırlayabileceğini göstermektedir. Antibiyotik direncinin hayvanlardan insanlara geçiş riski halk sağlığı açısından ciddi bir tehdit oluşturabilir. Kolistin, insan sağlığı için son çare antibiyotik olarak kabul edilmektedir ve bu direncin yayılması, klinik tedavileri zorlaştırabilir. Ayrıca, izolatların çoklu antibiyotik direncine sahip olmaları, tedavi stratejilerini daha da karmaşık hale getirebilir.

Bu çalışmanın sonuçları, hayvansal kaynaklı patojenlerdeki antibiyotik direncinin izlenmesi ve kontrolü için önlemlerin alınması gerektiğini vurgulamakta, veteriner sağlık politikalarının gözden geçirilmesi ve kolistin kullanımının sıkı bir şekilde düzenlenmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, hayvan yetiştiriciliği sektöründe antibiyotik kullanımının izlenmesi ve sürdürülebilir uygulamaların teşvik edilmesi, antibiyotik direncinin kontrol altına alınması için kritik bir adımdır. Çiftlik hayvanlarında antibiyotik direnci ile mücadele eden kontrol stratejilerinin oluşturulması ve uygulanması, hem hayvan sağlığını hem de insan sağlığını korumak için önemlidir. *mcr-1* geninin daha geniş bir izleme ve kontrol programına dahil edilmesi, bu direnç geninin yayılmasını önlemede etkili bir strateji olabilir.

Mobil kolistin direnç genlerinin ortaya çıkması, kalabalık kümes ortamlarında yaşayan hayvanlarda antibiyotik direnç genlerinin daha kolay yayılmasına neden olabilir. Bu durum, artan antibiyotik direnci, zoonotik hastalık riski, tedavi zorlukları ve ilaç endüstrisinde sorunlara yol açabilir. Bu nedenle, antibiyotik direncinin yayılmasını engellemek için kontrol

stratejileri büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, bu çalışma, kolistin direnci ve genetik yayılımı konusunda daha fazla araştırma yapılmasının ve uygun önlemlerin alınmasının önemini vurgulamaktadır. Gelecekteki çalışmalarda daha geniş bir örneklem grubu ve farklı coğrafi bölgelerden alınan örneklerin dahil edilmesi, bu riskin daha kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesine olanak sağlayacaktır.



KAYNAKLAR

- Adıgüzel, M.C., Baran, A., Wu, Z., Cengiz, S., Dai, L., Oz, C., ... Şahin, O. (2021). Prevalence of colistin resistance in *Escherichia coli* in eastern Turkey and genomic characterization of an *mcr-1* positive strain from retail chicken meat. *Microbial Drug Resistance*, 27(3):424-432. doi: 10.1089/mdr.2020.0209
- Agunos, A., Léger, D., Carson, C. (2012). Review of antimicrobial therapy of selected bacterial diseases in broiler chickens in Canada. *Canadian Veterinary Journal*, 53, 1289–1300. doi: -
- Al Azad, M.A.R., Rahman, M.M., Amin, R., Begum, M.I.A., Fries, R., Husna, A., ... Lampang, K.N. (2019). Susceptibility and multidrug resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from cloacal swabs of live broiler chickens in Bangladesh. *Pathogens*, 8(3): 118. doi: 10.3390/pathogens8030118
- Amin, M.B., Sraboni, A.S., Hossain, M.I., Roy, S., Mozmader, T.A.U., Unicomb, L., ... Islam, M.A. (2020). Occurrence and genetic characteristics of *mcr-1* positive colistin resistant *E. coli* from poultry environments in Bangladesh. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 22:546–552. doi: 10.1016/j.jgar.2020.03.028
- Apostolakos, I. ve Piccirillo, A. (2018). A review on the current situation and challenges of colistin resistance in poultry production. *Avian Pathology*, 47(6), 546-558. doi: 10.1080/03079457.2018.1524573
- Aslantaş, Ö. ve Küçükaltay, K. (2023). Investigation and molecular characterization of colistin resistance in commensal *Escherichia coli* strains isolated from broiler flocks. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 78(3): 25-35. doi: -
- Awad, A.M., El-Shall, N.A., Khalil, D.S., Abd El-Hack, M.E., Swelum, A.A., Mahmoud, A.H., ... Sedeik, M.E. (2020). Incidence, Pathotyping, and Antibiotic Susceptibility of Avian Pathogenic *Escherichia coli* among Diseased Broiler Chicks. *Pathogens*, 9 (2), 114. doi: 10.3390/pathogens9020114
- Barbieri, N., Nielsen, D.W., Wannemuehler, Y., Cavender, T., Hussein, A., Yan, S., ... Logue, C.M. (2017). *mcr-1* identified in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Plos One*, 12(3):e0172997. doi: 10.1371/journal.pone.0172997
- Battisti, A. (2016). Transferable colistin resistance mediated by the *mcr-1* gene is widespread among *Escherichia coli* and is emerging in *Salmonella* in the Italian fattening Turkey

