



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

Köpek Dışkılarından İzole Edilen Escherichia coli' lerde Kolistin Direncinin Araştırılması

Amina FARZALIZADE

DANIŞMAN

Prof. Dr.Beren BAŞARAN KAHRAMAN
(danışman imzalı olacaktır)

Veterinerlik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Veterinerlik Mikrobiyolojisi, Tezli Yüksek Lisans Programı

Haziran, 2024

TEZ KABUL VE ONAYI

..... tarafından, **Prof. Dr.**..... danışmanlığında hazırlanan "**Tez Adı**"başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **01/05/2021** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği**ile başarılı bulunarak **Yüksek Lisans Tezi**olarak kabul edilmiştir.

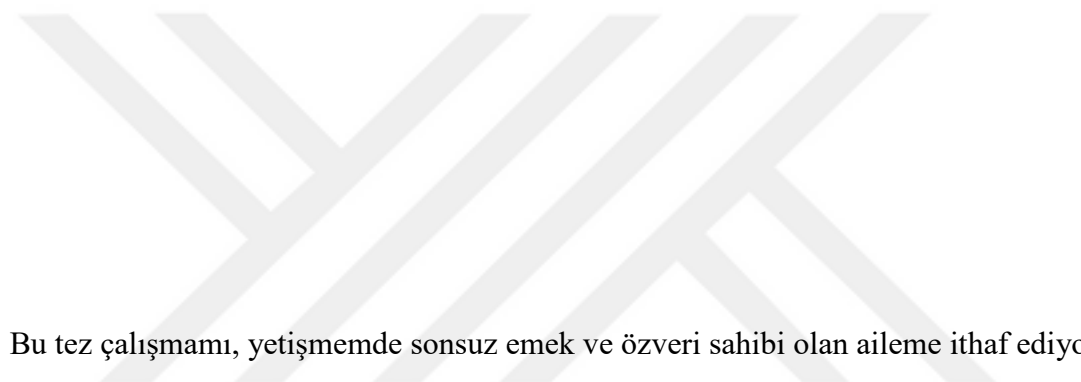
Tez Jürisi

	İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Prof. Dr.Xxxx XXXX	☒
	 Üniversitesi	Kabul
	 Anabilim Dalı	☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr.Xxxx XXXX	☐
	 Üniversitesi	Kabul
	 Anabilim Dalı	☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr.Xxxx XXXX	☐
	 Üniversitesi	Kabul
	 Anabilim Dalı	☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr.Xxxx XXXX	☐
	 Üniversitesi	Kabul
	 Anabilim Dalı	☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr.Xxxx XXXX	☐
	 Üniversitesi	Kabul
	 Anabilim Dalı	☐ Ret

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve bilimsel etik kuralları içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve her türlü hukuki sorumluluğu aldığımı kabul ederim.

Amina FARZALIZADE
(İmza)



Bu tez çalışmamı, yetişmemde sonsuz emek ve özveri sahibi olan aileme ithaf ediyorum.

BÜTÇE DESTEKLERİ

Köpek Dışkılarından İzole Edilen Escherichia coli' lerde Kolistin Direncinin Araştırılması

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: TYL-2023-37153

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi ve önerileriyle bana yol gösteren, desteğini esirgemeyen, motive eden çok değerli danışmanım Prof. Dr. Beren BAŞARAN KAHRAMAN'a,

Lisansüstü eğitimim süresince değerli bilgi ve önerileriyle bana yol gösteren Mikrobiyoloji Anabilim dalı Başkanı Prof. Dr. Seyyal AK'a, Mikrobiyoloji Anabilim dalı hocalarım Prof. Dr. Arzu Funda BAĞCIGİL, Prof. Dr. Serkan İKİZ, Prof. Dr. Kemal METİNER, Doç. Dr. Belgi DİREN SİĞİRCİ, tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen, Dr. Baran ÇELİK, Dr. Barış HALAÇ, Dr. A. Ilgın KEKEÇ ve teknisyenimiz Gülten KARAKUZ'a,

Tez çalışmam sırasında benden desteklerini esirgemeyen ve her zaman yanımda olduğunu hissettiren aileme çok teşekkür ederim.

Haziran 2024

Amina FARZALIZADE

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI	ii
BEYAN	iii
BÜTÇE DESTEKLERİ	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE	3
2.1. Polimiksin Sınıfı Antibiyotikler	3
2.2. Kolistin (Polimiksin E)	4
2.2.1. Kolistinin Kimyasal Yapısı	4
2.2.2. Kolistin Etki Mekanizması	5
2.2.3. Kolistinin Etki Spektrumu	5
2.2.4. Kolistinin Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri	6
2.2.5. Kolistinin Toksisitesi	6
2.3. <i>mcr</i> genleri	7
2.4. Kolistin Duyarlılık Testleri	11
2.4.1. Fenotipik yöntemler	11
2.4.2. Genotipik yöntemler	13
2.5. Kolistine Karşı Direnç Mekanizmaları	14
2.6. <i>E. coli</i> İzolatlarında Kolistin Direnci	16
2.7. Köpeklerde Kolistin Direncinin Prevalansı ve Dünyadaki Dağılımı	17
2.8. Evcil Hayvanlarda Kolistin Tedavisi	19
2.9. Kolistin Direnci İçin Tek Sağlık Perspektifi	20

2.10. Kolistin Direncini Tersine Çevirmek için Güncel Gelişmeler.....	22
2.11. Gözetim stratejileri	23
3. YÖNTEM	25
3.1. GEREÇ	25
3.1.1. Örnekler.....	25
3.1.2. Besiyerleri	28
3.1.3. Ayraçlar ve Kimyasallar.....	28
3.1.4. Diğer.....	29
3.1.5. Standart Suşlar.....	29
3.2. YÖNTEM	30
3.2.1. İzolasyon	30
3.2.2. İdentifikasyon.....	30
3.2.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	30
4. BULGULAR	33
4.1. İzolasyon & İdentifikasyon.....	33
4.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	34
4.2.1. Çoklu İlaç Direnç Varlığının Araştırılması	34
4.2.2. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ile Kolistin Direncinin Doğrulanması	36
5. TARTIŞMA.....	37
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	41
KAYNAKLAR.....	42
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	48
ETİK KURUL İZİN YAZISI	49
KURUM İZNİ YAZILARI.....	51
ÖZGEÇMİŞ	52

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 4-1MacConkey agarda *E. coli* görünümü.....33



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2-1MIC (A) vahşi tip dağılımları ve (B) klinik kırılma noktaları ve Kolistin MİK vahşi tip dağılımları	13
Tablo 3-1Örnek alım tarihi, köpeğin adı, yaşı, cinsiyeti ve ırkı.....	25
Tablo 3-2Antimikrobiyaller, disk içerikleri, inhibisyon zonu ve kaynak.....	31
Tablo 4-1Kullanılan antimikrobiyaller (disk içeriği), zon çapları, kaynaklar ve izolatların sonuçları	34

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

°C	Santigrat derece
µl	Mikrolitre
ATCC	AmericanTypeCulture Collection
CFU	ColonyFormingUnit
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
g	Gram
H ₂ S	Hidrojen Sülfür
L	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
AMR	Antimikrobiyal direnç
MDR	Çoklu ilaç direnci
NaCl	Sodyum Klorür
spp	species
subsp	subspecies
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
VRE	Vankomisine dirençli enterokoklar
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
EUCAST	Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KÖPEK DIŞKILARINDAN İZOLE EDİLEN ESCHERİCHİA COLI' LERDE KOLİSTİN DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI

AMINA FARZALIZADE

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Veterinerlik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Veterinerlik Mikrobiyolojisi, Tezli Yüksek Lisans Programı

Danışman :Prof. Dr.Beren BAŞARAN KAHRAMAN

Bu çalışmada İstanbul'un çeşitli semtlerinde bulunan değişik yaş ve cinsiyette, evde beslenen 100 adet sahipli ve sağlıklı köpeğin dışkı örnekleri rektal svab yöntemiyle Kasım-Aralık 2023 tarihleri arasında toplandı. Toplanan örnekler *E. coli* varlığı yönünden konvansiyonel bakteriyolojik kültür yöntemi ile incelendi. MacConkey besiyerindeki görünümüne göre 59 izolatın (%59) *E.coli* şüpheli koloni görünümüne sahip olduğu saptandı. Şüpheli izolatlarla yapılan konvansiyonel biyokimyasal testler (katalaz, oksidaz, sitrat, indol, MR, üre, TSIA'da H₂S oluşumu ve karbonhidrat fermentasyon testleri) sonucunda 59 izolatın *E.coli* olduğu belirlendi. Konvansiyonel yöntemlerle *E.coli* olduğu belirlenen 59 izolat BD Phoenix™ M50 cihazında da konfirme edildi.

E. coli izolatlarının florokinolon, aminoglikozit, tetrasiklin, fenikol, sulfonamid, penisilin ve monobaktam grubu antimikrobiklere karşı duyarlılıkları saptandı. Elde edilen sonuçlarda üç ve/veya üçten fazla ilaç grubunda direnç saptanan 18 izolat çoklu ilaç direnci pozitif olarak kabul edildi. Kolistin direncinin doğrulanması amacıyla sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı. Çalışmada köpek dışkı örneklerinden elde edilen 59 *E.coli* izolatında, kolistine karşı fenotipik direnç sadece 1 izolatta (%1,69) belirlendi.

Bu çalışma sonucu, kolistin direnci saptanan *E. coli*'nin pet hayvanlarında kolonize olabileceğini ve bu hayvanlar ile insanlar arasında transfer edilebileceğini göstermektedir. Bulgular ayrıca, gıda hayvanları ve insanlara ek olarak, pet hayvanlarının kolistin dirençli *E.*

coli rezervuarı olarak hizmet edebileceğini ve toplumda plazmid aracılı kolistin direncinin hızla gelişen epidemiyolojisine başka bir karmaşıklık katmanı eklediğini göstermektedir. |

Haziran 2024 , 68. sayfa.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyal direnç, *E. coli*, Kolistin, Köpek |



ABSTRACT

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION OF COLISTIN RESISTANCE IN *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM DOG FECES

Amina FARZALIZADE

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Microbiology

Microbiology Programme

Supervisor: Prof. Dr. Beren BAŞARAN KAHRAMAN

In this study, the faecal samples of 100 healthy and owned dogs of different age and sex from various districts of Istanbul were collected by rectal swab method, between November and December 2023. The samples were examined for the presence of *E. coli* by conventional bacteriological culture method. According to their appearance on MacConkey agar, 59 isolates (59%) were found to have *E. coli* suspicious colony appearance. Conventional biochemical tests (catalase, oxidase, citrate, indole, MR, urea, H₂S formation in TSIA and carbohydrate fermentation tests) performed on suspicious isolates revealed that 59 isolates were *E. coli*. The 59 isolates identified as *E. coli* by conventional methods were confirmed by BD Phoenix™ M50 device.

Susceptibilities of *E. coli* isolates were determined against fluoroquinolone, aminoglycoside, tetracycline, phenicol, sulphonamide, penicillin and monobactam group antimicrobials. In the results obtained, 18 isolates with resistance to three and/or more than three drug groups were considered as multidrug resistance positive. Broth microdilution method was used to confirm colistin resistance. Among 59 *E. coli* isolates obtained from dog faecal samples, phenotypic resistance to colistin was detected in only 1 isolate (1.69%).

The results of this study indicate that colistin-resistant *E. coli* can colonise companion animals and be transferred between these animals and humans. The findings also suggest that, in addition to food animals and humans, companion animals may serve as reservoirs of colistin-resistant *E. coli*, adding another layer of complexity to the rapidly evolving epidemiology of plasmid-mediated colistin resistance in the community.

June 2024, 68 pages.

Keywords: Antimicrobial resistance, *E. coli*, Colistin, Dog



1. GİRİŞ

İnsan, hayvan ve çevre sağlığını tehdit eden küresel bir sorun olan antimikrobiyal direnç (AMR), Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü tarafından en önemli Tek Sağlık sorunu olarak tanımlanmıştır. Antimikrobiyallerin insan sağlığı ve hayvansal üretimde uygunsuz kullanımı AMR' nin başlıca nedenlerinden biridir. Antimikrobiyallerin etkinliğini korumak ve AMR ile mücadele etmek, bakteriyel infeksiyonların tedavisini iyileştirmek için stratejiler (örneğin aşılar, tedavi alternatifleri, hızlı teşhis araçları) geliştirmek, Haziran 2021 G7 ve Eylül 2021 G20 toplantılarında sağlık gündeminin öncelikleri olarak öne çıkmıştır. Çoklu ilaca dirençli (MDR) Gram-negatif bakterilere karşı yeni antimikrobiyallerin yetersizliği, doktorların eski antibiyotikleri yeniden gözden geçirmesine yol açmıştır. 1949'da keşfedilen polimiksinler (kolistin ve polimiksin B), 2012 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından çoklu ilaca dirençli Gram-negatif bakterilerin neden olduğu infeksiyonlarının tedavisi için kritik öneme sahip olarak yeniden sınıflandırılmış ve bu moleküllere olan ilginin yeniden artmasına neden olmuştur (Hussein ve diğ., 2021).

Kolistin polimiksin E olarak da adlandırılır. Lipopolisakkaritin lipid A alt birimlerinin negatif yüklü fosfat gruplarıyla etkileşime girerek katyonların (esas olarak Mg^{+2} ve Ca^{+2}) Gram-negatif bakterilerin dış zarından yer değiştirmesine yol açan ve hücre sızıntısı ve bakteriyel ölümle sonuçlanan polikasyonik bir antibiyotiktir. Kolistine karşı direncin bir zamanlar PmrA/PmrB ve PhoP/PhoQ iki bileşenli sistemleri veya negatif regülatör MgrB'yi kodlayan genlerdeki kromozomal mutasyonlardan kaynaklandığı düşünülmekteydi. Ancak 2015 yılında, Çin'de çiftlik hayvanları, çiğ et ve insanlardan toplanan *Escherichia coli* izolatlarında, bazı Gram-negatif bakterilerde kolistine direnç sağlayan fosfoetanolamintransferaz için kodlanan stabil bir plazmid aracılı mobil kolistin direnç geni (*mcr-1*) tanımlanmıştır. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar, *mcr-1* genini küresel ölçekte çeşitli Enterobacteriaceae'lerde tespit etmiş ve bu plazmid aracılı kolistin direncinin dünya çapında ortak eylem gerektiren bir fenomen olduğunu doğrulamıştır. Bu bulgular, çoklu ilaca dirençli Gram-negatif bakterilerin neden olduğu infeksiyonlara karşı son çare tedavi seçeneği olan kolistinin kaybedilmesi konusunda ciddi endişelere yol açmaktadır. Bununla birlikte kolistin, tarımsal üretimde ve veteriner hekimlikte onlarca yıldır yaygın olarak

kullanılmaktadır ve son zamanlarda mobilize kolistin direnci (*mcr*) genlerinin hayvanlardan insanlara küresel olarak yayılması, kolistinin klinik kullanımını ciddi şekilde tehdit etmektedir (Rhouma ve diğ., 2023).



2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. Polimiksin Sınıfı Antibiyotikler

Bacillus polymyxa bakterisinden 1947 yılında keşfedilen polimiksin grubu antibiyotiklerden polimiksinler 1950'lerde ilk kez ticarileştirildiklerinde, Gram-negatif bakterilere (GNB) karşı bakterisidal etkinlikleri ve düşük direnç düzeyleri ile "mucize" antibiyotikler olarak kabul edilmişlerdir. Bugüne kadar on beşten fazla polimiksin çeşidi izole edilmiş ve karakterize edilmiştir; bunlar arasında en önemlileri polimiksin B ve polimiksin E'dir. Polimiksin E kolistin olarak da bilinir. Polimiksinler, Gram-negatif bakteriyel patojenlere karşı önemli inhibitör etki gösterir, bu nedenle, β -laktamlar, aminoglikozitler ve florokinolonlar gibi ön saf antibiyotiklere zaten dirençli hale gelen bu tür patojenleri hedeflemek için nihai bir seçenek olarak öne çıkmaktadır. Bu nedenle polimiksinler, çoklu ilaca dirençli Gram-negatif patojenlere karşı kullanılacak son çare antibiyotik olarak kabul edilmektedir (Hamel ve diğ., 2021; Mohapatra ve diğ., 2021).

