TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KÖPEKLERDE OTİTİS EKSTERNAYA NEDEN OLAN BAKTERİYEL ETKENLERİN BELİRLENMESİ VE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİK GEN PROFİLİNİN ARAŞTIRILMASI

Fatma Esra TOTAN

VETERİNER FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ

ANKARA
2024

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KÖPEKLERDE OTİTİS EKSTERNAYA NEDEN OLAN BAKTERİYEL ETKENLERİN BELİRLENMESİ VE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİK GEN PROFİLİNİN ARAŞTIRILMASI

Fatma Esra TOTAN

VETERİNER FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2022-2480 nolu proje kapsamında desteklenmiştir

ANKARA
2024

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum "*Köpeklerde Otitis Eksternaya Neden Olan Bakteriyel Etkenlerin Belirlenmesi ve Antibiyotik Dirençlilik Gen Profilinin Araştırılması*" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Fatma Esra TOTAN

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Farmakoloji ve Toksikolojisi Anabilim Dalında
Fatma Esra TOTAN tarafından hazırlanan
"*Köpeklerde Otitis Eksternaya Neden Olan Bakteriyel Etkenlerin Belirlenmesi ve Antibiyotik Dirençlilik Gen Profilinin Araştırılması*" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza
Prof. Dr. Gülçin AKCA
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ
Ankara Üniversitesi
Raportör

İmza
Prof. Dr. Ufuk Tansel ŞİRELİ
Ankara Üniversitesi
Üye

İmza
Prof. Dr. Begüm YURDAKÖK-DİKMEN
Ankara Üniversitesi
Üye

İmza
Doç. Dr. Özgür KUZUKIRAN
Çankırı Karatekin Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Köpeklerde Otitis Eksternaya Neden Olan Bakteriyel Etkenlerin Belirlenmesi ve Antibiyotik Dirençlilik Gen Profilinin Araştırılması

Köpeklerde otitis eksternaya sebep olan bakterileri tespit etmek ve bunların dirençlilik profillerini ortaya çıkartarak hayvan ve insan sağlığını tehdit eden dirençlilik genlerinin araştırılması amaçlandı. Ankara'da pet hayvanları sağlığı merkezlerinden toplanan Otitis extrerna şüpheli toplam 25 köpeğin iki kulağından sürüntü örnekleri alındı. Örnekler hızla nutrient agar, %5 defibrine koyun kanlı agarı ve MacConkey laktoz agar üzerine inoküle edilip bir gece 37°C'de inkübe edildi ve taze %5 koyun kanlı agarda alt kültüre tabi tutularak saflaştırıldı. Koloni morfolojisi, Gram boyama, katalaz ve oksidaz testleri temel alınarak bakteri izolatları cins düzeyine kadar tanımlandı. İzole bakterilerin antibiyotik duyarlılık testleri 40 farklı antibiyotik diski kullanılarak disk difüzyonla yapıldı. Suşlar ilaca duyarlı, ara duyarlı veya dirençli olarak sınıflandırıldı ve rapor edildi. Bazı direnç genleri primerleri kullanılarak saflaştırılan koloniler PCR ile analiz edilip çoklu dirençlilik durumları belirlendi. Analizi yapılan genler; kolistin için, *mcr*-1, *mcr*-2, *mcr*-3, *mcr-4* ve *mcr-5* genleri, vankomisin için *van-A* ve *van-B* genleri, imipenem için *IMIP* geni ($_{bla}$*IMP*), seftriakson için *penA* geni, siprofloksasin için *Gyr-A, Gyr-B* genleri, metisilin için *Mec-A,* sefepim için *Amp-C,* amoksisilin klavulanik asit için *OXA-1* geni olarak belirlendi. Antibiyogram ve bakteriyolojik analizlerde elde edilen sonuçlarda en fazla; *Enterococcus spp, Staphylococcus spp., Streptococcus spp.* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakteri türleri izole edildi. Bu numunelerden *Enterobacter spp*. 5 hastada, *Streptococcus spp*. 3 hastada, *S. epidermidis* 6 hastada, *S. aureus* 7 hastada, *P. aeruginosa* 4 hastada izole edildi. Yapılan PCR analizlerinde, hiçbir örnekte $_{bla}$*IMP, mcr-2* ve *Van- A* genleri tespit edilemezken diğer tüm genler her örnekte en az 3 en fazla 12 adet tespit edildi. Böylece mevcut araştırmadan köpeklerde otitis eksternaya neden olan ve hijyen koşullarına paralel olarak her ülkede farklı olması muhtemel patojenler belirlenerek klinik vakaların hangi antibiyotiklerle tedavi edilebileceği belirlenmiş ayrıca hayvanlardan insanlara veya insanlardan hayvanlara geçebilen direnç genleri konusunda bilgi sahibi olunmuştur. Sonuç olarak AMR ile mücadele etmek için "Tek Sağlık" yaklaşımını (insan, hayvan, bitki ve çevre sağlığı) desteklemek önemlidir.

Anahtar Sözcükler: Antimikrobiyal Direnç, Köpek, Kulak Sıvabı, Otitis Eksterna, Tek Sağlık

SUMMARY

Determination of Bacterial Factors Causing Otitis Externa in Dogs and Investigation of Antibiotic Resistance Gene Profile