industry. 26th european congress of clinical microbiology and infectious disease. Amsterdam, the Netherlands.

- BD Phoenix-Otomatik Bakteri Identifikasyon ve Antibiyotik Duyarlılık Testi. (2023). <https://www.bd.com/en-uk/offerings/capabilities/microbiology-solutions/clinical-microbiology/identification-and-susceptibility-testing/bd-phoenix-automated-identification-and-susceptibility-testing-system>, adresinden erişildi.
- Bryskier, A. (2005). Peptide antibiotics. In A. Bryskier (Ed.), *Antimicrobial agents: Antibacterials and antifungals*, 1st edn (pp. 826–879). Sterling: ASM Press. doi: <https://doi.org/10.1128/9781555815929.ch30>
- Catry, B., Cavaleri, M., Baptiste, K., Grave, K., Grein, K., Holm, A., ... Edo, J.T. (2015). Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46, 297–306. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.06.005
- Cavicchio, L., Dotto, G., Giacomelli, M., Giovanardi, D., Grilli, G., Franciosini, M.P., ... Piccirillo, A. (2015). Class 1 and class 2 integrons in avian pathogenic *Escherichia coli* from poultry in Italy. *Poultry Science*, 94, 1202–1208. doi: 10.3382/ps/pev095
- Clifford, K., Desai, D., da Costa, C.P., Meyer, H., Klohe, K., Winkler, A., ... Zaman, M.H. (2018). Antimicrobial resistance in livestock and poor quality veterinary medicines. *Bull World Health Organ*, 96, 662–664. doi: 10.2471/BLT.18.209585
- Collingwood, C., Kemmett, K., Williams, N. ve Wigley, P. (2014). Is the Concept of Avian Pathogenic *Escherichia coli* as a Single Pathotype Fundamentally Flawed? *Frontiers in Veterinary Science*, 14:1:5. doi: 10.3389/fvets.2014.00005
- de Brito, B.G., Gaziri, L.C.J. ve Vidotto, M.C. (2003). Virulence Factors and Clonal Relationships among *Escherichia coli* Strains Isolated from Broiler Chickens with Cellulitis. *Infection Immunity*, 71(7):4175-7. doi: 10.1128/IAI.71.7.4175-4177.2003
- Dho-Moulin, M. ve Fairbrother, J.M. (1999). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research*, 30, 299–316. doi: -
- Dziva, F. ve Stevens, M.P. (2008). Colibacillosis in poultry: Unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathology*, 37, 355–366. doi: 10.1080/03079450802216652
- EMA. (2010). *European Medicines Agency*. “Opinion following an Article 35 referral for veterinary medicinal formulations containing colistin at 2 000 000 IU per ml and intended for administration in drinking water to food producing species.”