Yapısal düzeyde polimiksinler, patojenlere karşı ilk savunma hattı olarak ökaryotlar tarafından üretilen katyonik antimikrobiyal peptitlere çok benzer. Bunlar doğada yaklaşık 1,2 kDa kütleyle sahip lipopeptitlerdir. Polimiksinler tipik bir halka ve kuyruk yapısına sahiptir; burada halka polikasyonik bir peptitten, kuyruk ise yağ asitleri ile bağlanmış tripeptit zincirinden oluşur. Polimiksin B ve kolistin, peptit halkasındaki tek bir amino asit kalıntısında farklılık gösterir; kolistinde D-fenilalaninin yerini D-lösin kalıntısı alır. Katyonik peptit halkası polimiksinlere hidrofilik bir yapı kazandırırken, yağlı asil zinciri hidrofobiktir. Bu yapısal özellik genellikle polimiksinlerin hücre membranlarına girerek parçalanmasına yol açma yeteneğine bağlanır. Bu tipik özellik aynı zamanda insanlarda gözlenen nefrotoksisiteden de sorumludur. Polimiksinler, ribozomal olmayan peptit sentetazlar tarafından sentezlenir ve bu nedenle ribozomal olmayan peptitler olarak adlandırılır (Mohapatra ve diğ., 2021).

Polimiksin B ve kolistin Gram-negatif bakteri türlerine karşı benzer antibakteriyel özelliklere sahiptir ve özellikle *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* gibi MDR patojenlerin neden olduğu infeksiyonlara karşı son seçenek olarak kullanılmaktadır. Birincil

olarak membran hedefleyen bir antibiyotik olan polimiksinler, kalın bir peptidoglikan tabakanın varlığı ve dış membranın yokluğu göz önüne alındığında Gram-pozitif patojenlere karşı sınırlı aktivite göstermektedir. Polimiksinler membran bütünlüğünü bozarak hücre ölümüne yol açan hücre hasarına neden olur. Bu mekanizma, polimiksinler insan hücrelerinin membranlarıyla etkileşime girip onları parçalayarak toksisiteye yol açtığında da işlemektedir. Öncelikle böbrek ve beyin dokularında toksisite gözlenir, ancak böbrek dokularında daha fazla şiddet gözlenir, bu nedenle 1990'ların ortalarına kadar kullanımlarında uzun süreli kesintiye yol açmıştır. Son zamanlarda toksisiteyi azaltmak için ilaç yapısında kimyasal modifikasyonlar denenmiştir. Ayrıca, dozajdaki değişiklikler, formülasyonlardaki modifikasyonlar toksisite seviyesini büyük ölçüde azaltmıştır. Polimiksin B'nin ön ilacı kolistimetattan daha az toksik olduğu gösterilmiştir, bu nedenle doğrudan uygulanabilir. Bununla birlikte, kolistin genellikle kolistin üretmek için hidrolize uğrayan ön ilaç kolistin metansülfonat olarak uygulanır (Nang ve diğ., 2021).

2.2. Kolistin (Polimiksin E)

Kolistin, 1947 yılında Y. Koyama tarafından *Paenibacillus polymyxa* subspecies *colistinus* kültürlerinden keşfedilen E grubu eski bir polipeptit antibiyotiktir. Çoğu Gram negatif etkene karşı bakterisidal, dar spektrumlu bir moleküldür, ancak Gram-pozitif bakterilere, anaerobik bakterilere ve mikoplazmalara karşı etkisizdir (Hamel ve diğ., 2021).

2.2.1. Kolistinin Kimyasal Yapısı

Kolistin, bir α -amid bağlantısı yoluyla bir yağ asidi zincirine bağlanmış katyonik bir siklik dekapeptitten oluşur. Moleküler ağırlığı 1750 Da'dır. Kolistin molekülündeki amino asit bileşenleri D-lösin, L-treonin ve L- α - γ -diaminobütirik asittir. Sonuncusu, 6-metil-oktan-oik asit (kolistin A) veya 6-metil-eptanoik asit (kolistin B) olarak tanımlanan yağ asidi kalıntısına bağlıdır. Kolistinin farklı farmasötik preparatları bu 2 bileşenden (kolistin A veya B) farklı miktarlarda içerebilir. Ticari olarak iki kolistin formu mevcuttur: kolistin sülfat ve kolistimetat sodyum (kolistin metansülfat, pentasodyum kolistimetansülfat ve kolistin sülfonilmetat olarak da adlandırılır). Kolistimetat sodyum, kolistin sülfattan daha az güçlü ve daha az toksiktir. Kolistinin formaldehit ve sodyum bisülfid ile reaksiyonu sonucu üretilir. Kolistin sülfat, bağırsak dekontaminasyonu için ağızdan (tablet veya şurup) ve bakteriyel cilt infeksiyonlarının tedavisi için topikal olarak toz halinde uygulanır. Kolistimetat sodyum

parenteral formülasyonlarda mevcuttur ve intravenöz, intramüsküler veya nebulizasyon yoluyla uygulanabilir (Matthew ve diğ., 2005).

2.2.2. Kolistin Etki Mekanizması

Polimiksinlerin ana hedefi Gram negatif bakteri membranlarının lipopolisakkaritidir (LPS). LPS'nin dış kısmındaki lipid A negatif yüklüdür ve iki değerli katyonlarla (esas olarak Mg^{+2} ve Ca^{+2}) etkileşime girerek dış membranın genel olarak stabilizasyonunu sağlar. Net pozitif yüklü bir molekül olan kolistin, bu nedenle LPS'e bağlanmak için güçlü bir afiniteye sahiptir ve elektrostatik etkileşim yoluyla katyonların yer değiştirmesine yol açar. Bu da LPS'nin serbest kalmasıyla birlikte membran yapısının düzensizleşmesiyle sonuçlanır. Kolistin daha sonra lipofilik asit-yag zinciri aracılığıyla dış membrana sokulur. Kolistin dış membranın geçirgenliğini değiştirerek kendi içine girmesine ve iç membrana ulaşmasına izin verir. Daha sonra fosfolipid çift tabakanın bütünlüğünün bozulmasıyla bu iç zarda bir düzensizlik meydana gelir. Sonunda, bu zarın parçalanması hücre içi içeriğin serbest kalmasına ve bakterinin ölümüne neden olur. Bu süreç, kolistinin antibakteriyel etkisini açıklamak için en yaygın kullanılan mekanizmadır, ancak hücre ölümüne yol açan nihai mekanizmalar hala tam olarak anlaşılamamıştır (Hamel ve diğ., 2021).

Vezikül-vezikül teması gibi diğer potansiyel etki mekanizmaları tanımlanmıştır. Kolistin dış membranı geçtikten sonra, iç ve dış membran arasında lipid değişimi gerçekleşir ve fosfolipid kaybıyla membranlarda yapısal değişikliklere neden olarak bakterileri lize eden ozmotik bir dengesizliğe yol açar. Kolistin tarafından indüklenen oksidatif strese bağlı serbest radikallerin birikimi de DNA, protein ve lipid hasarından sorumlu bir yoldur ve bakteriyel ölüme yol açar. Hayati solunum enzimlerinin inhibisyonu ve lipid A'nın endotoksin aktivitesi de tanımlanmıştır. Endotoksin aktivitesi, LPS moleküllerine bağlanarak ve onları nötralize ederek, tümör nekroz faktörü-alfa (TNF-a) ve interlekin 8 (IL-8) sitokinlerinin salınmasına ve böylece şokun bastırılmasına neden olarak, LPS'nin lipid A'sının bu aktivitesinin kolistin tarafından inhibe edilmesini içerir (Hamel ve diğ., 2021).

2.2.3. Kolistinin Etki Spektrumu

Kolistin, bakteri hücre membranını hedef alan bakterisidal bir antibiyotiktir. Katyonik polipeptit yapısı ile Gram-negatif bakterilerin dış membranındaki anyonik LPS tabakasına elektrostatik etkileşimlerle bağlanır ve bu yapıyı stabilize eden farklı katyonları yer değiştirerek dış membranın bütünlüğünü bozar. Bu da membran geçirgenliğinin artmasına,

sitoplazmik içeriğin sızmasına ve hücre ölümüne neden olur. Hücre duvarındaki LPS yapısının lipid A kısmı Gram-negatif bakterilerin endotoksin etkisinden sorumludur. Kolistin bu bölgeye bağlanarak ve nötralize ederek güçlü anti-endotoksin aktivitesi gösterir. Polimiksinlerin bir diğer etki şekli de bakteri iç zarındaki tip II NADH-kinonoksidoredüktaz (NADH-2) solunum enzimlerini inhibe ederek mikroorganizmanın ölümüne yol açmasıdır (Gogry ve diğ., 2021).

2.2.4. Kolistinin Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri

Kolistin metansülfonat esas olarak renal yolla elimine edilirken, bir kısmı metabolize edilerek kolistin formuna dönüştürülür. Kolistin, büyük renal tübüler reabsorpsiyonu nedeniyle ağırlıklı olarak ekstrarenal yolla atılır. Kolistinin bakterisidal aktivitesi konsantrasyona bağlı olduğundan, insizyonel aktivitede çok aktiftir ve 24 saat sonra yeniden büyümeyi engellemez. Ayrıca plevral sıvı, bilier sistem, BOS ve sinovyal sıvılardaki dağılımı zayıftır. Tedavide hedeflenen konsantrasyonlara ulaşmada sorunlar yaşandığından klinikte başka bir ilaçla kombine olarak kullanılması ve dozlar arasında uzun aralıklardan kaçınılması önerilmektedir.

Farmakokinetik ve farmakodinamik, kolistinin ilgili dozajını ve terapötiklerini belirler. Ölümcül infeksiyonları tedavi etmek için bir ilacın etkili dozajını belirlemek zorunludur. Direncin artmasıyla birlikte uygun tedavi rejimini belirlemek için kolistinin farmakokinetik farmakodinamik ilişkisinin incelenmesi gerekli hale gelmiştir. Kolistinin farmakokinetik ve farmakodinamik verileri, özellikle renal replasman tedavisi gören hastalarda iyi raporlanmamıştır. Bu nedenle, kritik hastalarda sabit dozların belirlenmesi amacıyla kolistinin farmakodinamik ve farmakokinetik ilişkisinin anlaşılmasına yönelik zamana bağlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Kolistinin etkinliği ve güvenliği ile ilgili konuların daha fazla açıklığa kavuşturulması için acilen randomize kontrollü çalışmalara da ihtiyaç olduğu bildirilmiştir (Gogry ve diğ., 2021).

2.2.5. Kolistinin Toksisitesi

Nefrotoksisite, kolistimetat sodyumun intravenöz uygulamasını takiben yaygın olarak gözlenen advers etkilerden biridir. Kolistimetat sodyum ile tedaviyi diğer antibiyotiklerle veya diğer antibiyotik rejimleri olmadan karşılaştıran çalışmalarda, nefrotoksisite altı çalışmada kolistimetat sodyum (veya polimiksin B) ile anlamlı olarak daha yüksek, beş çalışmada karşılaştırmacılarla benzer (ikisi hiçbir olay iddia etmedi) ve ikisinde daha düşüktü.

Bu sonucu değerlendirmek üzere tasarlanmış son çalışmalarda nefrotoksisite oranları bazılarında %6 ile %14, bazılarında ise %32 ile %55 arasında değişmektedir. Nefrotoksisite oranlarındaki geniş aralık en azından kısmen böbrek yetmezliğinin farklı tanımları ile açıklanabilir. Bazı alışmalar RIFLE kriterlerinden (risk, yaralanma, başarısızlık, kayıp ve son dönem böbrek hastalığı) herhangi birini kullanmış, bazıları başarısızlık veya üstü eşiğini kullanmış, diğerleri ise böbrek yetmezliğini kreatinin>2 mg/dL olarak tanımlamıştır. Farklı çalışmalarda bulunan nefrotoksisite risk faktörleri arasında ileri yaş, önceden var olan böbrek yetmezliği, hipotalbüminemi ve non-steroid anti-inflamatuar ilaçların veya vankomisinin birlikte kullanımı yer almaktadır. Daha yüksek doz böbrek yetmezliği ile ilişkilidir; bazı çalışmalar toplam kümülatif dozu, diğerleri ise günlük dozu böbrek yetmezliği için belirleyici olarak tanımlamaktadır. Nefrotoksisiteye kadar geçen süre çoğu çalışmada bildirilmemiştir. Dört çalışmada vakaların çoğunun tedavinin ilk haftası içinde meydana geldiği bildirilmiştir. Hastaları tedaviden sonra 1-3 aya kadar izleyen çalışmalar, hastaların en az %88'inde böbrek yetmezliğinin tersine çevrilebilir olduğunu göstermiştir. Genel olarak, nefrotoksisite oranları günümüzde muhtemelen eski çalışmalarda gzlemlenenlerden daha düşüktür. Daha düşük toksisite için yapılan açıklamalar arasında kolistimetat sodyumdaki kimyasal safsızlıkların daha az olması, daha iyi yoğun bakım nitesi takibi ve diğer nefrotoksik ilaçların birlikte uygulanmasından kaçınılması yer almaktadır. Son çalışmalarda ise kistik fibrozis hastalarında, kolistimetat sodyumun aslında aminoglikozitlerden daha az nefrotoksik olabileceğini öne srlmştir (Yahav ve diğ., 2012).

2.3. *mcr* genleri

Plazmid aracılı kolistin direnci ilk olarak 2015 yılında Çin'de, *E. coli* izolatlarında belirlenmiştir. Kolistine direnç gelişiminden sorumlu *mcr* geni plazmidde kodlanmış durumdadır.

mcr genleri, pEtN'nin LPS'nin lipid A'sına eklenmesinde görevli pEtN transferazı kodlayarak LPS modifikasyonuna neden olmaktadır. *mcr-1* geninin keşfinden sonra şimdiye kadar, tüm kıtalarda ve çeşitli Gram-negatif bakterilerde, *mcr-10*'a kadar farklı varyantlar tanımlanmıştır.

Mayıs 2019'a kadar, *mcr-1* ila *mcr-9* olarak adlandırılan dokuz mobilize kolistin direnç geni tanımlanmıştır (Carroll ve diğ. 2019). Ayrıca, *mcr-10* geni 2020 yılında tanımlanmıştır (Wang ve diğ. 2020).

mcr genleri, Gram-negatif bakterilerin dış zarının lipid A'sına bir fosfoetanolamin (PEtN) parçası bağlayarak net negatif yükünde bir azalmaya neden olan ve kolistin direncine izin veren fosfoetanolamintransferaz enzimlerini kodlar (Hussein ve diğ., 2021).

2.3.1.1. *mcr-1* geni

Plazmid *mcr-1* geni, Çin'de 2011-2014 yılları arasında hayvan gıdalarından ve etlerinden izole edilen *E. coli*'de ilk kez 2015 yılının sonunda rapor edilmiştir. Ayrıca, gen 2014 yılında Çin'de hastanede yatan hastalardan izole edilen *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında da tespit edilmiştir. Kolistin yıllardır gıda için yetiştirilen hayvanlarda yaygın olarak kullanılması *mcr-1* yayılımı için seçim baskısının kolistin veterinerlik kullanımı tarafından itildiğini düşündürmektedir. İlk karakterizasyonundan kısa bir süre sonra, *mcr-1* geninin insanlardan, hayvanlardan ve çevreden izole edilen *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *Salmonella* türlerinde geniş çapta yayıldığı fark edilmiştir. Çeşitli bölgeleri ziyaret eden gezginlerden elde edilen enterik bakteri izolatlarında *mcr-1* geninin keşfedilmesi ve *mcr-1*'in Asya, Afrika, Güney Amerika ve Avrupa'da hızlı bir şekilde yayılması, *mcr-1*'in evrensel yayılımının insanların seyahatleri tarafından da kolaylaştırıldığını göstermektedir (Liu ve diğ., 2016).

Kolistin direncinin plazmid ile aktarımı, *mcr* genlerinin en baskın türü olan *mcr-1* genine atfedilmiştir. *mcr-1* bir fosfatidil-etanolamintransferazdır; LPS'nin lipid A kalıntılarını modüle ederek kolistin hedef bölgesine daha düşük bir bağlanma afinitesine yol açar. *mcr-1* geni, kolistin hedefini modifiye ederek ve ardından PEA'nın bakterinin dış zarındaki lipid A'nın glukozaminsakkaridine aktarımını uyararak direnç sağlar, bu da lipid A baş grubunun net negatif yükünde azalmaya ve kolistine daha düşük bağlanma afinitesine yol açar. *mcr-1* katalitik mekanizması (bakterilerin diğer PEA-transferaz enzimleri) henüz belirlenmemiştir (Hussein ve diğ., 2021).