The aim of this study was to identify the bacteria causing otitis externa in dogs and to investigate the resistance genes that threaten animal and human health by revealing their resistance profiles. Swab samples were taken from two ears of 25 dogs with suspected otitis externa collected from pet health centers in Ankara. The samples were rapidly inoculated on nutrient agar, 5% defibrinated sheep blood agar and MacConkey lactose agar, incubated overnight at 37°C and purified by subculturing on fresh 5% sheep blood agar. Bacterial isolates were identified at genus level based on colony morphology, Gram staining, catalase and oxidase tests. Antibiotic susceptibility tests of isolated bacteria were performed by disk diffusion using 40 different antibiotic disks. The strains were classified as susceptible, intermediate susceptible or resistant to the drug and reported. Colonies purified using some resistance genes primers were analyzed by PCR and their multi-resistance status was determined. The genes analyzed were mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 genes for colistin, van-A and van-B genes for vancomycin, IMIP gene (blaIMP) for imipenem, penA gene for ceftriaxone, Gyr-A, Gyr-B genes for ciprofloxacin, Mec-A gene for methicillin, Amp-C gene for cefepime and OXA-1 gene for amoxicillin clavulanic acid. In the results obtained from antibiogram and bacteriological analysis, *Enterococcus spp*., *Staphylococcus spp*., *Streptococcus spp*. and *Pseudomonas aeruginosa* bacterial species were isolated the most. Enterobacter *spp*. was isolated in 5 patients, *Streptococcus spp*. in 3 patients, *S. epidermidis* in 6 patients, *S. aureus* in 7 patients and P. aeruginosa in 4 patients. In PCR analyses, *blaIMP*, *mcr-2* and *Van- A* genes were not detected in any sample, while all other genes were detected at least 3 and at most 12 in each sample. Thus, from the present study, the pathogens that cause otitis externa in dogs, which are likely to be different in each country in parallel with the hygiene conditions, have been determined and the antibiotics with which clinical cases can be treated have been chosen, and information has been obtained about the resistance genes that can be passed from animals to humans or from humans to animals. In conclusion, it is important to promote a "One Health" approach (human, animal, plant and environmental health) to combat AMR.

Keywords: Antimicrobial Resistance, Dog, Ear Swab, One Health, Otitis Externa

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Otitis Eksternada En Sık İzole Edilen Bakteri Türleri ve Dirençlilikleri	2
1.1.1. Kolistin Direçliliği	3
1.1.2. Vankomisin Dirençliliği	5
1.1.3. İmipenem Dirençliliği	7
1.1.4. Seftriakson Dirençliliği	8
1.1.5. Siprofloksasin Dirençliliği	9
1.1.6. Metisilin Dirençliliği	10
1.1.7. Sefepim Dirençliliği	12
1.1.8. Amoksisilin Klavulanik Asit Dirençliliği	13
1.2. Çalışmanın Amacı ve Önemi	14
2. GEREÇ VE YÖNTEM	16
2.1. Numunelerin Toplanması	16
2.2. Örneklerin Saklanması ve Taşınması	16
2.3. Bakteriyolojik İnceleme	17
2.4. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	17
2.5. Direnç Genlerinin Belirlenmesi	19
3. BULGULAR	23
4. TARTIŞMA	31
5. SONUÇ	39
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	48

ÖNSÖZ

Son yıllarda, enfeksiyon hastalıklarının tedavisindeki başarısızlıklarla ilişkilendirilen insan veya hayvan tıbbında antimikrobiyal direnç sorunu hakkında büyük bir endişe vardır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından antimikrobiyal direnç; mikroorganizmaların (bakteri, mantar, virüs ve parazit gibi) antimikrobiyal ilaçlara (antibiyotik, antifungal, antiviral ve antelmentik gibi) maruz kaldıklarında değişmesi olarak tanımlanır. İnsanlarda ve hayvanlarda antimikrobiyal ajanların yüksek kullanımı, bu durumun temel sebebi olarak gösterilmektedir. Mikroorganizmalar, onu ortadan kaldırmayı hedefleyen antimikrobiyal tedaviye karşı direnç gösterir ve varlığını sürdürebilir. Sonuç olarak ilaçlar etkisiz hale gelerek, enfeksiyon diğer sağlıklı hayvanlara yayılmaya devam eder. Bu gelişen yeni direnç mekanizmaları küresel olarak yayılmakta ve tedavi etkinliğini tehdit etmektedir. Bu da uzun süreli hastalıklarla ve ölümle sonuçlanabilmektedir. 2050 yılında beklenen antimikrobiyal dirence bağlı ölüm sayısı 10 milyon olarak belirtilmiştir. Antimikrobiyal direnç; hayvan ve halk sağlığını tehdit eden en önemli konulardan biri haline gelmiş ve bu konu üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. Pet hayvanlarının yaygınlaşması ve evde yaşam oranlarının artması ile pet sahiplerine dirençli mikroorganizmaların aktarılabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Her 20 köpekten birinde görülen otitis eksterna vakalarından izole edilen bakterilerin çoğunun antibakteriyellere karşı dirençli olduğu bilinmektedir. Bu doktora tezinin amacı; köpeklerde otitis eksternaya sebep olan bakterileri tespit ederek bunların dirençlilik profillerini ortaya çıkartmak, hayvan ve insan sağlığını tehdit eden direnç genlerinin tespitini yapmak ve tedavi önerileri sunmaktır.

Dirençlilik genlerinin tespit edilmesi ile bu genlerin aktarımının ne düzeyde olacağı değerlendirilecek ve böylece kullanılmaması gereken antimikrobiyallerin tespiti yapılabilecektir.

Tezin gerçekleştirilmesinde bilimsel katkılarını, desteklerini ve deneyimlerini esirgemeden, her adımda beni doğruya yönlendiren başta Danışmanım Sayın Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ'ye, doktora öğrenimim boyunca destek ve katkılarından dolayı Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim üyelerine ve Araştırma Görevlisi Sayın Sedat SEVİN'e, destekleri ve yönlendirmeleri için Çankırı Karatekin Üniversitesi Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Özgür KUZUKIRAN'a teşekkürlerimi saygılarımla sunarım. Tez çalışmamda uygun laboratuvar ortamını bana sağladıkları için DİAGEN Biyoteknolojik Sistemler Sağlık Hizmetleri ve Otomasyonu San. Tic. A.Ş'ne teşekkür ederim.