- EMA. (2016). *European Medicines Agency*. Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health.
- EMA/ESVAC. (2017). EMA (European Medicines Agency) and ESVAC (European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption). Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2015.
- Erzaim, N. ve İkiz, S. (2021). Investigation of Phenotypic and *mcr-1*–Mediated Colistin Resistance in *Escherichia coli*. *Acta Veterinaria Eurasia*, 47(2), 82-87. doi: 10.5152/actavet.2021.20003
- Etebu, E. ve Ukpong, M. (2016). Bacterial resistance to antibiotics: Update on molecular perspectives. *Microbiology Research International*, 4(4), 40-49. doi: -
- EUCAST. (2018). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Data from the EUCAST MIC distribution website, last accessed 10/05/2018. <http://www.eucast.org>
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2022). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 12.0. Available from: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_12.0_Breakpoint_Tables.pdf. Accessed August 18.
- Fukuda, A., Sato, T., Shinagaw, M., Takahashi, S., Asai, T., Yokota, S., ... Tamura, Y. (2018) High prevalence of *mcr-1*, *mcr-3* and *mcr-5* in *Escherichia coli* derived from diseased pigs in Japan. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 51(1):163–164. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.11.010
- Ghunaim, H., Abu-Madi, M.A. ve Kariyawasam, S. (2014). Advances in vaccination against avian pathogenic *Escherichia coli* respiratory disease: Potentials and limitations. *Veterinary Microbiology*, 172, 13–22. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.04.019
- Goetting, V., Lee, K.A. ve Tell, L.A. (2011). Pharmacokinetics of veterinary drugs in laying hens and residues in eggs: A review of the literature. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 34, 521–556. doi: 10.1111/j.1365-2885.2011.01287.x
- Gregersen, R.H., Christensen, H., Ewers, C. ve Bisgaard, M. (2010). Impact of *Escherichia coli* vaccine on parent stock mortality, first week mortality of broilers and population diversity of *E. coli* in vaccinated flocks. *Avian Pathology*, 39, 287–295. doi: 10.1080/03079457.2010.495744
- Guabiraba, R. ve Schouler, C. (2015) Avian colibacillosis: Still many black holes. *FEMS Microbiology Letters*, 362, fnv118. doi: 10.1093/femsle/fnv118

- Hindler, J.A. ve Humphries, R.M. (2013). Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*, 51: 1678-1684. doi: 10.1128/JCM.03385-12
- Huang, X., Yu, L., Chen, X., Zhi, C., Yao, X., Liu, Y., ... Liu, J.-H. (2017). High prevalence of colistin resistance and *mcr-1* gene in *Escherichia coli* isolated from food animals in China. *Frontiers in Microbiology*, 8, 562. doi: 10.3389/fmicb.2017.00562
- Irrgang, A., Roschanski, N., Tenhagen, B.-A., Grobbel, M., Skladnikiewicz-Ziemer, T., Thomas, K., ... Käsbohrer, A. (2016). Prevalence of *mcr-1* in *E. coli* from livestock and food in Germany, 2010–2015. *Plos One*, 11. doi: e0159863.
- Islam, S., Urmi, U.L., Rana, M., Sultana, F., Jahan, N., Hossain, B., ... Nahar, S. (2020). High abundance of the colistin resistance gene *mcr-1* in chicken gut bacteria in Bangladesh. *Scientific Report*, 17292. doi: 10.1038/s41598-020-74402-4
- Jahantigh, M., Samadi, K., Dizaji, R.E., ve Salari, S. (2020). Antimicrobial resistance and prevalence of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolated from lesions of colibacillosis in broiler chickens in Sistan, Iran. *BMC Veterinary Research*, 16, 267
- Jeannot, K., Bolard, A. ve Plésiat, P. (2017). Resistance to polymyxins in gram-negative organisms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49, 526–535. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.11.029
- Johnson, T.J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S.J., Rosenberger, S.C. ve Nolan, L.K. (2008). Identification of Minimal Predictors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence for Use as a Rapid Diagnostic Tool. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 3987–3996. doi: 10.1128/JCM.00816-08
- Kamal Niaz, F. (2016). Emerging Issue of *Escherichia coli* Resistance: A Threat to Public Health. *Health Science Journals*, 10, e14. doi: -
- Kathayat, D., Lokesh, D., Ranjit, S. ve Rajashekara, G. (2021). Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC): An Overview of Virulence and Pathogenesis Factors, Zoonotic Potential, and Control Strategies. *Pathogens*, 10, 467. doi: 10.3390/pathogens10040467
- Kempf, I., Jouy, E. ve Chauvin, C. (2016). Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48(6):598–606. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.09.016
- Kempf, I., Fleury, M.A., Drider, D., Bruneau, M., Sanders, P., Chauvin, C., ... Jouy, E. (2013). What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceae in avian and pig production in Europe? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 42, 379–383. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.06.012

- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M. ve Schreckenberger, P.C. (1997). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Philadelphia, Lippincott, USA.
- Kurekci, C., Aydin, M., Nalbantoglu, O.U., ve Gundogdu, A. (2018). First report of *Escherichia coli* carrying the mobile colistin resistance gene *mcr-1* in Turkey. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 15 169–170. doi: 10.1016/j.jgar.2018.09.013
- Lemlem, M., Aklilu, E., Mohamed, M., Kamaruzzaman, N.F., Zakaria, Z., Harun, A., ... Saravanan, M. (2023). Phenotypic and genotypic characterization of colistin- resistant *Escherichia coli* with *mcr- 4*, *mcr- 5*, *mcr- 6*, and *mcr- 9* genes from broiler chicken and farm environment. *BMC Microbiology*, 23:392. doi: 10.1186/s12866-023-03118-y
- Lentz, S.A., de Lima-Morales, D., Cuppertino, V.M., de Nunes, L.S., da Motta, A.S., Zavascki, A.P., ... Martins, A.F. (2016). Letter to the editor: *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* gene isolated from poultry not exposed to polymyxins in Brazil. *Eurosurveillance*, 21, 30214. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.26.30267
- Liu, Y. ve Liu, J.H. (2018). Monitoring colistin resistance in food animals, an urgent threat. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 16(6):443–6. doi: 10.1080/14787210.2018.1481749
- Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., ... Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *mcr-1* in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Disease*, 16(2):161–8. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7
- Liu, C.M., Stegger, M., Aziz, M., Johnson, T.J., Waits, K., Nordstrom, L., ... Price, M.L. (2018). *Escherichia coli* ST131-H22 as a Foodborne Uropathogen. *mBio. ASM Journals*, 9 (4). doi: 10.1128/mbio.00470-18
- Löhren, U., Ricci, A. ve Cummings, T.S. (2009). Guide to antimicrobial use in animals (pp. 126–142). Oxford: Blackwell Publishing, Ltd.
- Lutful Kabir, S.M. (2010). Avian colibacillosis and salmonellosis: A closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7, 89–114. doi: 10.3390/ijerph7010089
- Maciucă, I.E., Cummins, M.L., Cozma, A.P., Rimbu, C.M., Guguianu, E., Panzaru, C., ... Timofte, D. (2019) Genetic Features of *mcr-1* Mediated Colistin Resistance in CMY-2-Producing *Escherichia coli* From Romanian Poultry. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2267. doi: 10.3389/fmicb.2019.02267

- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., ... Monnet, D.L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug resistant and pandrug resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18:268-281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
- Manageiro, V., Clemente, L., Graça, R., Correia, I., Albuquerque, T., Ferreira, E. ve Caniça, M. (2017). New insights into resistance to colistin and third-generation cephalosporins of *Escherichia coli* in poultry, Portugal: Novel blaCTX-M-166 and blaESAC genes. *International Journal of Food Microbiology*, 263, 67–73. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.007
- Maniatis, T. and Sambrook, J. (1989). Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Pres, USA.
- Marshall, B.M. ve Levy, S.B. (2011) Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4):718–33. doi: 10.1128/CMR.00002-11
- Mellata, M. (2013). Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: Infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne Pathogens and Disease Journal*, 10, 916–932. doi: 10.1089/fpd.2013.1533
- Monte, D.F., Mem, A., Fernandes, M.R., Cerdeira, L., Esposito, F., Galvão, J.A., ... Landgraf, M. (2017). Chicken meat as a reservoir of colistin-resistant *Escherichia coli* strains carrying *mcr-1* genes in South America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61, e02718–16. doi: 10.1128/AAC.02718-16
- Nhung, N.T., Chansiripornchai, N. ve Carrique-Mas, J.J. (2017). Antimicrobial Resistance in Bacterial Poultry Pathogens: A Review. *Frontiers in Veterinary Science*, 4, 126. doi: 10.3389/fvets.2017.00126
- Niero, G., Bortolaia, V., Vanni, M., Intorre, L., Guardabassi, L. ve Piccirillo, A. (2018). High diversity of genes and plasmids encoding resistance to third-generation cephalosporins and quinolones in clinical *Escherichia coli* from commercial poultry flocks in Italy. *Veterinary Microbiology*, 216, 93–98. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.02.012
- Nolan, L.K., Barnes, H.J., Vaillancourt, J.-P., Abdul-Aziz, T. ve Logue, C.M. (2017). Colibacillosis. In D. Swayne (Ed.). *Diseases of poultry*. 13th edn (pp. 751–805). Publisher: John Wiley & Sons, Ltd.
- OIE. (2015). World Organisation for Animal Health. OIE List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance.

- Olaitan, A.O., Morand, S. ve Rolain, J.-M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 5, 249. doi: 10.3389/fmicb.2014.00643
- Osman, K.M., Kappell, A.D., Elhadidy, M., ElMougy, F., El-Ghany, W.A.A., Orabi, A., ... Yousef, H.M.Y. (2018). Poultry hatcheries as potential reservoirs for antimicrobial-resistant *Escherichia coli*: A risk to public health and food safety. *Scientific Reports*, 8, 5859. doi: 10.1038/s41598-018-23962-7
- Palaniyandi, S., Mitra, A., Herren, C.D., Zhu, X., Mukhopadhyay, S. (2013). LuxS contributes to virulence in avian pathogenic *Escherichia coli* O78:K80:H9. *Veterinary Microbiology*, 166, 567–575. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.07.009
- Parvin, M.S., Talukder, S., Ali, M.Y., Chowdhury, E.H., Rahman, M.T. ve Islam, M.T. (2020). Antimicrobial resistance pattern of *Escherichia coli* isolated from frozen chicken meat in Bangladesh. *Pathogens*, 9(6):420. doi: 10.3390/pathogens9060420
- Peng, L.Y., Yuan, M., Cui, Z.Q., Wu, Z.M., Yu, Z.J., Song, K., ... Fu, B.D. (2018). Rutin inhibits quorum sensing, biofilm formation and virulence genes in avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 119, 54–59. doi: 10.1016/j.micpath.2018.04.007
- Poirel, L. ve Nordmann, P. (2016). Emerging plasmid-encoded colistin resistance: the animal world as the culprit? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(8):2326–7. doi: 10.1093/jac/dkw074
- Poirel, L., Jayol, A. ve Nordmann, P. (2017). Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clinical Microbiology Reviews*, 30, 557–596. doi: 10.1128/CMR.00064-16
- Pormohammad, A., Nasiri, M.J. ve Azimi, T. (2019). Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains simultaneously isolated from humans, animals, food, and the environment: A systematic review and meta-analysis. *Infection and Drug Resistance*, 12, 1181–1197. doi: 10.2147/IDR.S201324
- Rahaman, M.T., Rahman, M., Rahman, M.B., Khan, M.F.R., Hossen, M.L., Parvej, M.S. ve Ahmed, S. (2014). Poultry Salmonella Specific Bacteriophage Isolation and Characterization. Bangladesh. *Journal of Veterinary Medicine*, 12, 107–114. doi: 10.3329/bjvm.v12i2.21264
- Rasheed, M.U., Thajuddin, N., Ahamed, P., Teklemariam, Z., Jamil, K. (2014). Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources. *Revista do*

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 56(4):341–6. doi: 10.1590/s0036-46652014000400012