2.3.1.2. *mcr-2* geni

mcr-1 geninin tespit edilmesinin ardından bilimsel ilgi, varyantlarının tanımlanmasına yol açmıştır. Xavier ve diğ. (2016) Belçika'da *E. coli*'de *mcr-2* de dahil olmak üzere birkaç ek *mcr* gen ailesinin ortaya çıktığını bildirmiştir. *mcr-2* proteininin iki alana sahip olduğu, ilkinin

bir taşıyıcı olarak çalıştığı ve ikincisinin (kalıntı 230-538) bir transferaz alanı olarak çalıştığı öngörülmüştür.

mcr-2 ve *mcr-1* proteinleri %80,65 benzerlik göstermektedir. Ayrıca, *mcr-2*, *Moraxella osloensis* etkeninin PEA transferazına (WP-062333180) %99 dizi kapsamı, %64 benzerlik, %97 sorgu kapsamı ile *Paenibacillus sophorae* (WP-063619495), *Enhydrobacteraero saccus* (KND21726) ve *Moraxella catarrhalis* etkenlerine (WP-003672704) sırasıyla %65, %65 ve %61 özdeşlik göstermektedir (Hussein ve diğ., 2021).

2.3.1.3. *mcr-3* geni

mcr-3 geni, *mcr-2* ve *mcr-1* ile sırasıyla %47 ve %45 nükleotid dizisi özdeşliği sergilemektedir. Ayrıca, *mcr-3*'ün amino asit dizisi, *mcr-2* ve *mcr-1* ile amino asit dizileriyle sırasıyla %31,7 ve %32,5 benzerlik göstermektedir. *mcr-1* ve *mcr-2* gibi, *mcr-3* proteininin de iki etki alanına sahip olduğu tahmin edilmiştir. İlk alan (kalıntı 1-172) beş transmembran α -heliksi içerirken, ikinci alan (kalıntı 173-541) varsayılan katalitik merkeze sahip periplazmik bir alandır. *mcr-3*'ün amino asit dizisi, on iki farklı ülkeden toplanan çevresel ve klinik örneklerden izole edilen Enterobacteriaceae ve *Aeromona* sspp. PEA transferazları ile güçlü bir şekilde hizalanmıştır. *mcr-3* geni Avrupa, Güney Amerika ve Asya'da hayvan ve insanlardan izole edilen *E. coli* ve *Aeromonas* ve *Proteus* türlerinde bulunmuştur (Carattoli ve diğ. 2017).

2.3.1.4. *mcr-4* geni

Carattoli ve diğ. (2017), çalışmaları kapsamındaki 125 izolattan 32'sinin *mcr-1* ve üçünün *mcr-2* için pozitif olduğunu; 11 izolatın ise *Salmonella* R3445'te tanımlanan yeni bir *mcr-4* geni sergilediğini bildirmiştir. Daha sonra *mcr-4* geni İtalya, İspanya ve Belçika'da insan ve domuzlardan elde edilen *S. enterica* serovar Typhimurium ve *E. coli* izolatlarında tespit edilmiştir. *mcr-4* proteininin, *mcr-4* proteinini iç membrana bağlayan ve onu periplazmik katalitik alana bağlayan integral beş α -sarmal transmembran alanda (N-terminus) esnek bir bağlayıcı ile bağlanan iki alan içerdiği öngörülmektedir. Periplazmik katalitik alan, bir fosfoetanolin grubunun eklenmesiyle Lipid A gruplarını modüle eder. Ayrıca, *mcr-4*'ün yapısında tahmin edilen beş metal etkileşim kalıntısı ile tek bir çinko atomu bulunur (Zhang ve diğ. 2019).

2.3.1.5. *mcr-5* geni

Almanya'da, kümes hayvanları ve etlerinden elde edilen *S. enterica* serovar Paratyphi B izolatında yeni bir gen olan *mcr-5*'i rapor etmiştir. Başka bir çalışmada, kesim sırasında

domuzların dışkı içeriğinden ve çiftliklerdeki domuzlardan alınan dışkı örneklerinden toplanan örneklerde *E. coli* suşlarında üç *mcr-5* geni tespit edilmiştir. Bu bulgular, *mcr-5* taşıyan *E. coli* suşlarının domuzların gastrointestinal sisteminde sporadik olarak geliştiğini göstermiştir; bu da gıda zinciri boyunca dikey yayılmaya yol açabileceği ve sonuçta tüketicileri maruz bırakabileceği için endişe kaynağıdır (Borowiak ve diğ. 2017). Ma ve diğ. (2018), domuzların dışkılarından izole edilen *Aeromonas hydrophila*' da yeni *mcr-5* geninin ilk kez tanımlandığını bildirmiştir. Araştırmacılar, *mcr-5* geninin farklı bakteri türleri ve cinsleri arasında yayılabileceğini öne sürmüştür.

2.3.1.6. *mcr-6* geni

Abdun ve diğ. (2017) *Moraxella pluranimalium* kromozomu üzerinde *mcr-6* genini keşfetmiştir. Gen, *E. coli*'den *mcr-2* ile %87,9 oranında özdeşlik göstermiştir. Avrupa'da bir hayvan kaynağından izole edilen *M. pluranimalium*, *mcr-6* genini barındıran tek izolat olarak bildirilmiştir.

2.3.1.7. *mcr-7* geni

Yakın zamanda, *mcr* homologu (*mcr-7*) açıklanmış ve GenBank'a kaydedilmiştir. Çin'de tavuktan elde edilen *Klebsiella pneumoniae* izolatında *mcr-7* geni tespit edilmiştir (Wang ve diğ., 2018). Plazmid aracılı kolistin direnci *mcr-7.1* geni, *mcr-3* geni ile %70 oranında özdeşlik gösterdiği bildirilmiştir (Hussein ve diğ., 2021).

2.3.1.8. *mcr-8* geni

Yeni bir *mcr* varyantı olan *mcr-8* geni, Çin'deki domuz ve insanlardan izole edilen *K. pneumoniae* izolatlarında tespit edilmiştir. *mcr-8*'in amino asit dizisi *mcr-7*, *mcr-6*, *mcr-5*, *mcr-4*, *mcr-3*, *mcr-2* ve *mcr-1* ile sırasıyla %37,46, %30,43, %33,51, %37,85, %39,96, %30,26 ve %31,08 benzerlik göstermektedir. Daha önce tanımlanan *mcr* proteinleri gibi, *mcr-8* proteininin de iki alan içerdiği öngörülmüştür. Etki alanı 1 (kalıntı 1 ila 234) beş transmembran α -helisi içerirken, ikinci etki alanı (kalıntı 235 ila 565) varsayılan katalitik merkezi içerir. Bu nedenle, birinci alanın transmembran alanı olduğu tahmin edilirken, ikinci alanın PEA transferaz olduğu öngörülmüştür (Wang ve diğ. 2018).

2.3.1.9. *mcr-9* geni

2018 yılına kadar, tanınan sekiz aynı *mcr* geni tespit edilmiştir (*mcr-1* ile *mcr-8*). Carroll ve diğ. (2019), antimikrobiyal direnç genleri için *Salmonella* genom dizilerinin rutin kontrolü sırasında tanımlanan yeni bir *mcr* geni olan *mcr-9*'u tanımlamıştır. Washington'da bir insan hastadan izole edilen çok ilaca dirençli bir *S. enterica* serovar Typhimurium izolatından

elde edilen *mcr-9*'un amino asit dizisi, amino asitlerin %64,5 benzerliği ve %99,5 kapsama alanı ile en çok *mcr-3*'e benzediği bildirilmiştir. Dokuz *mcr* proteininin üç boyutlu yapısı, *mcr-9*, *mcr-7*, *mcr-4* ve *mcr-3*'ün yakın bir yapıyı koruduğunu göstermiştir. *mcr-1* ile *mcr-9* genleri tarafından kodlanan proteinler, membrana bağlı ve çözünür katalitik alanlar için yüksek düzeyde koruma göstermiştir (Carroll ve diğ., 2019).

2.3.1.10. *mcr-10* geni

Wang ve diğ. (2020), klinik bir *Enterobacter roggenkampii* izolatının IncFIA plazmidinde yeni bir *mcr* geni olan *mcr-10*'u tanımlamıştır. *mcr-10* geni, *mcr-9* geni ile en yüksek nükleotid özdeşliğine (%79,69) sahiptir ve *mcr-9* proteini ile %82,93 amino asit özdeşliğine sahip *mcr-10* proteinini kodlar. *mcr-10* geni birçok ülkede birçok Enterobacteriaceae türünde bulunmuştur, bu da zaten yaygın bir dağılıma ulaştığını belirlenmiştir. *mcr-10* proteini, *Buttiauxella* türlerinin kromozomal olarak kodlanmış *mcr* benzeri fosfoetanol amintransferazları ile %79,04-83,67 amino asit özdeşliği ve yüksek oranda korunmuş tahmin edilen yapılar gösterdiği rapor edilmiştir. Bu nedenle *mcr-10*, *mcr-9* ve *mcr-B* proteinleri ortak bir atadan gelmiş olabileceği düşünülmüştür. Üç boyutlu modeller, *mcr-1* ile *mcr-10*'un hem membrana bağlı hem de çözünür katalitik alanlarının yüksek düzeyde korunuma sahip olduğunu göstermektedir (Wang ve diğ., 2020).

2.4. Kolistin Duyarlılık Testleri

Kolistin direncini belirlemek için kullanılan testler fenotipik ve genotipik olarak gruplandırılmaktadır. Fenotipik testler Enterobacteriaceae ve nonfermentatif Gram-negatif bakterilerde kolistin direncinin varlığını ortaya koymaktadır. Tüm moleküler testler, özellikle Enterobacteriaceae'de fenotipik kolistin direncinden bağımsız olarak *mcr-1* genini ve diğer varyantları tanımlamak için tasarlanmıştır (Adıgüzel ve diğ., 2021).

2.4.1. Fenotipik yöntemler

Fenotipik yöntemlerle antimikrobiyal duyarlılığın test edilmesi şu anda AMR surveysinin temel taşıdır ve küresel antimikrobiyal direnç gözetim sistemi içinde kolistin direncinin oluşumunu belirlemek için gereklidir. Bununla birlikte, kolistine karşı antimikrobiyal duyarlılık için fenotipik test karmaşıktır. Kolistin duyarlılığına yönelik fenotipik testlerdeki teknik zorluklar arasında polimiksinlerin agardan zayıf difüzyonu, bunun

da hem disk difüzyon hem de gradyan difüzyon yöntemlerinin performansını düşürmesi ve polimiksinlerin plastiklerin yüzeyine bağlanma eğilimi (örneğin sıvı mikrodilüsyonu için kullanılan mikrotitre plakalarının ve pipet uçlarının plastiği) yer almaktadır (Kempf ve diğ., 2016, Bortolaia ve diğ. 2018).

Disk difüzyon testi ve E-test, Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST) tarafından yapılan değerlendirme sonrasında kolistin direncini tespit etmede yetersiz kalmıştır. Şu anda, zahmetli ve zaman alıcı olmasına rağmen, kolistin direncinin tespiti için güvenilir bir test olarak yalnızca sıvı mikrodilüsyon yöntemi önerilmektedir. EUCAST, Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp. için kolistin klinik direnç aralığını hassas $\leq 2\text{mg/l}$, dirençli $>2\text{mg/l}$ olarak belirlemiştir (EUCAST, 2018). Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI), *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp. için klinik direnç aralığını belirlemiştir (duyarlı $\leq 2\text{mg/l}$, orta = 4mg/l ve dirençli $\geq 8\text{mg/l}$) (CLSI, 2017). Ayrıca CLSI, saha ve diğer izolatlardan *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Raoultella ornithinolytica*, *Enterobacter aerogenes* ve *Enterobacter cloacae* için 2 mg/l epidemiyolojik kesme değerleri belirlemiştir (Adıgüzel ve diğ., 2021).

CLSI ve EUCAST gibi uluslararası standart belirleyici kuruluşlar Mart 2016'da ortak bir polimiksin kırılma noktaları çalışma grubu oluşturmuş ve kolistin duyarlılığının test edilmesi için sadece sıvı mikrodilüsyonu önermiştir. Bu nedenle, Enterobacteriaceae, *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp. türlerinin kolistine karşı duyarlılığı, katyon ayarlı Mueller-Hinton broth'un kullanıldığı Uluslararası Standardizasyon Örgütü standart sıvı mikrodilüsyon yöntemine (ISO 20776-1) göre test edilmesi gerektiği belirlenmiştir. Testin herhangi bir bölümüne polisorbata-80 veya diğer yüzey aktif maddeler gibi hiçbir katkı maddesi dahil edilmemelidir. Örneğin polisorbata polimiksinlerle sinerjik olarak hareket edebilir ve minimum inhibitör konsantrasyonunu yapay olarak düşürebileceği bildirilmiştir. Plakalar düz polistirenden yapılmalı ve polimiksinlerin sülfat tuzları kullanılmalıdır ve kolistin metan sülfonat türevi, çözeltide yavaşça parçalanan inaktif bir ön ilaç olduğu için kullanılmamalıdır. Kolistin duyarlılık testi için kullanılan farklı sıvı mikrodilüsyon tabanlı sistemlerin performansına ilişkin incelemelerde mevcuttur. Kolistin direncinin fenotipik tespitinde kalite kontrolü esastır. Kullanılan yöntemin güvenilir sonuçlar verdiğinden emin olmak için, düşük seviyede kolistin direncine sahip bir suşun (*mcr-1*-pozitif *E. coli* NCTC 13846 gibi) dahil edilmesi EUCAST tarafından önerilmektedir (Bortolaia ve diğ. 2018).

Fenotipik sonuçlar, vahşi tip ve vahşi tip olmayan popülasyonları tanımlayan epidemiyolojik kesme noktası (EUCAST veya CLSI'ya göre) veya klinik duyarlılık ve direnci tanımlayan klinik kesme noktaları olarak yorumlanabilir ve raporlanabilir (Tablo 2-1).

Tablo 2-1 MIC (A) vahşi tip dağılımları ve (B) klinik kırılma noktaları ve Kolistin MİK vahşi tip dağılımları

Bakteri	Vahşi Tip	Vahşi olmayan Tip	Standart Referanslı
<i>Escherichia coli</i>	$\leq 2 \mu\text{g/mL}$	$> 2 \mu\text{g/mL}$	EUCAST, CLSI
Kolistin için Klinik Kırılma Noktaları			
Bakteri	Hassas	Dirençli	Standart Referanslı
<i>Enterobacteriaceae</i>	$\leq 2 \mu\text{g/mL}$	$> 2 \mu\text{g/mL}$	EUCAST

Not: EUCAST yabani tip olmayan ve dirençli MİK'leri $> 2 \mu\text{g/mL}$ olarak ifade ederken, CLSI kırılma noktasını $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ olarak ifade eder, ancak işlevsel olarak bunlar aynı kırılma noktasıdır.

Ayrıca, kromojenik besiyerleri (CHROMagar COL-APSE, SuperPolymyxin™ ve LBJMR vb.) polimiksin dirençli Enterobacteriaceae veya Gram negatif fermentatif olmayan bakterileri çevresel faktörlerin yanı sıra dışkı ve kan gibi klinik örneklerden tanımlamak için geliştirilmiştir. SuperPolymyxin™'in %100 duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu gösterilmiştir. Özellikle, polimiksin direncini hem doğrudan izolatlar hem de dışkı veya rektal sürüntüler gibi klinik örneklerde tespit edebilir. Bu tür besiyerleri, kolistin direnci olan bakterilerin hızlı ve kolay bir şekilde tanımlanmasını sağlar. Hem beşeri hem de veteriner hekimlikte prevalans çalışmalarında önemli bir yere sahiptir (Adıgüzel ve diğ., 2021).

2.4.2. Genotipik yöntemler

Genotipik olarak direnç genlerinin saptanmasında ise çoğunlukla PCR ve tüm genom sekanslama yöntemleri kullanılmaktadır. Konvansiyonel PCR, multipleks PCR ve Real-Time PCR yöntemleri ve ayrıca tüm genom sekanslama yöntemi günümüzde kullanılan genotipik yöntemlerdir (Adıgüzel ve diğ., 2021). Aktarılabılır kolistin direncini tespit etmek için, multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) dahil olmak üzere, yayınlanmış ve/veya ticari olarak temin edilebilen birkaç kolistin moleküler tanı testi mevcuttur. PCR testinde negatif bir sonucun kolistin duyarlılığını tahmin etmek için kullanılamayacağı unutulmamalıdır. Çünkü

test kromozomal direnç mekanizmalarının veya hatta testte yer almayan yeni *mcr* genlerinin varlığını dışlayamaz. Bu sınırlamanın kanıtı olarak, Brezilya ve İtalya'da karbapenemaz üreten ancak *mcr* genleri bulunmayan *K. pneumoniae* suşları arasında yüksek kolistin direnci oranları bildirilmiştir. Bu ortamlarda, *mcr* genleri için negatif bir PCR sonucu, kolistin duyarlı bir fenotip için zayıf bir öngörü değerine sahip olacaktır (García-Fernández ve diğ., 2019).