Konuşmalarıyla beni yüreklendiren, çalışmam boyunca yanımda olup bana destek olan aileme minnet ve sevgiyle teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMEG	Antimicrobial Advice Ad Hoc Expert Group
AMP-C	Ampicillin-Resistance Gene Group C
ARG	Antimicrobial Resistance Gene
BLAIMP	Betalaktamaz İmipenemaz
Ca	Kalsiyum
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
LPX-A	Lipoprotein X A
CRAB	Karbapenem Dirençli *Acinetobacter baumannii*
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EMB	Eozin Metilen Blue Agar
ESKAPE	*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter* türleri
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GYR-A	Jiraz A
IRPA	İmipenem Dirençli *Pseudomonas aeruginosa*
L-ARA4N	4-amino-4-deoksi- L -arabinoz
LPSC	Lipopolisakkarit
MBL	Metallo-Betalaktamaz
MCR	Mobil Kolistin Direnci
Mg	Magnezyum
MIC	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MLA	Macconkey Laktoz Agar
MRSA	Metisiline Dirençli *S. aureus*
MRSP	Metisiline Dirençli *S. pseudintermedius*
MSSA	Metisiline Duyarlı *S. aureus*
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OMP-F	*Escherichia coli* Dış Zar Proteini F
OprD	Dış Zar Proteini D
OXA-1	Oksasilin-Hidrolize Edici Enzim 1
PBP	Penisilin Bağlayıcı Protein
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEN-A	Penisilin Bağlayıcı Protein Geni
PEtN	Fosfoetonalamin

PMQR	Plazmid Aracılı Kinolon Direnci
PMR-C	Lipid A Fosfoetanolamin Transferaz Geni
QRDR	Kinolon Direnci Belirleyen Bölge
SCC	Stafilokokal Kaset Kromozom
SHV	Sülfhidril Reaktif Değişkeni
USA	United States of America
VAN-A	Vankomisin Direnç Geni A
VRE	Vankomisine Dirençli Enterococcus

ŞEKİLLER

Şekil 3.1. İzole edilen bakteriler ve oranları 23

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Köpeklerin dış kulak enfeksiyonlarında izole edilen bakterilerin duyarlılığını tespit etmek için kullanılan antibakteriyeller 18

Çizelge 2.2. AMEG kategorizasyonunun özeti 21

Çizelge 2.3. Real-time qPCR standartlarını üretmek için kullanılan primerler 22

Çizelge 3.1. İzole edilen baskın bakteri sayıları ve oranları 23

Çizelge 3.2. Numune alınan köpek ırkları, özellikleri, baskın bakteri türü ve tespit edilen antibiyotik direnç genleri 24

Çizelge 3.3. 25 hastadan alınan örneklerin 40 adet antibiyotik için direnç ve duyarlıkları 26

Çizelge 3.4. İzole edilen bakteri gruplarının taşıdığı direnç genleri ve ilgili antibiyotiklere karşı dirençlilik/duyarlılık oranları 30

1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü tarafından antimikrobiyal direnç (AMR); mikroorganizmaların (bakteri, mantar, virüs ve parazit gibi) antimikrobiyal ilaçlara (antibiyotik, antifungal, antiviral ve antihelmintik gibi) maruz kaldıklarında değişmesi olarak tanımlanmıştır. Mikroorganizmaların, onu ortadan kaldırmayı hedefleyen antimikrobiyal tedaviye karşı direnç gösterdiği ve varlığını sürdürebildiği belirtilmiştir. Sonuç olarak ilaçların etkisiz hale gelerek enfeksiyonların diğer sağlıklı canlılara yayılmaya devam edeceği ifade edilmiştir. Bu gelişen yeni direnç mekanizmalarının küresel olarak yayılmakta olduğu ve tedavi etkinliğini tehdit ettiği ifade edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün tahminlerine göre antibiyotiklerin bilinçsizce kullanılmasının devam etmesi durumunda 2050 yılında antimikrobiyal dirence bağlı ölüm sayısının 10 milyona ulaşması beklenmektedir (WHO, 2021).

Başta köpekler ve kediler olmak üzere evcil hayvanların, insanlarla yakın temasları ve geniş spektrumlu antimikrobiyal ajanlar tarafından yaygın bir şekilde tedavi edilmeleri nedeniyle potansiyel bir AMR rezervuarı olarak kabul edilmeye başlandığı görülmektedir (Guardabassi vd., 2004). AMR'in evcil hayvanlardan insanlara bulaşabilmesi ve evcil hayvanlar arasında çoklu ilaca dirençli (MDR) bakterilerin olması hem hayvanlarda hem de insanlarda antimikrobiyal tedavi başarısızlığı riskini oldukça arttıracağı beklenmektedir. Bu nedenle, başta köpekler ve kediler olmak üzere evcil hayvanlar arasında AMR prevalansının anlaşılmasının hem veteriner hekimlik hem de insan tıbbı perspektiflerinden talep edildiği ifade edilmiştir (Li vd., 2021). Bununla birlikte, klinik vakaların her zaman tam olarak kaydedilmemesi ve izlenmemesi, evcil hayvanların AMR'si ile ilgili mevcut verilerin az olduğu belirtilmiştir.

Köpeklerde en sık karşılaşılan enfeksiyonlar arasında dış kulak enfeksiyonlarının yer aldığı bildirilmiştir (Li vd., 2021). Dış kulak kanalının anatomik yapısının enfeksiyon oluşturma olasılığını arttırması nedeniyle bunun predispoze faktör olduğu kabul edilmektedir (Paterson vd., 2016). Bunun gibi birçok predispoze faktörün yanı sıra, sekonder bakteriyel enfeksiyonlar, yabancı cisim vakaları, fungal etmenler kulak hastalıklarının başında sayılabilecek etkenler olarak belirtilmiştir (Lyskova vd., 2007). Otitis eksternaya *Staphylococcus intermedius, Staphylococcus aureus, Streptococcus spp., Proteus spp., Pseudomonas spp., Klebsiella spp., Escherichia coli* gibi birçok bakteri yol açmasına

rağmen, *Malassezia* sp. ve *Candida* sp. gibi mayaların da sıklıkla izole edildiği bildirilmiştir (De Martino vd., 2016).