- Rhouma, M., Beaudry, F., Thériault, W. ve Letellier, A. (2016). Colistin in pig production: chemistry, mechanism of antibacterial action, microbial resistance emergence, and one health perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–22. doi: 10.3389/fmicb.2016.01789
- Saha, O., Hoque, M.N., Islam, O.K., Rahaman, M.M., Sultana, M., Hossain, M.A. (2020). Multidrug-Resistant Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strains and Association of Their Virulence Genes in Bangladesh. *Microorganisms*, 8, 1135. doi: 10.3390/microorganisms8081135
- Salam, M.A., Al-Amin, M.Y., Salam, M.T., Pawar, J.S., Akhter, N., Rabaan, A.A. ve Alqumber, M.A.A. (2023). Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. *Healthcare*, 11, 1946. doi: 10.3390/healthcare11131946
- Salinas, L., Cardenas, P., Johnson, T.J., Vasco, K., Graham, J. Ve Trueba, G. (2019). Diverse commensal *Escherichia coli* clones and plasmids disseminate antimicrobial resistance genes in domestic animals and children in a semirural community in Ecuador. *mSphere*, 4(3):e00316–19. doi: 10.1128/mSphere.00316-19
- Sarker, M.S., Mannan, M.S., Ali, M.Y., Bayzid, M., Ahad, A. ve Bupasha, Z.B. (2019). Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from broilers sold at live bird markets in Chattogram, Bangladesh. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 6, 272–277. doi: 10.5455/javar.2019.f344
- Schrauwen, E.J.A., Huizinga, P., van Spreuwel, N., Verhulst, C., Kluytmans-van den Bergh, M.F.Q. ve Kluytmans, J.A.J.W. (2017), High prevalence of the *mcr-1* gene in retail chicken meat in the Netherlands in 2015. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 6, 83. doi: 10.1186/s13756-017-0242-8
- Sekyere, O. J., Govinden, U., Bester, L. A., ve Essack, S. Y. (2016). Colistin and tigecycline resistance in carbapenemase-producing gram negative bacteria: emerging resistance mechanisms and detection methods. *Journal of Applied Microbiology*, 121(3), 601-617. doi: 10.1111/jam.13169
- Shen, Z., Wang, Y., Shen, Y., Shen, J. ve Wu, C. (2016). Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals. *The Lancet Infectious Diseases*, 16, 293. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00061-X
- Skov, R. L. ve Monnet, D. L. (2016). Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. *Eurosurveillance*, 21(9), 30155. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.9.30155

- Tang, K.L., Caffrey, N.P., Nóbrega, D.B., Cork, S.C., Ronksley, P.E., Barkema, H.W., ... Ghali, W.A. (2017). Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Planetary Health*, 1, e316–e327. doi: 10.1016/S2542-5196(17)30141-9
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control*, 19(6), 3-10. doi: 10.1016/j.amjmed.2006.03.011
- Tivendale, K.A., Logue, C.M., Kariyawasam, S., Jordan, D., Hussein, A., Li, G., ... Nolan, L.K. (2010). Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease. *Infection and Immunity*, 78, 3412–3419. doi: 10.1128/IAI.00347-10
- Turlej-Rogacka, A., Xavier, B.B., Janssens, L., Lammens, C., Zarkotou, O., Pournaras, S., ... Malhotra-Kumar, S. (2017). Evaluation of colistin stability in agar and comparison of four methods for MIC testing of colistin. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37: 345-353. doi: 10.1007/s10096-017-3140-3
- Turner, P.C., McLennan, A.G., Bates, A.D. ve White, M.R.H. (2004). *Moleküler Biyoloji Önemli Notlar*. Nobel Yayınları.
- Uddin, M.B., Alam, M.N., Hasan, M., Hossain, S.M.B., Debnath, M., Begum, R., ... Uddin Ahmed, S.S. (2022). Molecular Detection of Colistin Resistance *mcr-1* Gene in Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Chicken. *Antibiotics*, 11, 97. doi: 10.3390/antibiotics11010097
- Valiakos, G. ve Kapna, I. (2021). Colistin resistant *mcr* genes prevalence in livestock animals (swine, bovine, poultry) from a multinational perspective. A systematic review. *Veterinary Sciences*, 8(11):265. doi: 10.3390/vetsci8110265
- Wang, Y., Xu, C., Zhang, R., Chen, Y., Shen, Y., Hu, F., ... Shen, Jianzhong. (2020). Changes in colistin resistance and *mcr-1* abundance in *Escherichia coli* of animal and human origins following the ban of colistin-positive additives in China: an epidemiological comparative study. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(10):1161–71. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30149-3
- Wang, S., Peng, Q., Jia, H.M., Zeng, X.F., Zhu, J.L., Hou, C.L., ... Qiao, S.Y. (2017). Prevention of *Escherichia coli* infection in broiler chickens with *Lactobacillus plantarum* B1. *Poultry Science*, 96, 2576–2586 doi: 10.3382/ps/pex061