Tüm genom dizilimi, *mcr* genlerinin ve kolistin direnci sağlayan bilinen kromozomal mutasyonların taranmasına olanak sağlayacaktır. Biyoinformatik analiz, diğerlerinin yanı sıra, Center for Genomic Epidemiology Web araçları ve ResFinder 3.1.0 (bilinen tüm *mcr*-genleri ve kromozomal nokta mutasyonlarını içerecek şekilde 10 Eylül 2018 tarihinde güncellenen veritabanı) ile gerçekleştirilmektedir. Duyarlılık ve negatif prediktif değer, yeni direnç mekanizmalarına sahip suşların dahil edilmesinden etkilenecek olsa da bu, şu anda bilinen tüm varsayılan kolistin direnç mekanizmalarını tespit etmek için en kapsamlı yöntem olduğu belirlenmiştir. Ayrıca yeni direnç mekanizmaları tanımlandıkça dizileme verilerinin geriye dönük analizini de mümkün kılacağı bildirilmektedir. Kullanılan moleküler yöntem ne olursa olsun, PCR'ın şu anda bilinen tüm *mcr* genlerini tespit ettiğinden veya tüm genom dizileme verilerinden direnç mekanizmalarını impute etmek için kullanılan veri tabanlarının güncel olduğundan emin olmak kritik önem taşıdığı gösterilmiştir. Kolistin direnç mekanizmalarına ilişkin anlayış geliştikçe, fenotipik ve genotipik test sonuçları arasındaki uyum da artacağı düşünülmektedir. Sonuçların klinik yönetime rehberlik etmesi amaçlanıyorsa, yalnızca genotipik bir sonuca dayalı fenotip çıkarımı, yalnızca genotipik sonuç pozitif olduğunda (yani, tespit edilen mekanizmalar veya genler), direnç fenotipinin muhtemel olduğu ancak garanti edilmediği konusunda uyarıcı bir notla birlikte geçerli olabileceğine de dikkat çekilmiştir. Genotipik testin sonuçları negatifse, fenotip hakkında hiçbir çıkarım yapılmaması gerektiği de bildirilmiştir (Zankari ve diğ., 2013, García-Fernández ve diğ., 2019).

2.5. Kolistine Karşı Direnç Mekanizmaları

2.5.1.1. Mutasyonel kolistin direnci

Doğal olarak duyarlı türlerde polimiksinlere karşı kazanılmış direnç genellikle lipopolisakkarit yapısındaki değişiklikler de dahil olmak üzere bakteri hücre yüzeyindeki modifikasyonların sonucudur. Bildirilen diğer direnç mekanizmaları arasında, *Klebsiella pneumoniae*'nin bazı izolatlarında bulunduğu gibi, polimiksinleri yakalayan veya bağlayan kapsüler polisakkaritlerin dökülmesi yer almaktadır. *A. baumannii*'de, kromozomal olarak

aracılık edilen kolistin direncinin iki temel mekanizması tanımlanmıştır. Birincisi lipopolisakkarit üretiminin kaybına, ikincisi ise bakterilerin çevresel koşullara yanıt vermesini sağlayan sistemin modifikasyonuna, lipit modifikasyonunu etkilemesine ve bakteriyel membran geçirgenliğini azaltmasına bağlıdır (Olaitan ve diğ., 2014; McPhee ve diğ., 2003).

2.5.1.2. Aktarılabılır kolistin direnci

Kolistine direnç kazandıran plazmid aracılı bir gen olan *mcr-1*, ilk olarak 2015 yılının sonlarında, 2011-2014 yılları arasında Çin'de toplanan gıda hayvanları ve etlerinden elde edilen *E. coli* izolatlarında ve 2014 yılında Çin'deki insan hastalardan toplanan *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında bildirilmiştir (Liu ve diğ. 2016). Kolistin uzun yıllar boyunca dünya çapında gıda üreten hayvanlarda yaygın olarak kullanılmasına rağmen, 2017 yılına kadar Çin'de insan klinik kullanımı için mevcut değildi, bu da *mcr-1*'in yayılması için seçilim baskısının kolistin veteriner kullanımı tarafından yönlendirildiğini düşündürmektedir (Skov ve Monnet, 2016). Bu ilk tanımlamadan kısa bir süre sonra, *mcr-1* geninin hayvan, çevre ve insan kaynaklı *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae* ve *Salmonella* spp. izolatlarında küresel olarak yayıldığı görülmüştür (Liu ve diğ. 2016, Bortolaia ve diğ. 2018).

Güney Amerika, Asya ve Afrika'da *mcr-1* prevalansının yüksek olduğu ülkeleri ziyaret ettikten sonra Avrupa'ya dönen yolcuların enterik bakterilerinde genin bulunmasının önerdiği gibi, *mcr-1*'in küresel yayılımı muhtemelen insan seyahatleri ile de kolaylaştırılmıştır (Skov ve Monnet, 2016).

Avrupa ve Çin'de insan ve hayvan kaynaklı *E. coli* ve *Salmonella* spp. izolatlarında bu genlerden birden fazlasının birlikte bulunduğu bildirilmiştir (Liu ve diğ. 2016). Bugüne kadar gıda üreten hayvanlardan izole edilen bakterilerin, insanlardan izole edilen bakterilere kıyasla *mcr* genlerini daha sık taşıdığı görülmektedir; bu da muhtemelen veterinerlik uygulamalarında kolistin yaygın kullanımının uyguladığı seçici baskının bir sonucu olduğunu düşündürmektedir (Olaitan ve diğ. 2014). Daha da önemlisi, *mcr* aracılı kolistin direnci bakteri suşları, türleri ve cinsleri arasında aktarılabılır olduğu bilinmektedir. Bu tür genlerin daha fazla yayılmasını sınırlamak için, kolistine dirençli, *mcr* kodlayan izolatların doğru tanımlanması kritik öneme sahip olduğuna dikkat çekilmektedir (Gogry ve diğ., 2021).

2.6. *E. coli* İzolatlarında Kolistin Direnci

E. coli, hem hayvanlardan hem de insanlardan elde edilen izolatlarda, bugüne kadar bildirilen *mcr*-pozitif izolatlar arasında en yaygın türdür ve toplam *mcr*-pozitif izolatların yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır (Luo ve diğ., 2020). Bir *mcr* geni barındıran *E. coli*'nin en erken keşfi 1980'lerde *mcr-1* olmuştur ve bu aynı zamanda bugüne kadar *mcr*-pozitif bakterilerin en erken keşfidir. Çeşitli kaynaklardan elde edilen *E. coli* izolatlarının birçok *mcr* genini barındırdığı bildirilmiştir. Ayrıca, hayvanlarda ve gıda ürünlerinde *mcr*-pozitif *E. coli*'nin ortalama prevalansı, insanlardan elde edilen izolatlardan önemli ölçüde daha yüksektir ve bu da gıda kaynaklı bulaşmada bir rol oynadığını düşündürmektedir (Elbediwi ve diğ., 2019). Vietnam'daki kırsal bir toplulukta çoğu çiftlik hayvanının *mcr* barındıran kolistine dirençli kommensal *E. coli*'ye sahip olduğu bildirilmiştir (Kawahara ve diğ., 2019).

Her ne kadar *mcr*-pozitif *E. coli* izolatlarının bazıları enfeksiyona neden olmayan kommensal bakteriler olsa da *mcr*-pozitif *E. coli*'nin klinik örneklerden sık sık izole edilmesi, *mcr*-pozitif *E. coli*'nin insan veya hayvan enfeksiyonlarının nedeni olarak yayıldığına işaret ederek daha fazla endişe yaratmaktadır (Rumi ve diğ. 2019; Luo ve diğ., 2020). IncI2, *mcr*-pozitif *E. coli*'de en yaygın plazmid tipinin kümes hayvanları, insan, çevre ve gıda izolatlarıyla ilişkili en sık görülen tip olduğu belirtilmiştir (Elbediwi ve diğ., 2019). *mcr*-pozitif *E. coli*'den diğer bakterilere yüksek konjugasyon oranı, *mcr* genlerinin hızlı yayılmasına katkıda bulunabileceğine dikkat çekilmiştir. Ayrıca, *E. coli*'nin hem hayvanlarda hem de insanlarda yaygın dağılımı ve konjugatif yeteneği, *E. coli*'yi önemli bir *mcr* taşıyıcısı ve yayıcısı haline getirmiştir.

mcr-pozitif *E. coli* izolatlarının dizi tipi (ST) çeşitliliği dağınık ve klonal olmayan bir yaygınlığa işaret etmiştir. Luo ve diğ. (2020) Çin'deki insan klinik *E. coli* izolatlarından *mcr-1*-pozitif ST'lerin (ST 156, 10, 410, 88 ve 131) daha önce kümes hayvanları ve domuzlardan izole edildiğini bildirmiştir. Bu bulgu, bu çalışmada en yaygın ST olan ve Hindistan'dan dönen yolculardan ve Avrupa'daki hayvanlardan da izole edilen ST10'u içermektedir. Ayrıca, Çin'den elde edilen veriler, Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar (GSBL) üreten insan *mcr*-pozitif izolatları arasında en yaygın GSBL geni olarak *bla_{CTX-M-55}*'i tanımlamıştır; bu da kolistin direncinin hayvanlardan insanlara olası geçişinin bir başka göstergesi olabileceğini düşündürmüştür (Liu ve diğ., 2015).

2.7. Köpeklerde Kolistin Direncinin Prevalansı ve Dünyadaki Dağılımı

Veteriner hekimlikte kolistin, evcil hayvanlarda bakteriyel infeksiyonların önlenmesi ve tedavisi için kullanılmaktadır. Kolistin son çare antibiyotik olarak adlandırıldığından, direnç endişeleri artmaktadır. Özellikle hayvanlardan, gıdalardan ve insanlardan rapor edilen aktarılabılır polimiksin direnci, bu endişelerin boyutunu sağlamlaştırmıştır. Kolistinin aşırı kullanımının hayvanların bağırsaklarında kolonize olan bakterilerde kolistin direncine neden olduğu doğrulanmıştır. Kolistinin yeniden kullanımı, özellikle çoklu ilaca dirençli bakterilerin ve karbapeneme dirençli bakterilerin yayılmasından bu yana, gereklilik ve daha da sınırlı tedavi seçenekleri nedeniyle yeniden ortaya çıkmıştır. Kolistin veteriner hekimlikte on yıllardır çiftlik hayvanlarında yaygın bir tedavi olarak kullanılmaktadır, ancak kolistin direncine ilişkin veriler nispeten azdır (Adıgüzel ve diğ., 2018).

Son yıllarda, insanların manevi seviyelerinin yükselmesiyle birlikte, insanlar için iyi bir duygusal değer sağlayabilen evcil köpekler tüm dünyada giderek daha fazla aile tarafından yetiştirilmekte ve evcil hayvanlar insanlarla günlük olarak yakın temas halinde olmaktadır. Evcil hayvanlarda bulunan mikroorganizmaların yanı sıra patojen bulaşma riski ve antibiyotik direnç genlerinin daha iyi anlaşılması çok önemlidir. *mcr-1* taşıyan bakterilerin, evcil hayvanlardan onları koruma, eğlence veya arkadaşlık için sahiplenen insanlara zoonotik bulaştığı bildirilmiştir. Kediler, köpekler gibi pet hayvanlar ve sahipleri arasındaki yakın temas, antibiyotiğe dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkmasına ve bulaşmasına neden olmuştur (Hamame ve diğ., 2022).

Günümüzde, kolistine dirençli bakteriler önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Bu nedenle, evcil hayvanlarda kolistine dirençli bakterilerin yaygınlığının belirlenmesi, kolistin direnci bulaşması, özellikle de bakterilerin zoonotik bulaşması için herhangi bir potansiyel risk faktörünün belirlenmesi açısından kritik öneme sahiptir (Hamame ve diğ., 2022, Zheng ve diğ., 2023).

Escherichia coli, ana *mcr* gen taşıyıcısı olması ve farklı hayvan konakçıları arasında kolayca aktarılabilmesi nedeniyle kolistin direncinde önemli bir rol oynamaktadır. Plazmid aracılı mobil kolistin direnç geni *mcr-1*, dünya çapında insanlar, gıda ve pet hayvanlarından elde edilen *E. coli*'de gözlenmiştir (Moo ve diğ., 2020).

mcr-1-pozitif suşların fekal kolonizasyonu dünya çapında evcil hayvanlar arasında tespit edilmiştir. Çin'deki evcil hayvanlarda *mcr-1*-pozitif *E. coli* prevalansı %6,1 ile %14,3 arasında değişmektedir (Lei ve diğ., 2021). Zhang ve diğ. (2016) dört köpekten izole edilen kolistin dirençli *E. coli*'de *mcr-1*'in tespit edildiğini ve *mcr-1* barındıran *E. coli*'nin pet hayvanları ile bir kişi arasında olası bulaşmasını rapor etmiştir. Guenther ve diğ. (2017), çevresel örnekler arasında çizme örneklerinde ve köpek dışkısı, ahır sinekleri ve gübre gibi emisyon kaynaklarından gelen yedi *mcr-1* pozitif *E. coli* suşu tespit edildiğini bildirmiştir. Çin'de yapılan bir çalışmada, evcil hayvanların %8,7'sinde Enterobacterales *mcr-1* bulunmuştur (Lei ve diğ. 2017). Loayza-Villa ve diğ. (2017) Ekvador'da bir evde *mcr-1* geni taşıyan *E.coli*'nin potansiyel hayvan rezervuarlarını tespit etmeyi amaçlamıştır. Bir tavuk ve iki köpekten üç farklı kolistin dirençli *E. coli* sekans tipi elde edildiği; bu izolatların insan izolatından farklı olduğu bildirilmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, Ortega-Paredes ve diğ. (2019), bir şehir parkındaki köpek dışkısından *mcr-1/bla_{CTX-M-65}* barındıran *E. coli* izolasyonunun, bu suşların insanlara potansiyel bulaşmasının olup olmadığını belirlemek için daha fazla çalışma yapılması olasılığını ortaya çıkardığını belirtmiştir. Ayrıca, klonal analizin gösterdiği yüksek genotipik çeşitliliğin, köpeklerdeki MDR *E. coli*'de bulunan direnç belirleyicilerinin çeşitli genetik geçmişlerine işaret ettiğini bildirmişlerdir. Ngbede ve diğ. (2020), hastane ortamlarından veya deve ve köpeklerin rektal sürüntülerinden elde edilen kolistin dirençli bakterilerin hiçbirinin *mcr* geni taşımadığını belirtmiştir. Lei ve diğ. (2021), 299 ailede (köpekler ve sahipleri) rektal sürüntülerden elde edilen *mcr-1* taşıyıcılığı prevalansının %2,7 olduğunu ve köpekler ile sahipleri arasında *mcr-1* taşıyıcılığı açısından anlamlı bir ilişki olduğunu bildirmiştir.

Menezes ve diğ. (2022) çalışması, Lizbon bölgesindeki toplumda *mcr-1*-pozitif *E. coli* suşları ile kolonizasyon/taşıyıcılık sıklığının köpeklerde %7,8 ve insanlarda %3,2 olduğunu ortaya koymuştur. Köpeklerden elde edilen *E. coli* suşlarında beklenmedik derecede yüksek *mcr-1* sıklığı, köpeklerin bir rezervuar olarak sahip olduğu potansiyeli ve dolayısıyla bu direnç belirleyicisinin yayılmasında insan-pet hayvanı ilişkisinin önemini vurgulamaktadır. Nguyen ve diğ. (2022) toplanan 51 köpek dışkısı örneğinden üçünde (%5,95) *mcr-1* geninin pozitif olduğunu ve *mcr-1* taşıyan dört izolatın yarısının *E. coli* olduğunu gözlemlemiştir.

Guangzhou, Çin ve Güney Kore'de yapılan çalışmalarda araştırmacılar, *mcr* genleri (ST93, ST3285 ve ST160) taşıyan *E. coli*'nin köpeklerde ishal vakalarında saptandığını

belirlemiştir (Wang ve diğ., 2018; Moon ve diğ., 2020). Avrupa (Fransa, İspanya ve Portekiz) ve Arjantin'de evcil hayvanlarda kolistine dirençli bakterilerin neden olduğu idrar yolu infeksiyonları da saptanmıştır. Çin, İngiltere ve Mısır'da köpeklerde ve sahiplerinde zatürre ve solunum yolu hastalıklarında da ortaya konulmuştur. Pnömoni, kolistine dirençli suşların (*mcr-1* veya *mcr-9* taşıyan *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *E. hormaechei*) varlığıyla da ilişkilendirilmiştir (Scott ve diğ., 2018; Wang ve diğ., 2018; Singleton ve diğ., 2021). Araştırmacılar İspanya'da yaptıkları çalışmada, köpeklerden ve insanlardan izole edilen *mcr-1*'i barındıran *E. coli*'nin (ST372) varlığını diğer enteropatojenik ve gastrointestinal hastalıklarda saptanmıştır (Chen ve diğ., 2017; Flament-simon ve diğ., 2020).