1.1. Otitis Eksternada En Sık İzole Edilen Bakteri Türleri ve Dirençlilikleri

Yapılan bazı çalışmalarda, köpeklerden izole edilen en yaygın kulak patojenlerinin, koagülaz pozitif staphylococlar (*S. pseudintermedius*) ve *P. aeruginosa* olduğu belirtilmiştir (Parasana vd., 2023). Buna karşılık, Fransa'da yapılan bir araştırmada, köpek otitisinin başlıca etkenlerinin koagülaz pozitif stafilokoklar, *P. aeruginosa, P. mirabilis* ve streptococcuslar olduğu gösterilmiştir (Bourél vd., 2019). İspanya'da yapılan bir çalışmaya göre; *S. pseudintermedius, P. aeruginosa* ve *E. coli*'nin köpek otitis örneklerinden sıklıkla izole edilmiş olduğu ve *S. pseudintermedius* ve *P. aeruginosa* izolatları için benzer oranlarda florokinolonlar ve gentamisine dirençli oldukları belirtilmiştir (<%20). Bu arada, *P. aeruginosa* izolatlarının köpeklerde penisilin ve sefalosporin sınıfları, trimetoprim/sülfametoksazol, fenikoller ve fosfomisine karşı yüksek düzeyde direnç gösterdiği ifade edilmiştir (Li vd., 2021). Anılan son çalışmada, *S. pseudintermedius, P. aeruginosa* ve *E. coli*'nin köpek otitis örneklerinden sıklıkla izole edilmiş olduğu ve *S. pseudintermedius* ve *P. aeruginosa* izolatları için benzer yüzdelerde florokinolonlar ve gentamisine dirençli oldukları belirtilmiştir (<%20). *P. aeruginosa* izolatlarının hem köpeklerde hem de kedilerde beta laktamlar, trimetoprim/sülfametoksazol, fenikoller ve fosfomisine karşı yüksek düzeyde direnç gösterdiği ifade edilmiştir. *Pseudomonas spp*.'nin normalde beta-laktamlara, β-laktamaz inhibitörlerine, kloramfenikole, eritromisine ve trimetoprim/sülfametoksazole dirençliyken aminoglikozitlere oldukça duyarlı olduğu bildirilmiştir (>%95). Bunun yanı sıra, enrofloksasin direnç frekansı köpeklerde %27 bulunmuş ve bunun Kanada'da yapılan bir başka çalışmanın (Awosile vd., 2018) verilerine göre daha düşük bulunduğu ifade edilmiştir (Li vd., 2021). Hindistan'da yapılan bir çalışmada izole edilen 65 bakteri arasında en çok *Staphylococcus spp.*'nin (%53,84) izole edildiği, bunu *Streptococcus spp*. (%18,46), *Pseudomonas spp.* (%12,30), *Proteus spp*. (%7,69) ve *E. coli* 'nin (%6,15) takip ettiği gösterilmiştir. Yapılan birçok çalışmada direnç oluşmasına neden olan bazı genler de araştırılmıştır. Brezilya'da yapılan bir çalışmada *P. aeruginosa*'nın, köpeklerin otit ve piyodermasında sıklıkla yer alan fırsatçı bir patojen olduğu, intrinsik ve kazanılmış mekanizmalar nedeniyle antimikrobiyallere dirençli olduğu ifade edilmiştir (Lin vd., 2012). Yatay olarak kazanılan direncin, plazmitler, transpozonlar veya integronlar gibi mobil genetik elementlerin edinilmesiyle meydana gelebileceği belirtilmiştir (Strateva vd., 2009). İntegronların, değişken uzunlukta bir segment ve direnç

belirleyicileri taşıyan bir dizi ile ayrılmış iki korunmuş segmentten oluştuğu bilinmektedir. Günümüzde sınıf 1, 2 ve 3 integronlarının tanındığı belirtilmiştir. Direnç integronlarının çoğu, insan kaynaklı izolatlar arasında en sık görülen ve köpeklerden elde edilen *P. aeruginosa* ve *E. coli* izolatlarında bulunan sınıf 1'e ait olduğu ifade edilmiştir (Rubin vd., 2008). *P. aeruginosa* suşlarında direnç gelişiminde iki ana mekanizmanın tanımlandığı belirtilmiştir. Bunların; aktif akış pompası ile yapısal kromozomal DNA giraz (*gyrA, gyrB*) ve topoizomeraz IV'teki (*parC* ve *parE*) nokta mutasyonlarına bağlı olarak hedef enzimlerdeki değişiklikler olabileceği ve g*yrA* ve *gyrB* genlerindeki mutasyonların, enzim aktif bölgesinin yakınında bir kinolon direnci belirleyici bölgesinde (QRDR) meydana geldiği bildirilmiştir (Hooper vd., 2000). Polimiksin grubu antibiyotiklerin de dış kulak yolu enfeksiyonlarında kullanıldığı ve Gram-negatif bakterilerin dış zarındaki lipopolisakkaritler (LPS) ve fosfolipidler ile etkileşime girdikleri belirtilmiştir. Veteriner hekimlikte kolistinin (polimiksin E) çiftlik hayvanlarında gastrointestinal enfeksiyonların tedavisi için düzenli olarak kullanıldığı, polimiksin B'nin ise küçük hayvanlarda orta kulak iltihabı ve deri enfeksiyonlarının tedavisi için topikal olarak uygulandığı kaydedilmiştir (Catry vd., 2015). İnsan tıbbında ise kolistinin, çoklu ilaca dirençli (MDR) bakterilerin neden olduğu yaşamı tehdit eden enfeksiyonların tedavisinde son çare antimikrobiyallerden biri haline geldiği ve Enterobacteriaceae'de plazmit aracılı polimiksin direncinin ortaya çıkması durumunda, kullanımının ciddi şekilde tehlikeye düşebileceği ifade edilmiştir (Schwarz vd., 2016). Çin'de 2015 yılında ilk olarak tanımlanmasından bu yana, kolistin direnç geni *mcr-1* dünya çapında insanlardan, gıda üreten hayvanlardan ve gıdalardan elde edilen izolatlarda rapor edilmektedir (Liu vd., 2016). Ayrıca, Belçika'da çiftlik hayvanları ile ilişkili *E. coli*'de yeni bir varyant olan *mcr-2* tespit edildiği bildirilmiştir (Xavier vd., 2016). Daha sonra yapılan çalışmalarda ise *mcr-3, mcr-4* ve *mcr-5* genlerinin *E. coli, Salmonella sp.* ve *P. aeruginosa* suşlarına karşı kolistin direnci araştırmalarında tespit edilmiştir (Borowiak vd., 2020; Ma vd., 2018). Otitis eksternalı köpeklerden elde edilen izolatlardan *P. aeruginosa*'da imipenem antibiyotiğine karşı yüksek duyarlılık bulunduğu belirtilmişse de herhangi bir gen çalışılmadığı görülmektedir (Silva-Tarouca vd., 2019).