- Wang, S., Zeng, X., Yang, Q. ve Qiao, S. (2016). Antimicrobial Peptides as Potential Alternatives to Antibiotics in Food Animal Industry. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 603. doi: 10.3390/ijms17050603
- Wang, Y., Tian, G.B., Zhang, R., Shen, Y., Tyrrell, J.M., Huang, X., ... Shen, Jianzhong. (2017). Prevalence, risk factors, outcomes, and molecular epidemiology of *mcr*-1-positive Enterobacteriaceae in patients and healthy adults from China: An epidemiological and clinical study. *The Lancet Infectious Diseases*, 17, 390–399. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30527-8
- Webb, H.E., Angulo, F.J., Granier, S.A., Scott, H.M. ve Loneragan, G.H. (2017). Illustrative examples of probable transfer of resistance determinants from food animals to humans: Streptothricins, glycopeptides, and colistin. *F1000Research*, 6, 1805. doi: 10.12688/f1000research.12777.1
- WHO. (2017). Critically important antimicrobials for human medicine. *Geneva: World Health Organization*.
- WHO. (2019). Critically important antimicrobials for human medicine.
- Yassin, A.K., Zhang, J., Wang, J., Chen, L., Kelly, P., Butaye, P., ... Wang, C. (2017). Identification and characterization of *mcr* mediated colistin resistance in extraintestinal *Escherichia coli* from poultry and livestock in China. *FEMS Microbiology Letters*, 364, 30589. doi: 10.1093/femsle/fnx242
- Yiş, R. (2022). Comparison of broth microdilution method with BD Phoenix, micro scan and E-test for carbapenem resistant *Enterobacterales*: colistin susceptibility testing. *Journal of Academic Research in Medicine*, 2(2):61-65. doi: 10.4274/jarem.galenos.2022.70299
- Zhang, Q., Yan, W., Zhu, Y., Jing, N., Wang, S., Yuan, Y., ... Liu, S. (2023). Evaluation of commercial products for colistin and polymyxin B susceptibility testing for *mcr*-positive and negative *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. *Infect. Drug Resist.* 16:1171–1181. doi: 10.2147/IDR.S400772
- Zhang, L., Fu, Y., Xiong, Z., Ma, Y., Wei, Y., Qu, X., ... Liao, M. (2018). Highly prevalent multidrug-resistant *Salmonella* from chicken and pork meat at retail markets in Guangdong, China. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2104. doi: 10.3389/fmicb.2018.02104
- Zhang, P., Shen, Z., Zhang, C., Song, L., Wang, B., Shang, J., ... Wu, C. (2017). Surveillance of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* from chicken and swine, China, 2008–2015. *Veterinary Microbiology*, 203, 49–55. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.02.008

Zurfluh, K., Buess, S., Stephan, R. ve Nüesch-Inderbinnen, M. (2016). Assessment of the occurrence of *MCR* producing Enterobacteriaceae in Swiss and imported poultry meat. *SDRP Journal of Food Science & Technology*, 1, 24–11. doi: 10.15436/JFST.1.4.5