2.8. Evcil Hayvanlarda Kolistin Tedavisi

Avrupa Birliği ülkelerinde kolistin kullanım miktarı değişkendir. Asya ve Avrupa ülkelerinde yem katkı maddesi olarak, ayrıca tedavi ve profilaktik amaçlarla kullanılmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde FDA tarafından onaylanmış olmasına rağmen çiftlik hayvanlarında kullanılmamaktadır. Çin, Hindistan, Japonya ve Vietnam gibi Asya ülkelerinde çiftlik hayvanlarında vücut ağırlığı artışı için hayvan yemi katkı maddesi olarak kullanılmıştır (Kempf ve ark., 2016). Veteriner hekimlikte domuzlarda ve özellikle sığırlarda infeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Avrupa'da domuz, tavuk, sığır, koyun ve keçilerde Enterobacteriaceae'nin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde de kullanılmaktadır (Adıgüzel ve ark., 2021). Kolistin kullanımı Almanya' tarım ve hayvancılıkta yüksek miktarda iken, Fransa'daki kullanım orta seviye, Danimarka'da ise kullanımı düşük seviyede olarak sınıflandırılmaktadır (Watkins ve diğ., 2016).

Avrupa'da üriner patolojileri olan kedilerin %62'si ve diş hastalığı olan köpeklerin %36'sı kolistin dahil olmak üzere kritik öneme sahip antibiyotikler ile tedavi edilmektedir. Hayvanlarda kolistin kullanımı terapötik amaçlar için, yem katkı maddesi olarak veya metafilaktik tedavi içindir. İnsanlara ve gıda üreten hayvanlara uygulananlara kıyasla, evcil hayvanlarda kolistin kullanımına ilişkin daha zayıf standartlar uygulanmaktadır.

Avrupa'da antimikrobiyallerin kullanımı, kediler ve köpekler de dahil olmak üzere hayvanlarda araştırılmıştır ve en sık kullanılan antimikrobiyaller, amoksisilin-klavulanat gibi β -laktamlardır. Kedilerle ilgili olarak, bir antibiyotik olarak en yaygın kullanılan ikinci aktif bileşik ise sefovesindir (üçüncü nesil sefalosporin). Polimiksin B sülfat ise, evcil hayvanlarda kullanılan tedavilerin %6'sını temsil ettiği bildirilmiştir. Ayrıca, polimiksin B sülfat, Dünya

Sağlık Örgütü tarafından en yüksek önceliğe sahip kritik derecede önemli bir antimikrobiyal olarak sınıflandırılmıştır (Hussein ve diğ., 2021; Hamame ve diğ., 2022).

İnsanlarda ve onların evcil hayvanlarında tanımlanan kolistine dirençli izolatlar β -laktam direnç genleriyle ilişkilendirilmiştir. Genom analizi sonucu *mcr* genlerinin β -laktamazlarla (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} ve *bla*_{SHV}) ilişkisi ortaya konulmuştur (Rapoport ve diğ., 2016; Lei ve diğ., 2017; Ngbede ve diğ., 2020; Pathak ve diğ., 2020). *mcr* ve karbapenemazların bir arada bulunması, evcil hayvanlar ile sahipleri arasındaki direncin geçişini gösterdiğine de dikkat çekilmiştir (Hamame ve diğ., 2022). *eptA* ve β -laktamaz genlerine sahip çoklu ilaca dirençli bakterilerin, etkili bir terapötik çözüm bulmanın karmaşık olduğu türler olduğu düşünülmektedir (Mulvey ve diğ., 2016; Ngbede ve diğ., 2020).

2.9. Kolistin Direnci İçin Tek Sağlık Perspektifi

Antimikrobiyal direnç, Tek Sağlık perspektifinin bir parçası olarak kapsamlı bir çalışmaya uygun, karmaşık epidemiyolojiye sahip bir halk sağlığı sorunudur. Tek Sağlık, politika, araştırma, eğitim ve uygulama yoluyla insanlar, hayvanlar ve çevre için en iyi sağlığa ulaşmak amacıyla yerel, ulusal ve küresel olarak çalışan birden fazla disiplinin ortak çabası olarak tanımlanmaktadır. Antimikrobiyal direncin etkenleri arasında insanlarda, hayvanlarda ve çevrede antimikrobiyal kullanımı ve istismarı, ardından dirençli bakterilerin ve direnç belirleyicilerinin dünya çapında bu sektörler arasında yayılması yer almaktadır (Wassenaar ve diğ., 2008).

Hayvan sağlığı ve tarım sektörlerindeki başlıca endişeler, Gram-negatif bakteri enfeksiyonuyla mücadelede son çare ilaçlardan biri olan kolistin gibi insanlar için kritik önem taşıyan antimikrobiyallerin hayvanlarda kullanılmasıdır. Kolistinin insan ve veteriner hekimliğinde kontrolsüz kullanımı, Enterobacteriaceae familyasında kolistin direncinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. *mcr-1*'in ortaya çıkışı, kolistinin Çin ve Güneydoğu Asya çiftliklerinde kullanılması ve daha sonra düzinelerce başka ülkeye yayılmasıyla daha da şiddetlenmiştir. Kolistin direnci İspanya, İtalya ve Yunanistan'da sırasıyla %31, %43 ve %20,8 oranında arttığı bildirilmiştir. Kolistin direnci, çoklu ilaca dirençli bakteriler için terapötik bir seçenek olarak kullanılmasını zorlaştırmaktadır (Phillips ve diğ., 2004; Kempf ve diğ., 2016).

Beşerî tıbbın yanı sıra kolistin, çeşitli veteriner bulaşıcı hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Veteriner hekimlikte kolistin kullanımı ülkeler arasında büyük farklılıklar göstermektedir. Fransa, Avusturya ve İsveç'te kolistin, süten kesme sonrası domuz çiftliklerinde kullanılmaktadır. Almanya ve Hollanda'da yapılan bir araştırma, kolistin hayvancılıkta trimetoprim/sülfonamidler, tetrasiklinler, linkozamidler ve makrolidlerden sonra en yaygın kullanılan antibiyotik olduğu bildirilmiştir (Bos ve diğ., 2013). Asya ülkelerinde de kolistin ve diğer antibiyotikler hayvanlarda infeksiyonlarda ve tarımda yaygın olarak kullanılmaktadır (Centre, 2015; Norris ve diğ. 2019).

Kolistine dirençli bakterilerin ve kolistin dirençli genlerin ortaya çıkması ve hızlı bir şekilde coğrafi olarak yayılması bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Bu nedenle, kolistin direnciyle mücadele etmek için entegre ve bütünsel çok sektörlü bir yaklaşıma, özellikle de insan sağlığı, veteriner hekimlik ve çevrenin daha iyi entegrasyonuna acil ihtiyaç vardır. Birçok ülke ve uluslararası kuruluş, antimikrobiyal direnci ele almaya yönelik eylem planlarına Tek Sağlık perspektifini dahil etmiştir (Robinson ve diğ., 2016).

Önerilen eylemler arasında antimikrobiyal kullanım düzenlemesi ve politikası, sürveyans, idare, infeksiyon kontrolü, sanitasyon, hayvancılık ve antimikrobiyallere alternatiflerdeki iyileştirmeler yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) yakın zamanda tıbbi açıdan önemli antimikrobiyallerin gıda üreten hayvanlarda kullanımına ilişkin yeni kılavuzlar yayımlayarak, çiftçilerin ve gıda endüstrisinin sağlıklı hayvanlarda büyümeyi teşvik etmek ve hastalıkları önlemek için rutin olarak antimikrobiyal kullanmayı bırakmasını ısrarla tavsiye etmektedir (Hussein ve diğ., 2021). Bu kılavuzlar, insan tıbbı için önemli olan antimikrobiyallerin hayvanlarda kullanımını azaltarak etkinliğini korumayı amaçlamaktadır. Kolistin tüketimini ve direnç oluşumunu kontrol etmek amacıyla Avrupa ülkelerinde farklı izleme sistemleri kurulmuştur. AMR'nin aciliyetine yönelik son çok uluslu stratejiler arasında antibiyotiğe dirençli bakterilerle mücadele için ABD Ulusal Eylem Planı ve DSÖ Antimikrobiyal Direnç Küresel Eylem Planı yer almaktadır. DSÖ'nün Küresel Antimikrobiyal Direnç Gözetim Sistemi, ülkelerin ulusal sürveyans sistemlerini güçlendirmesine yardımcı olmakta ve daha kapsamlı standartlaştırılmış AMR sürveyans verileri sağlamaktadır (Scott ve diğ., 2018; Gogry ve diğ., 2021).

AMR çabalarının ön saflarında yer alan ülkeler ve ağlar, bu acil sorunun insan ve hayvan sağlığı, çevre, küresel ekonomi ve ulusal ve küresel güvenlik üzerindeki etkisini en

aza indirmede geniş kapsamlı faydalar sağlayacak etkili bir strateji geliştirmek için ek paydaşları dahil edilmesi gerektiğine araştırmacılar dikkat çekmektedir (Norris ve diğ. 2019; Gogry ve diğ., 2021).

2.10. Kolistin Direncini Tersine Çevirmek İçin Güncel Gelişmeler

Bugüne kadar, *mcr* ile ilişkili kolistin direncini azaltmaya yönelik üç temel yaklaşım araştırılmıştır. İlk çözüm, *mcr* pozitif organizmalara karşı eravasiklin, plazomisin ve artilisin gibi yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi olarak düşünülmektedir. Diğer bir teknik ise etkili kolistin uygulamasını ve sinerjik birliktelikler oluşturmak için ek ajanlarla kombinasyon tedavilerinin olası kullanımını içeren standart strateji olma eğilimindedir. Bu ajanlar, amikasin, aztreonam, rifampin, azitromisin, klaritromisin, linezolid, azidotimidin, tigesiklin ve triptamin türevleri gibi tipik olarak Gram-pozitif bakterilere karşı kullanımı kısıtlı olan antibiyotikleri içermektedir. Doğal ürünler de adjuvan olarak kullanılabileceği bildirilmiştir; bunlardan bazıları pentamidin ve meridianin D analogları gibi LPS'lerle etkileşime girerek dış bakteriyel membranı bozabileceği de düşünülmektedir. Buna karşılık, resveratrol, pterostilben, osthon ve niklosamid gibi diğer adjuvanların şimdiye kadar spesifik rolleri olmadığına da dikkat çekilmektedir. Son fakat en önemli ve odaklanılması gereken yönün, *mcr*'yi hedef alan spesifik ilaçların belirlenmesi olduğu raporlanmıştır. *mcr-1* mRNA'yı hedeflemek için peptit konjuge fosforodiamidat morfolino oligomerlerinin kullanımı, *mcr-1* genine karşı peptit nükleik asit ve *mcr-1* barındıran plazmidleri hedeflemek için CRISPR/Cas9 sistemi gibi gen düzeyinde *mcr* ifadesini azaltmak için tanımlanmış birkaç yöntem ortaya konulmuştur. Bununla birlikte, *mcr*'yi hedef alan spesifik ilaçları inceleyen çok az çalışma vardır ve sadece 1-phenyl-2-(phenylamino) ethanone türevleri ve lipid A analogu ethanolamine için umut verici sonuçlar gözlemlenmiştir. Etanolaminin *mcr-1* üreten bakterilere karşı inhibitör etkisi, *mcr-1* aktivitesinin bir inhibitörü olarak kullanılabileceğini daha da doğrulamak için in vivo olarak da test edilmiştir. Sonuçlar, 4 mg/ml polimiksin B varlığında, etanolaminin *mcr-1* ekspresyonunu konsantrasyona bağlı bir şekilde inhibe edebileceğini açıkça göstermiştir. Ayrıca, etanolamin, *mcr* ailesi içindeki yapısal model ve fonksiyonel birleşme ışığında *mcr-1* aktivitesinin bir inhibitörü olarak kullanılabilir olarak saptanmıştır. Raporlar, etanolaminin diğer *mcr* üyelerinin inhibitörü olarak hareket ettiğini göstermektedir. Ancak bunun doğrulanması için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. EptA, PEA'nın fosfatidiletanolaminden lipid A'ya 1 ve/veya 4' baş grubu pozisyonlarında transferini katalize eder. EptA, bir N-terminal transmembran alanı ve bir C-terminal çözünür

periplazmik bakan alandan oluşan bir integral membran proteinidir. Ayrıca, EptA enzimleri *E. coli*, *S. enterica*, *K. pneumoniae* gibi birçok Gram-negatif patojende bulunur. Ekspresyonu baskılayan potansiyel EptA inhibitörlerini tanımlamak ve optimize etmek için derinlemesine çalışmalar yürütülmektedir. Buna ek olarak, *Neisseria* türlerinde EptA inhibisyonuna benzer yaklaşımlar yeni tedaviler geliştirmek için faydalıdır. Çoklu ilaca dirençli bakterilerin bulaşmasını etkili bir şekilde azaltmak için anti-EptA bileşikleriyle birlikte yeni kombinasyon tedavileri olarak kullanılabilecek fagositik hücrelerin bakterisidal aktivitelerini artırmak için umut verici tedaviler şu anda geliştirilmektedir. Bu soruna karşı bir strateji, EptA tarafından lipid A modifikasyonunu inhibe eden yeni antivirülans ajanları geliştirmektir. EptA'nın inhibisyonunun polimiksinin etkinliğini geri kazandırması, enfeksiyonun bağışıklık sistemi tarafından temizlenmesini desteklemesi ve kolistin direncinin çoğalmasını en aza indirmesi umulmaktadır (Hamame ve diğ., 2022).

2.11. Gözetim stratejileri

Kolistin duyarlılık testinin önündeki birçok teknik zorluk göz önünde bulundurulduğunda, klinik tanı, numune alma ve sürveyans testleri için net stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır. Yerel sağlık hizmetleri ortamlarında, önerilen teknoloji mevcutsa kolistin direnci test edilmeli, teknoloji mevcut değilse numuneler gerekli teknik kapasiteye sahip laboratuvarlara gönderilmesi gereklilik olarak bildirilmektedir. Ulusal düzeyde, uygun kontroller ve standartlaştırılmış yöntemlerle kolistin direncini güvenilir bir şekilde izlemek için en az bir AMR referans laboratuvarı kurulması önerilmektedir. Böyle bir AMR referans laboratuvarı, yerel laboratuvarlardan gelen talep üzerine doğrulama testleri yapabilmelidir. Doğrulama testi için numuneler dikkatle seçilmeli ve aktarılabılır kolistin direnci kazandığından şüphelenilen izolatlar öncelik verilmelidir. *mcr* aracılı kolistin direncini tespit etmek için makul bir strateji, fenotipik direncin taranması ve ardından bir veya daha fazla *mcr* genini tespit etmek için moleküler tanı yöntemlerinden faydalanılması olarak düşünülmelidir. Bu tür moleküler testler bir referans laboratuvarında veya DSÖ ile iş birliği yapan bir merkezde gerçekleştirilebilir olmalıdır. İdeal strateji olarak, kolistin duyarlılık testi AMR sürveyansı için ulusal planlara dahil edilmelidir. Güçlü ulusal AMR sürveyans programlarına ve laboratuvar kapasitesine sahip ülkeler, en azından periyodik olarak, gıda üreten hayvanlardan ve ayrıca gıda ve çevre örneklerinden izole edilen bakterilerde kolistin direncinin izlenmesini içerecek şekilde genişletilmesi düşünülmelidir. Şu anda, kolistin direncinin tespiti, kaynakların sınırlı olduğu ortamlar için fenotipik bir tarama yöntemi olarak

önerilemeyecek kadar teknik açıdan karmaşıktır. Bu nedenle, laboratuvarların kolistin direnci olduğundan şüphelenilen izolatları saklaması ve kolistin direncini doğrulamak ve olası *mcr* genlerinin varlığını belirlemek için AMR referans laboratuvarları ve/veya DSÖ ile iş birliği yapan merkezlerle iş birliği yapması önemlidir.