1.1.1. Kolistin Dirençliliği

Kolistin (polimiksin E), 1947'de geliştirilen ve ilk kez 1959'da insan tıbbında kullanılan, ancak nefrotoksik ve nörotoksik etkileri nedeniyle 1980'lerde terk edilen katyonik bir antimikrobiyal peptit olarak bilinmektedir. Ancak güçlü bir molekül olan kolistinin, çoklu ilaca dirençli Gram-negatif bakterilerin özellikle de karbapenemlere dirençli olanların ortaya

çıkması nedeniyle yeniden gündeme geldiği bilinmektedir. Kolistinin, pnömoni de dahil olmak üzere çoklu ilaca dirençli Gram negatif enfeksiyonlar için son çare tedavi olarak kullanılan bir antibiyotik olduğu belirtilmiştir (Pogue vd., 2017). Kolistinin, veteriner hekimlikte uzun yıllardır, özellikle Enterobacteriaceae enfeksiyonlarının önlenmesi ve tedavisi için kullanıldığı bilinmektedir. Bununla birlikte, kolistine duyarlılık analizini engelleyen metodolojik zorluklar olduğundan, hayvanlardan ve hayvansal gıdalardan elde edilen bakterilerde kolistin direncine ilişkin verilerin nispeten az olduğu belirtilmiştir (Catry vd., 2015). Almanya'da 2017 ve 2018 yılları arasında evcil hayvan kliniklerinde toplamda tahmini 29,9 ton antimikrobiyal ilaç kullanıldığı ve bu toplamın %1'inden azının yıllık polipeptit (kolistin) tüketimini temsil ettiği ifade edilmiştir (Makita vd., 2021). Bir çalışmada sadece bir hayvan hastanesinde 2017 ve 2018'de köpeklerde ve kedilerde kullanılan toplam polimiksin oranının diğer antimikrobiyallerin %0,06 ve %0,13'üne karşılık geldiği bildirilmiştir (Schnepf vd., 2021).

Gram-negatif bakterilerin dış Lipopolisakkarit (LPS) katmanının, onları antibiyotikler de dahil olmak üzere zararlı bileşiklerden koruduğu ve spesifik bir lipit kısmı olan Lipid A'nın, Gram-negatif bakterilerin LPS'sine yüzey koruması görevi gördüğü ifade edilmiştir. Ayrıca kolistin, elektrostatik etkileşimle LPS katmanının anyonik lipid A'sına bağlanan ve Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının yerini alan polipeptit katyonik yapısında bir antibiyotik olarak tanımlanmıştır. Bu durumun; dış zarın parçalanmasına, geçirgenleşmesine ve ardından hücre bileşenlerinin sızmasına ve sonunda bakterinin ölümüne yol açtığı belirtilmiştir. Kolistine direncin farklı mekanizmalarla meydana geldiği ve en yaygın olanının fosfoetanolamin (PEtN) veya bir 4-amino-4-deoksi- L -arabinoz (L-Ara4N) molekülünün eklenmesiyle lipid A bileşeninin modifikasyonu olduğu belirtilmiştir. Bu mekanizma ile dış zarın daha az anyonik hale geldiği ve kolistinin bağlanmasını önlediği ifade edilmiştir (Gogry vd., 2021). Fosfoetanolamin oluşumunun, *pmrC* (*eptA*) veya *mcr* genleri tarafından kodlanan fosfoetanolamin transferaz enzimi tarafından gerçekleştirilidiği belirtilmiştir. İki bileşenli sistemlerin PmrA/B ve PhoP/Q, enzimi kodlayan genin ekspresyonunu kontrol ettiği belirtilmiştir. Direnç kazanmanın diğer mekanizmaları arasında, lipid sentetik genler *lpxA*, C veya D'nin mutasyonlarının veya inaktivasyonunun olması nedeniyle lipid A sentezinin ortadan kaldırılması ve akış pompalarının aşırı ekspresyonunun yer aldığı belirtilmiştir (Novovic vd., 2023). Günümüzde çeşitli literatürlerden elde edilen bilgilerle toplam on *mcr* varyantı (*mcr-1* ila *mcr-10*) olduğu belirtilmiştir (Hamame vd., 2022). *mcr*'nin keşfinden birkaç yıl sonra bu mekanizmanın bütün dünyaya yayıldığı ve insanlarda, hayvanlarda, gıdalarda ve çevrede, bazıları ise zoonotik vakalarda bildirilmiştir (Dandachi,

2018). Kolistin direnç genlerinin hayvanlarda insanlardan daha fazla görüldüğü ileri sürülmüştür (Algammal vd., 2020). Bu nedenle hayvanların, mobil kolistin direnç genlerinin (*mcr*) iletiminde çok önemli bir rol oynayabilecekleri ifade edilmiştir (Hamame vd., 2022). İnsanlar ve evcil hayvanlar arasında yakın temasın olmasının antibiyotiğe dirençli bakterilerin bulaşması için elverişli koşulları arttırdığı belirtilmiştir (Bhat, 2021). Kolistin direnç genlerinin genellikle bakteriler arasında yayılmasını kolaylaştıran konjügatif plazmitler tarafından taşınan mobil genetik elementler (yani, transpozonlar) üzerinde bulunduğu gösterilmiştir (Olaitan vd., 2014). İnsanların ve hayvanların, fiziksel temas yoluyla çeşitli bakteriyel ARG'leri değiştirebileceği ve ARG'leri barındıran bakterilerin zoonotik bulaşmasının, gıda hayvanlarını veya evcil hayvanlar gibi insanlarla doğrudan temas halinde olan hayvanlar aracılığıyla daha sık görülebileği belirtilmiştir (Kaye vd., 2016). Klinik izolatlara ilişkin verilerin çoğunun enteropatojenik *E. coli* ve *Salmonella* sp. ile ilgili olduğu ifade edilmiştir (Kempf vd., 2013). Son olarak *mcr-6* ve *mcr-7* dışında diğer tüm *mcr* genlerinin çeşitli çalışmalarda köpeklerden rapor edildiği de belirtilmelidir (Wang vd., 2021).

2.1.2. Vankomisin Dirençliliği

Vankomisinin, bakteriyel hücre duvarı otolizinlerini aktive ederek duyarlı organizmalara karşı zamana bağlı bakterisidal aktivite ve ayrıca D-alanil-D-alanin kısmına bağlanarak enterokoklara karşı bakteriyostatik aktivite gösteren aktinomiset *Streptomyces orientalis*'ten türetilen glikopeptid yapısında bir antimikrobiyal olduğu belirtilmiştir (Papich, 2011). İnsanlarda, metisiline dirençli *S. aureus*'un neden olduğu karmaşık cilt enfeksiyonları, kan dolaşımı enfeksiyonları, endokardit, kemik ve eklem enfeksiyonları ve menenjit tedavisi için damar içi yolla kullanıldığı bildirilmiştir (Liu vd., 2011).

Vankomisinin, 1958'de Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) tıbbi kullanım için onaylanmış olduğu ve Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) Temel İlaçlar Listesi'nde yer aldığı belirtilmiştir. DSÖ, vankomisini insan tıbbı için kritik derecede önemli olarak sınıflandırmaktadır (WHO, 2019). Vankomisinin etki spektrumunun *Streptococcus*, *Enterococcus* ve *Staphylococcus*'u (MRSA ve metisiline dirençli *S. pseudintermedius* [MRSP] dahil) içerdiği ve Gram negatif bakterilere karşı etkili olmadığı belirtilmiştir (DeStefano vd., 2018).

Vankomisin ve diğer glikopeptit antibiyotiklerin etki şeklinin, çapraz bağlanmamış Lipid II'nin (undekaprenil-difosfo-N-asetilmuramoil-[N- asetilglukosamin] -l -alanil-y) terminal d -Ala- d -Ala kısmına bağlanması ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu bağlanmanın, penisilin bağlayıcı proteinlerin (PBP'ler) Lipid II'yi olgun peptidoglikana çapraz bağlama aktivitesini engellediği ve dolayısıyla hücre zarının bütünlüğünü tehlikeye atarak ozmotik strese ve hücrenin bozulmasına yol açtığı ifade edilmiştir (Typas vd., 2012). Lipid II'deki terminal aminoasitler olan d -Ala- d -Ala'nın, d -Alad - lac ile değiştirilmesi ile tek bir hidrojen bağının kaybına bağlı olarak vankomisin ve peptidoglikan arasındaki bağlanma sabitinde 1000 kat azalmaya neden olduğu ve bu nedenle yüksek düzeyde direnç ortaya çıktığı ifade edilmiştir (Minimum inhibitör konsantrasyon-MIC >64 mg/L) (Park vd., 2024). Bu dönüşümü destekleyebilen "çekirdek" direnç kasetinin beş genden oluştuğu belirtilmiştir. Peptidoglikan modifikasyonunda yer alan üç enzimi, 9 VanHAX kümesinin kodladığı ve buna kanonik iki bileşenli bir düzenleme sistemi içeren *vanR* ve *vanS* genlerinin yukarı yönde eşlik ettiği ifade edilmiştir (Arthur vd., 1992). Vankomisin direnç genlerinin bu bileşiminin "*vanA*" tipi direnç olarak adlandırıldığı ve daha sonra tanımlanan vankomisin direnç kasetlerinde *vanA* homologlarını kodlayan genlerin *vanB, vanD, vanF* ve *vanM* olarak adlandırıldığı belirtilmiştir (Arthur vd., 1993).

Glikopeptid direncinin, *vanA, vanB, vanD, vanE, vanL* ve *vanN* gibi edinilmiş genlerin transferinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir. *VanC1* ve *vanC2/3*'ün sırasıyla *Enterococcus gallinarum* ve *Enterococcus casseliflavus*'ta intrinsik dirençten sorumlu oldukları ifade edilmiştir (Bourdon vd., 2011; Hegstad vd., 2010). *VanA* ve *vanB* genlerinin mobil elementlerde lokalize olduğu ve uygun genetik arka plan olduğunda aktarılabildikleri belirtilmiştir. Sekans farklılıkları temelinde *vanB*'nin, üç farklı alt tipte (*vanB1, vanB2* ve *vanB3*) sınıflandırıldığı ve D-Ala-D-Lac ligazı kodladığı ifade edilmiştir. *VanB1* alt tipinin, önceden *vanB* geni olarak adlandırıldığı belirtilmiştir. *VanB3* alt tipinin ise DNA heterojenitesinin, *vanB1*'den %5 ve *vanB2*'den %3,6 oranında farklı olduğu tespit edilmiştir (Lu vd., 2001).

Otitis eksternalı köpeklerin dış kulak yolunda, çeşitli mikroorganizmaların kolonize olabileceği bilinmektedir. Bunlar arasında Gram-pozitif enterokoklara sıklıkla rastlanmakta ve bunların esas olarak bağırsağın kommensal florasında olduğu ve ayrıca yara enfeksiyonları, sığırlarda mastitis, köpeklerde üretra ve kulak enfeksiyonları gibi fırsatçı enfeksiyonlara neden olduğu belirtilmiştir (Quinn vd., 2011).

Enterokokların, birçok antimikrobiyal ajana doğal olarak dirençli olduğu ifade edilmiştir. İnsanlarda, çoklu ilaca dirençli (MDR) enterokokların ciddi nozokomiyal enfeksiyonlara neden olan en önemli patojenler arasında olduğu belirtilmiştir (Vergis vd., 2001). Vankomisinin, bu tür enfeksiyonların tedavisi için mevcut birkaç etkili ilaçtan bir tanesi olduğu bildirilmiştir. Avrupa'da vankomisine dirençli enterokok suşlarının, başka bir glikopeptid olan avoparsinin gıda üreten hayvanlara verilmeye başlanmasıyla ortaya çıktığı iddia edilmiştir (Çetinkaya vd., 2000). Çiftlik hayvanlarının vankomisine dirençli enterokok rezervuarlarından biri olduğu tespit edildiğinden dolayı, enterokok sürveyansının veteriner tıbbında da ciddi olarak takip edilmeye başlandığı görülmektedir (Kwon vd., 2022).