Kolistin duyarlılık testi için numune bazlı sürveyans için Küresel antimikrobiyal direnç gözetim sistemi (GLASS) protokolü önerilmektedir. Numune bazlı sürveyansta vaka bulma, klinik amaçlarla rutin olarak laboratuvarlara gönderilen öncelikli numunelere odaklanır. Buna ek olarak, epidemiyolojik bilgiler her numune için mikrobiyolojik bilgilerle ve pozitif kültürler için kaydedilen standart AMR göstergeleriyle açıkça ilişkilendirilmelidir. Numune bazlı yaklaşım, duyarlı, orta ve dirençli izolatların oranı ve örneklenen toplam hasta sayısı hakkında bilgi edinilmesine olanak tanıyarak test edilen popülasyondaki belirli direnç türlerinin oranlarını veya sıklıklarını çıkarmayı mümkün kılar. Test edilen hastalar arasında bu tür direncin görülme sıklığına ilişkin bilgiler, popülasyondaki kolistin direncinin boyutuna ilişkin bir gösterge sağlayabilir. Sadece yüksek dirençli suşların test edilmesi durumunda direnç oranlarının abartılmaması için örnek popülasyonunun dikkatlice tanımlanması ve herhangi bir raporda açıklanması gerekmektedir (Bortolaia ve diğ. 2018).

3. YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Örnekler

Bu çalışmada, İstanbul'un çeşitli semtlerinde bulunan değişik yaş ve cinsiyette, evde beslenen 100 adet sahipli ve sağlıklı köpeğin dışkı örnekleri Kasım-Aralık 2023 tarihleri arasında toplandı.

Sıvablar Stuart taşıyıcı besiyeri içerisinde soğuk zincirde İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına ulaştırıldı ve incelenene kadar -80°C'de saklandı. Örnek alınan köpeklerin yaş, cinsiyet, ırk özellikleri kayıt edildi (Tablo3-1).

Tablo 3-1 Çalışmada toplanan örneklere ait alım tarihi, köpeğin adı, yaşı, cinsiyeti ve ırkı

Örnek No	Alım Tarihi	Köpeğin Adı	Yaş	Cinsiyet	İrk
1	26.11.2023	Neva	3	Dişi	Samoyed
2	28.11.2023	Anug	1,5 Yaş	Erkek	SiberianHusky
3	29.11.2023	Zara	12	Dişi	Min. Pinscher
4	29.11.2023	Alex	9	Erkek	Min. Pinscher
5	29.11.2023	Brisha	6	Dişi	Min. Pinscher
6	3.12.2023	Zeytin	6 Ay	Erkek	CockerSpaniel
7	3.12.2023	Cesur	5	Erkek	Anadolu Çoban
8	3.12.2023	Gezi	10	Erkek	LabradorRetriever
9	2.12.2023	Mars	5	Erkek	Black MouthCur
10	3.12.2023	Plüton	5	Erkek	Rottweiler
11	3.12.2023	Lili	3	Dişi	TerrierMix
12	4.12.2023	Mia	2	Dişi	Sosis (Dachshund)
13	4.12.2023	Vino	2	Erkek	Toy Poodle
14	3.12.2023	Lina	2,5 Yaş	Dişi	Pug
15	3.12.2023	Latte	13	Erkek	Golden Retriever
16	3.12.2023	Papi	2	Dişi	Pug
17	3.12.2023	Daisy	3	Dişi	Pug

18	4.12.2023	Sacha	4	Dişi	Miks
19	3.12.2023	Enzo	2	Erkek	Staffordshire Terrier
20	5.12.2023	Tekila	8	Dişi	Terrier
21	5.12.2023	Duman	6	Erkek	Akbaş Kangal Kırması
22	5.12.2023	Maya	4	Dişi	Amerikan Bully
23	6.12.2023	Gaspar	2,5 Yaş	Erkek	Staff Bull Terrier
24	6.12.2023	Obi	1.10 Ay	Dişi	Shi-Tzu
25	6.12.2023	Chiba	3.3 Ay	Dişi	Shi-Tzu
26	6.12.2023	Tarçın	4	Erkek	Toy Poodle
27	6.12.2023	Bizu	8,5 Yaş	Dişi	Labrador
28	6.12.2023	Rain	7 Ay	Dişi	Labrador
29	6.12.2023	Alex	4	Erkek	Golden
30	6.12.2023	Freya	2	Dişi	Pointer
31	6.12.2023	Rocky	3	Erkek	Pointer
32	6.12.2023	Şila	9	Dişi	Terrier
33	4.12.2023	Alev	6	Dişi	Pitbull
34	4.12.2023	Bailys	1	Dişi	Toy Poodle
35	4.12.2023	Bella	11 Ay	Dişi	Chihuahua
36	4.12.2023	Prens	4	Erkek	Chihuahua
37	4.12.2023	Karamel	2 Ay	Erkek	Chihuahua
38	7.12.2023	Nova	5	Erkek	Tazı Kırması
39	6.12.2023	Çaki	6	Dişi	Beagle
40	6.12.2023	Roxy	3	Dişi	Labrador Mix
41	7.12.2023	Pody	3,5 Yaş	Erkek	Poodle
42	7.12.2023	Lila	1,5 Yaş	Dişi	Maltipoo
43	7.12.2023	Kontes	2	Dişi	Alman Çoban Kurdu
44	7.12.2023	Ares	1,5 Yaş	Erkek	Pomeranian
45	8.12.2023	Ceku	5 Ay	Dişi	Maltipoo
46	8.12.2023	Ceku	3 Ay	Dişi	Morki
47	9.12.2023	Winter	4	Dişi	Terrier
48	10.12.2023	Tarçın	2	Dişi	Jack Russel Kırması
49	9.12.2023	Sherpa	3	Dişi	İngiliz Setter
50	7.12.2023	Jolene	2	Dişi	Avustralya Çoban
51	10.12.2023	Poffy	2	Erkek	Toy Poodle
52	10.12.2023	Loki	8	Erkek	Golden Retriever
53	7.12.2023	Rollo	11	Erkek	Miks

54	6.12.2023	Lokum	9	Dişi	Golden Retriever
55	6.12.2023	Alvin	1	Erkek	Poodle
56	6.12.2023	Gofret	10 Ay	Dişi	Golden Retriever
57	6.12.2023	Kaju	7	Dişi	Cocker
58	6.12.2023	Orfe	6	Dişi	Miks
59	11.12.2023	Luna	4	Dişi	JackRussel
60	10.12.2023	Gibson	5	Dişi	Kopay Av
61	10.12.2023	Mösyö	2	Erkek	Toy Poodle
62	10.12.2023	Kuki	4	Dişi	Pinscher
63	10.12.2023	Şatz	3	Erkek	MalteseTerrier
64	9.12.2023	Badem	10	Dişi	Yorkshire
65	9.12.2023	Gudu	10	Dişi	Yorkshire
66	7.12.2023	Dobi	4 Ay	Dişi	French Bulldog
67	12.12.2023	Gümüş	7 Ay	Erkek	Maltipoo
68	12.12.2023	Rocky	4	Erkek	French Bulldog
69	12.12.2023	Lily	1,5 Yaş	Dişi	Setter
70	14.12.2023	Mocha	3	Erkek	Rottweiler
71	10.12.2023	Lucky	5	Erkek	JackRussel
72	17.12.2023	Mars	8	Erkek	French Bulldog
73	13.12.2023	Alex	5	Erkek	Golden Retriever
74	17.12.2023	Cooper	2,5 Yaş	Dişi	English Cocker
75	14.12.2023	Lily	4	Dişi	GermanSpitz
76	17.12.2023	Guti	8	Dişi	Golden Retriever
77	6.12.2023	Mickey	5,5 Yaş	Erkek	Poodle
78	6.12.2023	Bobi	13	Erkek	Malta Köpeği
79	6.12.2023	Garip	15	Dişi	Miks
80	6.12.2023	Moco	4	Dişi	Miks
81	8.12.2023	Nohut	11	Erkek	Miks
82	9.12.2023	Barney	8	Erkek	Golden
83	9.12.2023	Shans	6 Ay	Dişi	Miks
84	9.12.2023	Karamel	2	Erkek	Maltipoo
85	10.12.2023	Rollo	1	Erkek	Poodle
86	10.12.2023	Borbe	6 Ay	Dişi	Poodle
87	16.12.2023	Nita	3	Dişi	CavalierKing Charles
88	14.12.2023	Mars	2 Ay	Erkek	Poodle
89	16.12.2023	Milo	4	Erkek	Terrier
90	14.12.2023	Monşer	2,5 Yaş	Erkek	Pug

91	18.12.2023	Ati	2,5 Yaş	Erkek	Miks
92	19.12.2023	Tarçın	2,5 Yaş	Erkek	Poodle
93	21.12.2023	Megi	6	Dişi	Pinscher
94	19.12.2023	Coni	2	Erkek	Poodle
95	19.12.2023	Ceku	3	Dişi	Rottweiler
96	22.12.2023	Hera	1,5 Yaş	Dişi	Yorkshire Terrier
97	6.12.2023	Polo	2,5 Ay	Erkek	Poodle
98	24.12.2023	Fındık	4	Erkek	Alman Kurdu
99	22.12.2023	Bilek	7	Dişi	Alman Kurdu
100	22.12.2023	Badem	5	Erkek	Miks

3.1.2. Besiyerleri

E. coli izolasyonu aşamasında MacConkey Agar (Oxoid CM0115), Nutrient Agar (%7 koyun kanı ilave edilmiş) (Kanlı Agar) (Merck 1.01614.1000); identifikasyon aşamasında Nutrient Broth (Acumedia 7146), Üre Agar (Oxoid CM0053), Methyl Red (MR) Broth (Acumedia 7237), Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar) (Oxoid CM0277), Simmons' Citrate Agar (Himedia M09), Karbonhidrat Fermentasyon besiyeri (Himedia RM 005), antimikrobiyal duyarlılık testi aşamasında ise Mueller Hinton Agar (Oxoid CM 129) ve Katyon-Ayarlı Mueller-Hinton Broth (Oxoid CM 0405) besiyerleri kullanıldı.

3.1.3. Ayraçlar ve Kimyasallar

Katalaz testinde %3 hidrojen peroksit solüsyonu; oksidaz testinde oksidaz identifikasyon stripleri (Sigma Aldrich 40560); indol testinde kovaks ayıracı; metil kırmızısı testinde MR ayıracı kullanıldı.

Antibiyotik Diskleri

- Siprofloksasin 5 µg
- Nalidiksik Asit 30 µg

- Amikasin 30 µg
- Gentamisin 10µg
- Tetrasiklin 30 µg
- Kloramfenikol 30 µg
- Trimetoprim-Sulfametaksazol 1.25/23.75 µg
- Amoksisilin/Klavulonik Asit 20/10 µg
- Ampisilin/Sulbaktam 10/10 µg
- Aztreonam 30 µg

3.1.4. Diğer

- Gram boyama Seti (GBL 5026/01,02,03,04)
- Gram negatif ticari identifikasyon kiti (BD Diagnostic Instrument Systems Becton, Dickinson and Company, USA)
- Colistin sulfate salt (Sigma C4461)
- Resazurin sodium salt (Sigma R7017)

3.1.5. Standart Suşlar

İzolasyon ve identifikasyonu ve antimikrobiyal duyarlılık testleri aşamalarında pozitif kontrol olarak İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı koleksiyonunda bulunan *E. coli* ATCC 25922 ve *E. coli* NCTC 13846 kullanıldı.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. İzolasyon

Dışkı örnekleri MacConkey agar besiyerlerine ekim yapıldı ve 35 °C’de 24 saat aerob koşullarda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda MacConkey agar’da üreyen pembe renkli koloniler Gram boyama yöntemiyle boyanarak mikroskopta incelendi. Gram negatif çomak şeklindeki bakteriler identifikasyonlarının yapılması amacıyla kanlı agarda saflaştırıldı.

3.2.2. İdentifikasyon

Gram boyanma özelliği, katalaz, oksidaz, sitrat, indol, MR, üre, TSIA’da H₂S oluşumu ve karbonhidrat fermentasyon testleri yapıldı ve identifikasyon tamamlandı (Quinn ve diğ, 1994; EFSA 2011). Elde edilen isolatları doğrulamak amacıyla BD Phoenix M50 (BD Diagnostic Systems, ABD) otomatik sistemi kullanıldı.

3.2.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

E. coli isolatlarının florokinolon, aminoglikozit, tetrasiklin, fenikol, sulfonamid, penisilin ve monobaktam grubu antimikrobiyallere karşı duyarlılıkları EUCAST (2024) ve CLSI (2014) yöntemlerine göre saptandı.

Her bir izolatin 24 saatlik kültüründen steril FTS içinde 0,5 MacFarland bulanıklık standardına uygun süspansiyon hazırlandı, steril bir svap bu süspansiyona daldırıldı, Mueller-Hinton Agar yüzeyine üç yönde sürülerek ve plak yüzeyine diskler yerleştirildi. Test plakları 35 °C sıcaklıkta 24 saat aerob koşullarda inkübe edildi. İnkübasyonun ardından oluşan üreme inhibisyon zonları ölçülerek değerlendirildi (EUCAST, 2015).

Kullanılan antimikrobikler (disk içeriği), duyarlılık olarak kabul edilen zon çapları ve kaynaklar tablo 3-2’de gösterildi.

3.2.3.1. Çoklu İlaç Direnç (MDR) Varlığının Araştırılması

Üç ya/ya da üçten fazla antimikrobiyal grubunda direnç saptanan isolatlar MDR pozitif olarak değerlendirildi.

Tablo 3-2 Çalışmada kullanılan antibiyotik disklerinin içerikleri, referans aralıkları ve kaynağı

Antimikrobiyaller	Disk İçeriği	İnhibisyon Zonu (mm)		Kaynak
		Dirençli	Duyarlı	
Siprofloksasin	5 µg	<15	≥21	EUCAST 2015
Nalidiksik Asit	30 µg	≤13	≥19	CLSI 2014
Amikasin	30 µg	<14	≥17	EUCAST 2015
Gentamisin	10 µg	<12	≥15	EUCAST 2015
Tetrasiklin	30 µg	≤11	≥15	CLSI 2014
Kloramfenikol	30 µg	<17	≥17	EUCAST 2015
Trimetoprim-Sulfametaksazol	1.25/23.75 µg	<13	≥16	EUCAST 2015
Amoksisilin/Klavulonik Asit	20/10 µg	<19	≥19	EUCAST 2015
Ampisilin/Sulbaktam	10/10 µg	<14	≥14	EUCAST 2015
Aztreonam	30 µg	<21	≥24	EUCAST 2015

3.2.3.2. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi İle Kolistin Direncinin Doğrulanması

Kolistin direncinin doğrulanması amacıyla referans yöntem olan sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı. Elde edilen minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerleri EUCAST (2019) kriterlerine göre değerlendirildi.

Stok Kolistin Hazırlanması:

10 mg Colistin sulfate salt (Sigma C4461) tartıldı, 5,71 ml’de distile suda çözündürüldü. 1/10 steril besiyeri ile dilüe edilip filtreden geçirilerek steril edildi. Stok başlangıç konsantrasyonu 128 µg/mL olarak hesaplandı. Ependorf tüplerine 300 µL bölünerek -80°C’de saklandı.

Bakteri Süspansiyonu Hazırlanması:

1 ml 0,5 McFarland yoğunluğunda (1×10^8 CFU/mL) bakteri süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyon 1/20 dilüe edildi ve böylece 5×10^6 CFU/mL bakteri süspansiyonu elde edildi. Bu süspansiyondan ilgili kuyulara 10 µl ilave edilerek, son bakteri yoğunluğu 5×10^5 CFU/mL oranı elde edildi. Hazırlanan süspansiyon 15 dk içinde mikropalakataki kuyulara dağıtılarak kullanıldı.

Resazurin Hazırlanması:

Resazurin sodyum salt (Sigma R7017) 0,001 gr tartılıp 10 mL steril distile suda çözülür ve filtreden geçirildi.

Çalışma Yöntemi:

İlk aşama olarak tüm kuyucuklara 100 µl besiyeri eklendi. İkinci aşamada ise ilk kuyucuğa dilüsyon yapılmış kolistinden 100 µl ilave edildi ve seri dilüsyonları yapıldı. Bu aşama ile kolistin konsantrasyonu 64-0,03 µg/ml olarak elde edildi. Üçüncü aşamada, bakteri süspansiyonundan tüm kuyucuklara 10 µl eklendi. Son aşamada ise resazurinden her kuyucuğa 10 µl ilave edildi. Plakaların üzeri kapak ile kapatıldıktan sonra 35°C’de 20 saat inkübe edildi.

Sonuçların Değerlendirilmesi:

İnkübasyon süresi sonunda plakalardaki renk değişimi göz ile değerlendirildi. Resazurinin maviden pembe veya renksiz hale dönmesi pozitif yani bakteriyel üreme olarak değerlendirildi.

Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değeri resazurinin maviden pembeye veya renksiz hale dönmesini engelleyen en düşük konsantrasyon olarak belirlendi.

Test tüm örnekler için iki kez tekrar edildi.

4. BULGULAR

4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon

Çalışmada İstanbul'un çeşitli semtlerinde bulunan değişik yaş ve cinsiyette, evde beslenen 100 adet sahipli ve sağlıklı köpeğin dışkı örnekleri rektal svab yöntemiyle toplandı.