Enterokok ve stafilokok bakterilerinin, köpeklerin dış kulak yolunda sıklıkla saptanan fırsatçı patojenler olduğu belirtilmiştir (Jo vd., 2012). Ayrıca köpeklerin kulak kanalından izole edilen enterokoklardan en çok *E. faecalis*'e rastlandığı gösterilmiştir (Hariharan vd., 2006).

Rotterdam'da bir veteriner kliniğine getirilen 24 kedi ve 23 köpeğin rektal sürüntülerinden alınan sıvap örneklerinde vankomisine dirençli enterokokların (VRE) varlığının tespit edildiği ve yapılan gen analizleri sayesinde elde edilen tüm suşların *vanA* genini barındırdığı gösterilmiştir (Belkum vd., 1996).

2.1.3. İmipenem Dirençliliği

Karbapenem antibiyotiklerinin, *Acinetobacter baumannii (A. baumanii*), *P. aeruginosa, Enterobacteriaceae* (*Klebsiella pneumonia, E. coli, Enterobacte*r *spp*., *Serratia spp., Proteus spp*.), *Enterococcus faecium* (*E. faecium), Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Shigella spp*.ve *Mycobacterium tuberculosis* gibi en dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar için ilk tedavi seçeneği olarak kabul edildiği belirtilmiştir (Aslam vd., 2019). DSÖ'nün 2017 yılında 12 antibiyotiğe dirençli bakteriden oluşan ve özellikle karbapenem dirençli *A. baumannii* (CRAB) için yeni antibiyotikler keşfetmeye yönelik yeni bir liste oluşturmaya öncelik verdiği belirtilmiştir. Bu bakterilerin, ABD'de her yıl yaklaşık 2 milyondan fazla insanın antibiyotiğe dirençli bakterilerle enfekte olmasına neden olan ESKAPE grubunun (*E. faecium, S. aureus, Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumonia*), *A. baumannii, P. aeruginosa, Enterobacter* türleri) bir parçası olduğu belirtilmiştir (WHO, 2019). Ayrıca ABD Gözetim Ağı Veritabanı (Focus Technologies; Herndon, VA) tarafından toplanan *P. aeruginosa* verilerinin gösterdiği sonuçlara göre; bu

bakterinin artık çoklu ilaca dirençli bir patojen olarak kabul edildiği belirtilmiştir (Livermore, 2002). Bu nedenle virülans mekanizmaları, antibiyotiklere direnç yeteneği, metabolik potansiyeli ve fizyolojik adaptasyonu nedeniyle *P. aeruginosa*'nın eradikasyonunun giderek zorlaştığı ifade edilmiştir (Flores-Velázquez vd., 2021).

E. coli'nin klinik izolatları arasında metallo-betalaktamaz (MBL) üretimine bağlı karbapenem direncinin rapor edildiği belirtilmiştir. MBL'lerin patojenik bakteriler tarafından üretilen ve çoğunlukla *E. coli* türleri olmak üzere Gram-negatif organizmalarda bulunan beta-laktamaz enzimleri olduğu belirtilmiştir (Bora vd., 2014). MBL üreten izolatlarla gelişen klinik enfeksiyonların, daha yüksek morbidite ve mortalite ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir (Deshmukh vd., 2011).

Karbapenemlere direnç gelişiminin, hücrelere girişlerinde spesifik portal olan porin *OprD*'yi kodlayan geni etkisiz hale getiren mutasyonlardan veya effluks (akış) pompalarının aşırı üretiminden kaynaklandığı belirtilmiştir (Lister vd., 2009). *prD* kaybından kaynaklanan dış membran geçirgenliğinin azalması genellikle indüklenebilir veya yapısal *ampC* ifadesine sahip suşlarda imipenem, meropenem ve doripenem dahil olmak üzere tüm karbapenem moleküllerinin MIC'lerinde 4 ila 16 kat artışa neden olduğu ifade edilmiştir (Livermore, 1992).

1.1.4. Seftriakson Dirençliliği

Sefalosporinler, hücre duvarı sentezini inhibe eden, geniş spektrumlu, pnömoni, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, bakteriyemi ve menenjit gibi yaygın mikrobiyal enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılan beta-laktam antibiyotiklerdir (Ayinalem vd., 2013). Üçüncü kuşak sefalosporinlere karşı direnç oluşumunun artmakta olduğu ve birçok ülkede sağlık sistemi üzerinde önemli bir baskı oluşturduğu belirtilmiştir (Meyer vd., 2010). Genişletilmiş spektrumlu bir üçüncü kuşak sefalosporin olan seftriaksonun, ilk kez 1982'de ciddi enfeksiyonların veya çoklu ilaca dirençli suşların neden olduğu enfeksiyonların tedavisi için piyasaya sürüldüğü belirtilmiştir (Goldstein vd., 1995). Piyasaya sürülmesinden bu yana seftriaksonun, yüksek antibakteriyel performansı, daha geniş etki spektrumu ve düşük toksisitesi nedeniyle yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerden biri olduğu ifade edilmektedir. Seftriaksonun, bronşit ve zatürre gibi solunum yolu bakteriyel enfeksiyonları, idrar yolu ve kemikteki bakteriyel enfeksiyonlar için reçete edildiği belirtilmiştir (Ayinalem vd., 2013). Seftriaksonun, *Enterobacteriaceae,*

Haemophilus influenzae, S. pneumoniae, Neisseria gonorrhoeae ve diğer enterokokal olmayan streptococcuslar dahil olmak üzere Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı güçlü etkinliğe sahip, çeşitli beta-laktamaz tiplerine dirençli geniş spektrumlu bir sefalosporin olduğu ileri sürülmüştür (Neu vd., 1981).

Seftriaksonun bakteri hücre duvarında peptidoglikan oluşturmak için kullanılan D-alanil-D-alanin amino asidinin yapısını taklit eden bir beta-laktam halkası içerdiği ve bu yapısal benzerliğinden dolayı transpeptidazların seftriaksona geri dönüşümsüz olarak bağlandığı ve aktivitelerini nötralize ettiği ifade edilmiştir. Transpeptidazlar geri döndürülemez şekilde inhibe edildiğinden, peptidoglikanın nihai çapraz bağlanmasının gerçekleşemediği ve bakteriyel hücre duvarının çökerek bakteriyel hücre lizisine yol açtığı ifade edilmiştir (Barriere vd., 1984).