MacConkey besiyerindeki görünümlerine göre 59 izolatın (%59) *E. coli* şüpheli koloni görünümüne sahip olduğu saptandı (Şekil 4-1).

Şüpheli izolatlara Quinn ve diğ. (1994)'na göre yapılan konvansiyonel biyokimyasal testler (katalaz, oksidaz, sitrat, indol, MR, üre, TSIA'da H₂S oluşumu ve karbonhidrat fermentasyon testleri) sonucunda 59 izolatın *E.coli* olduğu belirlendi. Konvansiyonel yöntemlerle *E. coli* olduğu belirlenen 59 izolat BD Phoenix™ M50 cihazı ile de konfirme edildi.



Şekil 4-1 Çalışmada elde edilen *E. coli* şüpheli izolatın MacConkey agardaki görünümü

[illegible]

17	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S
18	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
20	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R
21	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
22	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S
23	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
25	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
31	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S
32	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
35	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S
37	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
38	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
39	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
41	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
42	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
43	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S
44	R	S	S	S	S	R	S	R	S	R
46	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
47	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R
49	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
50	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S
52	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
53	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S
54	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
56	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
57	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S
58	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
59	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
60	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
61	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S
63	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
64	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
65	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
70	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R
71	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
72	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
73	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
75	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
79	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R
80	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R
81	S	S	S	S	R	R	R	S	S	R
82	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
83	R	R	S	S	R	S	R	R	S	S
86	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S
93	S	R	S	S	R	R	S	R	S	S

94	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
96	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R
98	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
99	S	R	S	S	R	R	R	R	S	R
100	R	R	S	S	R	R	S	R	S	S

S: Susceptible R: Resistant

4.2.2. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ile Kolistin Direncinin Doğrulanması

Çalışmada köpek dışkı örneklerinden elde edilen 59 *E. coli* izolatında kolistine karşı direnç fenotipik olarak araştırıldı ve yapılan sıvı mikrodilüsyon testi sonucunda 1 izolatın (100 numaralı örnek) fenotipik olarak kolistine dirençli olduğu saptandı.

Çalışmanın doğruluğunun teyit edilmesi amacıyla aynı işlem iki kez yapıldı ve buna göre 59 izolattan 1 tanesinde (%1,69 oranında) fenotipik direnç (MİK değeri $>2 \mu\text{g/ml}$) olduğu saptandı.

Negatif kontrol olarak kullanılan kolistin duyarlı *E. coli* ATCC 25922'nin kolistin MİK değeri $\leq 2 \mu\text{g/mL}$, pozitif kontrol *E. coli* NCTC 13846 kolistin MİK değeri $>2 \mu\text{g/mL}$ olarak belirlendi.

5. TARTIŞMA

Dünya genelinde 223 milyondan fazla evcil hayvana sahip olduğu tahmin edilmektedir. Evcil hayvanlar her zaman insanlara eşlik etmek, onları eğlendirmek ya da onlara şefkat göstermek için beslenmektedir. Çoğu evcil hayvan sahibi, evcil hayvanlara çocukları ve aile üyeleri gibi davranmaktadır. Bununla birlikte, insanlar ve evcil hayvanlar arasındaki yakın temas, antimikrobiyal dirençli bakteriler de dahil olmak üzere patojenlerin bulaşma riskini artırmaktadır (Lei ve diğ., 2021). Önceki çalışmalar, antimikrobiyal dirençli bakterilerin köpekler de dahil olmak üzere pet hayvanlarından sıklıkla izole edildiğini göstermiştir.

Escherichia coli, ana *mcr* gen taşıyıcısı olması ve herhangi bir tür engeli olmadan farklı hayvan konakçıları arasında kolayca aktarılabilmesi nedeniyle kolistin direncinde önemli bir rol oynamaktadır (Loayza-Villa ve diğ., 2020). Bununla birlikte, köpeklerden izole edilen kolistin direnci barındıran *E. coli*'ye ilişkin az sayıda rapor bulunmaktadır. Bu çalışmada İstanbul'un çeşitli semtlerinde bulunan değişik yaş ve cinsiyette, evde beslenen 100 adet sahipli ve sağlıklı köpeğin dışkı örnekleri incelendi ve 59 izolatin *E. coli* olduğu belirlendi.

Son yıllarda, çoklu ilaca dirençli bakteri türlerinin, özellikle de geniş spektrumlu β -laktamaz veya karbapenemaz üreten Gram-negatif enterobakterilerin yayılması, dünya çapında sağlık hizmetlerinde üçüncü kuşak sefalosporinlere ve karbapenemlere alternatif bir antimikrobiyal olarak kolistin kullanımını teşvik etmiştir. Bununla birlikte, kolistin tıbbi kullanımını Gram-negatif basiller arasında kolistin direnci raporlarında bir artış izlemiştir (Yasugi ve diğ., 2023).

İnsanlarda *mcr-1*-pozitif bakteri prevalansı dünya genelinde %0,02 ile %28,3 arasında değişmektedir (Lei ve diğ., 2021). Hayvanlardan ve hayvansal kaynaklı gıdalardan elde edilen bakterilerde kolistin direncine ilişkin veriler nispeten azdır. 2014 yılına kadar kolistin, Avrupa'da hayvan kökenli bakterilerin süreyansının Enterobacteriaceae zorunlu antimikrobiyal paneline dahil edilmemiştir (Komisyon Uygulama Kararı 2013/652/EU). Birçok ülkede kolistin insanlarda veya hayvanlarda eksik veya sınırlı kullanımı, bu ülkelerdeki hayvan kökenli bakterilere ilişkin epidemiyolojik çalışmalarda ve süreyans sistemlerinde polipeptitlerin hariç tutulmasında muhtemelen rol oynamıştır.

Kolistin direncini belirlemede metodolojik zorluklar ön plana çıkmaktadır. Bir yağ asidi zincirine bağlı siklik bir decapeptit olan ve bu nedenle agarda iyi yayılmayan kolistine karşı bakteriyel duyarlılığın analizi klasik disk difüzyon yöntemlerini engellemektedir. Sonuç olarak, kolistin diski etrafındaki inhibisyon bölgeleri küçük olmasının sonucunda kolistine duyarlı ve dirençli suşların ayırt edilmesini zorlaştırmaktadır. Kolistin ayrıca plastik panellere de bağlanması sonucunda ortamdaki aktif konsantrasyonda belirsizliklere neden olmaktadır. Mikrodilüsyon metoduyla bu yapışmayı azaltmak için yüzey aktif maddelerin kullanımı önerilmektedir (Kempf ve diğ., 2016). CLSI ve EUCAST gibi uluslararası standart belirleyici kuruluşlar kolistin duyarlılığının test edilmesi için sadece sıvı mikrodilüsyonu önermiştir. Bu çalışmada kolistin direncinin belirlenmesi amacıyla referans yöntem olan sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır.

Yeni antibiyotiklerin karşılaştırıldığı klinik çalışmalar, Gram negatif bakterilerin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde kolistinin klinik etkinliğine ilişkin yeni veriler sağlamaktadır. Klinik sonuçlara göre kolistin, özellikle diğer başka ilaçların mevcut olduğu durumlarda, zayıf bir monoterapötik seçenek olarak görünmektedir. Özellikle, farmakokinetiği hastalar arasında büyük farklılıklar gösterdiğinden, kolistin dozu karmaşıktır. Bu nedenle, şu anda belirlenen kesme noktalarının ve epidemiyolojik kesme değerlerinin klinik kararları doğru bir şekilde bilgilendirip bilgilendirmediğini belirlemek için klinik sonuçların daha fazla gözden geçirilmesi gerekmektedir (Boyen ve diğ., 2010; WHO 2015; Nordmann ve diğ., 2016; Abdul Momin ve diğ., 2017; Nation ve diğ., 2017).

Bu yöntemlerin performansı bakteri türüne ve kolistin direnç mekanizmalarına bağlıdır. Kolistin duyarlılığının daha basit, daha güvenilir in vitro testlerine ve kolistine dirençli, *mcr*-pozitif izolatları seçici olarak belirlemeye yönelik yöntemlere duyulan ihtiyaç teknik gelişmeyi yönlendirmektedir ve gelişmiş fenotipik test ürünlerinin kullanıma sunulması beklenmektedir. Diğer birçok antimikrobiyal ajan sınıfında olduğu gibi, moleküler testler kolistin direncinin izlenmesi için fenotipik testlere bir alternatif olarak öne çıkmaktadır. Küresel antimikrobiyal direnç gözetim sistemi (GLASS), erken uygulama aşamasında sadece fenotipik testlerle elde edilen hedef patojenlerin antimikrobiyal duyarlılığı hakkında veri toplamaktadır ve henüz spesifik direnç mekanizmalarının dağılımı hakkında veri toplamamaktadır. Bununla birlikte, genotipik surveyans, antimikrobiyal duyarlılık için müteakip fenotipik testler için izolatların seçimi için bir temel olarak kullanılması önerilmektedir. Bu sonuçlar GLASS'a gönderildikten sonra olağandışı fenotipik direnç(ler)e

sahip izolatlar için direnç mekanizmalarının tamamlayıcı bir araştırması kullanılması faydalı bulunmaktadır. Bu tür çalışmalar, AMR'nin epidemiyolojisinin ve insan klinik, hayvan sağlığı ve tarım sektörlerinin AMR sorununa göreceli katkılarının anlaşılmasına yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca GLASS'taki Gelişen Antimikrobiyal Direnç modülüne (GLASS-EAR sistemi) raporlamayı da geliştirebileceği öne çıkmaktadır. Genotipik sonuçlar, belirtilen kolistin direnç mekanizmasının veya geninin varlığı veya yokluğu olarak raporlanmalıdır (Boyen ve diğ., 2010; WHO 2015; Nordmann ve diğ., 2016; Abdul Momin ve diğ., 2017; Nation ve diğ., 2017).

Norveç ve İsveç'te evcil hayvanlarla ilgili olarak, iki çalışma köpek izolatlarında direncin çok düşük düzeylerde olduğu bildirilmiştir (Swedres-Svarm, 2015; Simonsen ve Urdahl, 2017). Sıvı mikrodilüsyon yöntemlerine göre, İsveç'teki köpeklerden elde edilen kolistine dirençli 690 *E. coli* izolatında %5 olarak bildirilmiştir (Swedres-Svarm, 2015). Norveç'te ise köpeklerden izole edilen 179 *E. coli* izolatında sıvı mikrodilüsyon CLSI yöntemi ile kolistin direnci %0,6 oranında saptanmıştır (Simonsen ve Urdahl, 2017).

İsviçre'de yapılan başka bir çalışmada, kedi ve köpeklerin klinik örneklerinden izole edilen izolatların %2'sinde (4 izolattan 2'si, tüm köpeklerde) kolistin direnci tespit edilmiştir. Bu suşlardan sadece biri idrardan izole edilen *E. coli* (MİK 2 mg/L)'dir. Bu çalışmadaki kolistin direnç oranları kedi ve köpek suşlarında farklılık göstermektedir ve diğer çalışmalarla da farklılık göstermektedir. Bu çalışmada *mcr-1*, *mcr-2* ve *mcr-3* genleri için pozitiflik saptanmış olsa da direncin başka farklı mekanizmalarla da ortaya çıkma ihtimali göz önünde bulundurulduğunda, fenotipik olarak belirlenen bu kolistin direncinin hem kedi ve köpek popülasyonlarında yayılması hem de insan sağlığı açısından risk oluşturması açısından göz ardı edilmemesi gerektiği rapor edilmiştir (Simmen ve diğ., 2016).

Ngbede ve diğ. (2020) köpek rektal swaplarından 42/110 *E. coli* izole etmiş, bu izolatların sadece 2'sinde MİK yöntemi ile direnç gözlediklerini bildirmişlerdir. Loayza-Villa ve diğ. (2020) Ekvator'da yaptıkları bir çalışmada bir köpekte kolistin direnci saptadıklarını bildirmiştir.

Zheng ve diğ. (2023) Çin'de yaptıkları çalışmada köpeklere ait intestinal örneklerden 593/769 (%77,11) kolistin dirençli *E. coli* saptadıklarını bildirmiş, kolistin direnci bulunan izolatlarda MDR varlığının dikkat çekici düzeyde görüldüğünü rapor etmişlerdir.

Türkiye'de yapılan bir çalışmada, köpeklerden izole edilen *E. coli* suşlarının %37,8'inde fenotipik olarak kolistin direnci tespit edildiği, ancak bu fenotipin incelenen *mcr-1*, *mcr-2* ve *mcr-3* genleriyle ilişkili olmadığı bildirilmiştir (Sezener ve diğ., 2022).

Bu çalışmada elde edilen sonuçlarda üç ve/veya üçten fazla ilaç grubunda direnç saptanan 18 izolat MDR pozitif olarak kabul edildi. Bununla beraber, izolatların 58'i kolistine duyarlı (MİK değeri ≤ 2 µg/ml), sadece 1'i kolistine dirençli (MİK değeri > 2 µg/ml) bulundu. Çalışmamızda saptanan bu düşük oran ümit vaat etmektedir. Bununla birlikte ülkemizde az sayıda çalışma olduğu göz önüne alındığında, kolistin direncinden sorumlu olan tüm genlerin araştırılacağı ve farklı hayvan türlerinde çok sayıda örneklememin yapılacağı çalışmaların yapılması önemlidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tüm dünyada önemini koruyan antimikrobiyal direnç sorunu, insan ve hayvanlardan izole edilen *E. coli* izolatlarındaki direnç ile bir kez daha dikkatleri üzerine çekmiştir. Kolistin, karbapenem dirençli Gram-negatif bakterilere karşı en etkili antibiyotiktir. Kolistinin veteriner tedavisinde kullanımı sınırlı iken, hayvan izolatlarında kolistine dirençli Gram-negatif bakterilere rastlanmıştır. İnsanlarda, böbrek fonksiyonlarının bozulması nedeniyle kullanımı sınırlı olan kolistin, günümüzde çoklu antibiyotik dirençli Gram-negatif bakterilerin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır.

İnsanlar ve evcil hayvanlar arasındaki sık ve yakın temas nedeniyle, çalışmamız kolistin dirençli Enterobacteriaceae' nin her iki gruba da bulaşması için fırsatların mevcut olduğu ortaya koymuştur. Pet hayvanlarında ve gıda üreten hayvanlarda kolistine dirençli Enterobacteriaceae' yi azaltmak için daha fazla gözetim ve kontrol çabasına ihtiyaç vardır.

Türkiye’de yapılan çalışma sayısı sınırlıdır. Bu araştırmaların sonuçlarına göre kolistin direnci düşük oranda saptanmış olursa bile bu durumun gelecek için bir tehlike olabileceği düşünülmüştür. Kolistin kullanımının sınırlandırılmasının seçici baskıları büyük ölçüde azaltması ve böylece plazmid aracılı kolistin direncini kontrol etmesi beklenmektedir. Gerek pet hayvanlarının tedavisinde gerek hayvansal üretimde kolistinin sınırlandırılması ve etkili faktörlerin kapsamlı bir şekilde incelenmesi karmaşık olan antibiyotik direnci sorununu tam olarak ortadan kaldırmasa bile etkili stratejiler ve önleyici tedbirler sağlayacağı düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

- [1]. Abdul Momin MHF, Bean DC, Hendriksen RS, Haenni M, Phee LM, Wareham DW.,(2017). CHROMagar COL-APSE: a selective bacterial culture medium for the isolation and differentiation of colistin resistant Gram-negative pathogens. *Journal of Medical Microbiology*, 66:1554–61.
- [2]. Adıgüzel, M. C., Baran, A., Turgut, T., & Erdoğan, A. (2018, September). Colistin Resistant *Escherichia Coli* and Mcr Gene by Plasmid-Mediated Resistance. In Science Conference (p. 54). International Agricultural, Biological & Life Science Conference, Edirne, Turkey.
- [3]. Adiguzel, M. C., Baran, A., Wu, Z., Cengiz, S., Dai, L., Oz, C., ... & Sahin, 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.
- [4]. AbuOun, M., Stubberfield, E. J., Duggett, N. A., Kirchner, M., Dormer, L., Nunez-Garcia, J., ... & Anjum, M. F. (2017). mcr-1 and mcr-2 (mcr-6.1) variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(10), 2745-2749.
- [5]. Berlana, D., Llop, J. M., Fort, E., Badia, M. B., & Jodar, R. (2005). Use of colistin in the treatment of multiple-drug-resistant gram-negative infections. *American journal of health-system pharmacy*, 62(1), 39-47.
- [6]. Borowiak, M., Fischer, J., Hammerl, J. A., Hendriksen, R. S., Szabo, I., & Malorny, B. (2017). Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, mcr-5, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(12), 3317-3324.
- [7]. Bortolaia, V., Dekhnich, A., Hendriksen, R. S., Kozlov, R., Patel, J., Paveenkittiporn, W., ... & Woodford, N. (2018). Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS)-The detection and reporting of colistin resistance. *World Health Organization*.
- [8]. Bos, M. E., Taverne, F. J., van Geijlswijk, I. M., Mouton, J. W., Mevius, D. J., Heederik, D. J., & Netherlands Veterinary Medicines Authority (SDa). (2013). Consumption of antimicrobials in pigs, veal calves, and broilers in the Netherlands: quantitative results of nationwide collection of data in 2011. *PLoS One*, 8(10), e77525.
- [9]. Boyen, F., Vangroenweghe, F., Butaye, P., De Graef, E., Castryck, F., Heylen, P., ... & Haesebrouck, F. (2010). Disk prediffusion is a reliable method for testing colistin susceptibility in porcine *E. coli* strains. *Veterinary microbiology*, 144(3-4), 359-362.
- [10]. Carattoli, A., Villa, L., Feudi, C., Curcio, L., Orsini, S., Luppi, A., ... & Magistrali, C. F. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance*, 22(31), 30589.
- [11]. Catry B, Cavaleri M, Baptiste K, Grave K, Grein K, Holm A, Jukes H, Liebana E, Navas AL, Mackay D, Magiorakos AP, Romo MA, Moulin G, Madero CM, Pomba MC, Powell M, Pyorala S, Rantala M, Ruzauskas M, Sanders P, Teale C, Threlfall EJ, Torneke K, van

- Duijkeren E, Edo JT. (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. *Int J Antimicrob Agents* 46:297–306.
- [12]. Centre QMR. The Global Polymyxin Industry Report Ottawa (Canada) (2015). Available online at: <http://www.qyresearch.com>
- [13]. Chang, M. H., Chen, G. J., & Lo, D. Y.(2019). Chromosomal Locations of *mcr-1* in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* from dogs. *Taiwan Veterinary Journal*, 45(03), 79-84.
- [14]. Carroll, L. M., Gaballa, A., Guldemann, C., Sullivan, G., Henderson, L. O., & Wiedmann, M. (2019). Identification of novel mobilized colistin resistance gene *mcr-9* in a multidrug-resistant, colistin-susceptible *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate. *MBio*, 10(3), 10-1128.
- [15]. Elbediwi, M., Li, Y., Paudyal, N., Pan, H., Li, X., Xie, S., ... & Yue, M. (2019). Global burden of colistin-resistant bacteria: mobilized colistin resistance genes study (1980–2018). *Microorganisms*, 7(10), 461.
- [16]. Flament-Simon, S. C., De Toro, M., García, V., Blanco, J. E., Blanco, M., Alonso, M. P., ... & Blanco, J. (2020). Molecular characteristics of extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC), uropathogenic *E. coli* (UPEC), and multidrug resistant *E. coli* isolated from healthy dogs in Spain. Whole genome sequencing of canine ST372 isolates and comparison with human isolates causing extraintestinal infections. *Microorganisms*, 8(11), 1712.
- [17]. Hamel, M., Rolain, J. M., & Baron, S. A. (2021). The history of colistin resistance mechanisms in bacteria: progress and challenges. *Microorganisms*, 9(2), 442.
- [18]. Hussein, N. H., Al-Kadmy, I. M., Taha, B. M., & Hussein, J. D. (2021). Mobilized colistin resistance (*mcr*) genes from 1 to 10: a comprehensive review. *Molecular biology reports*, 48, 2897-2907.
- [19]. García-Fernández, S., García-Castillo, M., Ruiz-Garbajosa, P., Morosini, M. I., Bala, Y., Zambardi, G., & Cantón, R. (2019). Performance of CHROMID® Colistin R agar, a new chromogenic medium for screening of colistin-resistant Enterobacterales. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 93(1), 1-4.
- [20]. Gogry, F. A., Siddiqui, M. T., Sultan, I., & Haq, Q. M. R. (2021). Current update on intrinsic and acquired colistin resistance mechanisms in bacteria. *Frontiers in medicine*, 8, 677720.
- [21]. Guenther, S., Falgenhauer, L., Semmler, T., Imirzalioglu, C., Chakraborty, T., Roesler, U., & Roschanski, N. (2017). Environmental emission of multiresistant *Escherichia coli* carrying the colistin resistance gene *mcr-1* from German swine farms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(5), 1289-1292.
- [22]. Kawahara, R., Fujiya, Y., Yamaguchi, T., Khong, D. T., Nguyen, T. N., Tran, H. T., & Yamamoto, Y. (2019). Most domestic livestock possess colistin-resistant commensal *Escherichia coli* harboring *mcr* in a rural community in Vietnam. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(6), 10-1128.

- [23]. Kempf, I., Jouy, E., & Chauvin, C. (2016). Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. *International journal of antimicrobial agents*, 48(6), 598-606.
- [24]. Lei, L., Wang, Y., Schwarz, S., Walsh, T. R., Ou, Y., Wu, Y., ... & Shen, Z. (2017). mcr-1 in Enterobacteriaceae from companion animals, Beijing, China, 2012–2016. *Emerging infectious diseases*, 23(4), 710.
- [25]. Lei, L., Wang, Y., He, J., Cai, C., Liu, Q., Yang, D., ... & Zhong, Y. (2021). Prevalence and risk analysis of mobile colistin resistance and extended-spectrum β -lactamase genes carriage in pet dogs and their owners: a population based cross-sectional study. *Emerging Microbes & Infections*, 10(1), 242-251.
- [26]. Liu, H., Wang, Y., Wang, G., Xing, Q., Shao, L., Dong, X., ... & Ma, L. (2015). The prevalence of *Escherichia coli* strains with extended spectrum beta-lactamases isolated in China. *Frontiers in microbiology*, 6, 335.
- [27]. 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 diseases*, 16(2), 161-168.
- [28]. Luo, Q., Wang, Y., & Xiao, Y. (2020). Prevalence and transmission of mobilized colistin resistance (mcr) gene in bacteria common to animals and humans. *Biosafety and Health*, 2(2), 71-78.
- [29]. Ma, S., Sun, C., Hulth, A., Li, J., Nilsson, L. E., Zhou, Y., ... & Wang, Y. (2018). Mobile colistin resistance gene mcr-5 in porcine *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(7), 1777-1780.
- [30]. Matthew E., Falagas, M. E., Kasiakou, S. K., & Saravolatz, L. D. (2005). Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clinical infectious diseases*, 40(9), 1333-1341.
- [31]. McPhee, J. B., Lewenza, S., & Hancock, R. E. (2003). Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology*, 50(1), 205-217.
- [32]. da Silva, J. M., Frosini, S. M., Loeffler, A., Weese, S., Perreten, V., ... & Pomba, C. (2022). mcr-1 colistin resistance gene sharing between *Escherichia coli* from cohabiting dogs and humans, Lisbon, Portugal, 2018 to 2020. *Eurosurveillance*, 27(44), 2101144.
- [33]. Mohapatra, S. S., Dwibedy, S. K., & Padhy, I. (2021). Polymyxins, the last-resort antibiotics: Mode of action, resistance emergence, and potential solutions. *Journal of biosciences*, 46(3), 85.
- [34]. Moon, D. C., Mechesso, A. F., Kang, H. Y., Kim, S. J., Choi, J. H., Kim, M. H., ... & Lim, S. K. (2020). First report of an *Escherichia coli* strain carrying the colistin resistance determinant mcr-1 from a dog in South Korea. *Antibiotics*, 9(11), 768.
- [35]. Mulvey, M. R., Mataseje, L. F., Robertson, J., Nash, J. H., Boerlin, P., Toye, B., ... & Melano, R. G. (2016). Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(3), 289-290.

- [36]. Nang, S. C., Azad, M. A., Velkov, T., Zhou, Q. T., & Li, J. (2021). Rescuing the last-line polymyxins: achievements and challenges. *Pharmacological reviews*, 73(2), 679-728.
- [37]. Nation, R. L., Garonzik, S. M., Thamlikitkul, V., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Forrest, A., Paterson, D. L., ... & Silveira, F. P. (2017). Dosing guidance for intravenous colistin in critically ill patients. *Clinical Infectious Diseases*, 64(5), 565-571.
- [38]. Ngbede, E. O., Poudel, A., Kalalah, A., Yang, Y., Adekanmbi, F., Adikwu, A. A., ... & Wang, C. (2020). Identification of mobile colistin resistance genes (*mcr*-1.1, *mcr*-5 and *mcr*-8.1) in Enterobacteriaceae and *Alcaligenes faecalis* of human and animal origin, Nigeria. *International journal of antimicrobial agents*, 56(3), 106108.
- [39]. Nguyen, P. T. L., Tran, H. T. M., Tran, H. A., Pham, T. D., Luong, T. M., Nguyen, T. H., ... & Tran, H. H. (2022). Carriage of plasmid-mediated colistin Resistance-1-Positive *Escherichia coli* in humans, animals, and environment on farms in Vietnam. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 107(1), 65-71.
- [40]. Nordmann, P., Jayol, A., & Poirel, L. (2016). Rapid detection of polymyxin resistance in Enterobacteriaceae. *Emerging infectious diseases*, 22(6), 1038.
- [41]. Norris, J. M., Zhuo, A., Govendir, M., Rowbotham, S. J., Labbate, M., Degeling, C., ... & Ward, M. P. (2019). Factors influencing the behaviour and perceptions of Australian veterinarians towards antibiotic use and antimicrobial resistance. *PloS one*, 14(10), e0223534.
- [42]. Olaitan, A. O., Morand, S., & Rolain, J. M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in microbiology*, 5, 116005.
- [43]. Ortega-Paredes, D., Haro, M., Leoro-Garzón, P., Barba, P., Loaiza, K., Mora, F., ... & Fernández-Moreira, E. (2019). Multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from canine faeces in a public park in Quito, Ecuador. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 18, 263-268.
- [44]. Pathak, A., Singh, S., Kumar, A., & Prasad, K. N. (2020). Emergence of chromosome borne colistin resistance gene, *mcr*-1 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Infectious Diseases*, 101, 22.
- [45]. Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., Friis, C., Jones, R., ... & Waddell, J. (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 53(1), 28-52.
- [46]. Rapoport, M., Faccone, D., Pasteran, F., Ceriana, P., Albornoz, E., Petroni, A., ... & Corso, A. (2016). First description of *mcr*-1-mediated colistin resistance in human infections caused by *Escherichia coli* in Latin America. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(7), 4412-4413.
- [47]. Rhouma, M., Madec, J. Y., & Laxminarayan, R. (2023). Colistin: From the shadows to a One Health approach for addressing antimicrobial resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 106713.
- [48]. Robinson, T. P., Bu, D. P., Carrique-Mas, J., Fèvre, E. M., Gilbert, M., Grace, D., ... & Woolhouse, M. E. (2016). Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 110(7), 377-380.

- [49]. Rumi, M. V., Mas, J., Elena, A., Cerdeira, L., Muñoz, M. E., Lincopan, N., ... & Gutkind, G. (2019). Co-occurrence of clinically relevant β -lactamases and MCR-1 encoding genes in *Escherichia coli* from companion animals in Argentina. *Veterinary microbiology*, 230, 228-234.
- [50]. Scott, A. M., Beller, E., Glasziou, P., Clark, J., Ranakusuma, R. W., Byambasuren, O., ... & Del Mar, C. (2018). Is antimicrobial administration to food animals a direct threat to human health? A rapid systematic review. *International journal of antimicrobial agents*, 52(3), 316-323.
- [51]. Sezener, M. G., Findik, A., Ergüden, V. E., Gülhan, T., Çiftci, A., &Boynukara, B. (2022). Colistin resistance profiles and genotypes of *Escherichia coli* isolates from dogs and cats. *Acta Scientiae Veterinariae*, 50.
- [52]. Simmen, S., Zurfluh, K., Nüesch-Inderbinnen, M., & Schmitt, S. (2016). Investigation for the colistin resistance genes mcr-1 and mcr-2 in clinical Enterobacteriaceae isolates from cats and dogs in Switzerland. *ARC Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2(5), 26-29.
- [53]. Simonsen, G. S., &Urdahl, A. M. (2017). NORM/NORM-VET 2016-Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway.
- [54]. Singleton, D. A., Pongchaikul, P., Smith, S., Bengtsson, R. J., Baker, K., Timofte, D., ... & Williams, N. J. (2021). Temporal, spatial, and genomic analyses of Enterobacteriaceae clinical antimicrobial resistance in companion animals reveals phenotypes and genotypes of One Health concern. *Frontiers in Microbiology*, 12, 700698.
- [55]. Skov, R. L., & Monnet, D. L. (2016). Plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1 gene): three months later, the story unfolds. *Eurosurveillance*, 21(9), 30155.
- [56]. Swedres-Svarm, S. S. (2015). Consumption of antibiotics and occurrence of antibiotic resistance in Sweden.
- [57]. Wang, X., Wang, Y., Zhou, Y., Li, J., Yin, W., Wang, S., ... & Wang, Y. (2018). Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, mcr-8, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerging microbes & infections*, 7(1), 1-9.
- [58]. Wang, C., Feng, Y., Liu, L., Wei, L., Kang, M., &Zong, Z. (2020). Identification of novel mobile colistin resistance gene mcr-10. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 508-516.
- [59]. Wang, J., Huang, X. Y., Xia, Y. B., Guo, Z. W., Ma, Z. B., Yi, M. Y., ... & Liu, J. H. (2018). Clonal spread of *Escherichia coli* ST93 carrying mcr-1-harboring IncN1-IncHI2/ST3 plasmid among companion animals, China. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2989.
- [60]. Wassenaar, T. M., &Silley, P. (2008). Antimicrobial resistance in zoonotic bacteria: lessons learned from host-specific pathogens. *Animal Health Research Reviews*, 9(2), 177-186.
- [61]. Watkins, R. R. (2016). Overview:Global and Local Impact of Antibiotic Resistance Antibiotic resistance Infections Agriculture Public health. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(2), 313–322.
- [62]. Werner, G., Coque, T. M., Franz, C. M., Grohmann, E., Hegstad, K., Jensen, L., ... & Weaver, K. (2013). Antibiotic resistant enterococci—Tales of a drug resistance gene trafficker. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6-7), 360-379.

- [63]. WHO (2015). Global antimicrobial resistance surveillance system: manual for early implementation. Geneva: World Health Organization.
- [64]. Xavier, B. B., Lammens, C., Ruhal, R., Kumar-Singh, S., Butaye, P., Goossens, H., & Malhotra-Kumar, S. (2016). Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Eurosurveillance*, 21(27), 30280.
- [65]. Yahav, D., Farbman, L., Leibovici, L., & Paul, M. (2012). Colistin: new lessons on an old antibiotic. *Clinical microbiology and infection*, 18(1), 18-29.
- [66]. Zankari, E., Hasman, H., Kaas, R. S., Seyfarth, A. M., Agersø, Y., Lund, O., ... & Aarestrup, F. M. (2013). Genotyping using whole-genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 68(4), 771-777.
- [67]. Zhang, H., Hou, M., Xu, Y., Srinivas, S., Huang, M., Liu, L., & Feng, Y. (2019). Action and mechanism of the colistin resistance enzyme MCR-4. *Communications Biology*, 2: 36.
- [68]. Zheng, H. H., Yu, C., Tang, X. Y., Du, C. T., & Xie, G. H. (2023). Isolation, Identification and Antimicrobial Resistance Analysis of Canine Oral and Intestinal *Escherichia coli* Resistant to Colistin. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(17), 13428.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

Amina FARZALIZADE (1).docx

ORJİNALLİK RAPORU

% 13	% 12	% 5	% 5
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 6
2	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	% 1
3	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 1
4	pure.ulster.ac.uk İnternet Kaynağı	% 1
5	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	wwwnc.cdc.gov İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA BIBLIOTECA Öğrenci Ödevi	<% 1
8	9lib.net İnternet Kaynağı	<% 1
9	apps.who.int	

ETİK KURUL İZİN YAZISI

Uyarı: Canlı denekler üzerinde yapılan tüm araştırmalar için Etik Kurul Belgesi alınması zorunludur.

☒ Etik Kurul izni gerekmektedir.

☐ Etik Kurul izni gerekmemektedir.

Amina FARZALIZADE
(İmza)



KURUM İZNİ YAZILARI

Uyarı: Canlı ve cansız deneklerle yapılan tüm çalışmalar için kurum izin belgelerinin eklenmesi zorunludur. Gizlilik ve mahremiyet içeren durumlarda kurum adı kapatılmalıdır.

☐ Kurum izni gerekmektedir.

☒ Kurum izni gerekmemektedir.

Amina FARZALIZADE
(İmza)