Direncin moleküler mekanizmasının, *penA* tarafından kodlanan penisilin bağlayıcı protein 2'nin (PBP 2) mozaik yapısının oluşmasıyla aydınlatıldığı belirtilmiştir. Mozaik *penA*'nın, türler arası rekombinasyon yoluyla oluştuğu ve bunun *N. gonorrhoeae*'de kromozomal olarak aracılık edilen penisilin direnciyle aynı mekanizma olduğu belirtilmiştir. Ancak rekombinasyonun kesin bağlantılarının tam olarak açıklanamadığı ifade edilmiştir. (Ameyama vd., 2002).

Otitis eksternalı 74 köpeğin kulak kanallarından alınan örneklerden çalışılan ve izole edilen toplam 92 bakterinin 68'inin *S. intermedius* olarak tespit edildiği belirtilmiştir. İzole edilen tüm bakterilere 14 antibiyotik kullanılarak antimikrobiyal duyarlılık testi yapıldığı ve izole edilen tüm stafilokok türlerinin seftriaksona karşı düşük dirence sahip olduğu belirtilmiştir. Ayrıca genel olarak izole edilen diğer gram negatif bakterilerin de seftriaksona düşük dirençli olduğu ifade edilmiştir (Zamankhan Malayeri vd., 2010).

1.1.5. Siprofloksasin Dirençliliği

Florokinolon ailesinin bir üyesi olan siprofloksasin, Gram pozitif ve Gram negatif bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılır (Serizawa vd., 2010). Siprofloksasinin, idrar yolu enfeksiyonları, cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar, deri, kemik, eklem enfeksiyonları, prostatit, tifo, mide-bağırsak enfeksiyonları, alt solunum yolu enfeksiyonları, şarbon, veba ve salmonelloz tedavisinde Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayına sahip olduğu belirtilmiştir (Tony vd., 1988) Ayrıca siprofloksasin etkin madeli otik solüsyonunun,

duyarlı *P. aeruginosa* veya *S. aureus* suşlarının neden olduğu akut otitis eksternanın tedavisi için onaylı olduğu belirtilmiştir (Edmunds vd., 2017). Siprofloksasinin, bakteriyel DNA topoizomerazı ve DNA girazı inhibe ederek DNA replikasyonunu önler ve böylece bakterisit etki gösterir. Ayrıca florokinolon sınıfı içinde gram negatif basillere (özellikle *E. coli, Salmonella spp*., *Shigella spp*. ve *Neisseria* gibi enterobakterilere) karşı en güçlü etkiyi sağladığı belirtilmiştir (Campoli vd., 1988). Fransa'da köpeklerde otitis eksterna vakalarından elde edilen izolatlardan yapılan bir araştırmada florokinolonlara karşı direnç düzeyi *P. mirabilis* ve stafilokok izolatları için %15'in altında bulunurken, *Streptococcus spp*. ve *P. aeruginosa* için daha yüksek bulunduğu belirtilmiştir (%62,9) (Bourély vd., 2019). Buradaki direncin, genellikle hedef yapılar olan DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlara bağlı olarak gerçekleştiği belirtilmiştir. Kinolon direncine neden olan mutasyonların DNA girazda *gyrA*, topoizomeraz IV'de ise *parC* genlerinde sık görüldüğü ifade edilmiştir (Hopkins vd., 2005). DNA giraz'ın ise (topoizomeraz II), *gyrA* ve *gyrB* genleri tarafından kodlanan iki A ve iki B alt ünitesinden oluşan tetramerik bir yapıya sahip olduğu ifade edilmiştir (Bernard vd., 2001). Mısır'da El-Ezher Üniversitesi hastanelerindeki yoğun bakım hastalarında gösterilen *A. baumannii*'nin florokinolonlara dirençli klinik izolatları arasında yapılan bir çalışmada gyrA/B ve parC/E genlerindeki mutasyonların belirlenmesi yapılmıştır. Bu çalışmada altı izolatın *gyrA*'da mutasyon olmadan *parC'*de mutasyonlar gösterdiği ve bunun da *parC*'nin *gyrA*'da mutasyon olmadan siprofloksasin direncinde rol oynayabileceğini düşündürdüğü ifadesi yer almaktadır (Shahhat vd., 2021). Bu durum sınırlı sayıda olan *gyrA* ve *gyrB* geni araştırmalarında mutasyonların rastgele oluşabileceğini ve yapılan çalışmada tespit edilen genlerin antibiyotik dirençliliği ve duyarlılığı ile bağımsız şekilde değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir.

1.1.6. Metisilin Dirençliliği

*S. aureus'*un bir patojen olarak çok yönlülüğünün, evcil kedi ve köpekleri, atları, keçileri, koyunları, sığırları, tavşanları, domuzları ve kümes hayvanlarını içeren konakçı aralığını da kapsadığı belirtilmiştir. Bu türlerde *S. aureus*'un neden olduğu çeşitli enfeksiyonlar belirtilmiştir. Süt sığırlarında ve diğer geviş getiren hayvanlarda mastitis, çiftlik tavşanlarında ölümcül sistemik enfeksiyonlar, kümes hayvanlarında ülseratif pododermatit ve köpeklerde otitis eksterna olarak izlendiği belirtilmiştir. Antibiyotik öncesi dönemde *S. aureus* bakteriyemisi olan hastaların mortalitesinin %80'i aştığı ve 1940'ların başında penisilin G'nin piyasaya sürülmesi ile bu prognozun önemli ölçüde iyileştirildiği belirtilmiştir (Skinner vd., 1941). Dirençli suşların penisilinin sağaltıma girmesiyle birlikte

1942 yılında oldukça kısa bir sürede fark edilmesi ve ardından direnç mekanizmalarının belirlendiği ifade edilmiştir. β-laktam halkasını hidrolize eden ve ilacı etkisiz hale getiren enzimin penisilinaz/β-laktamaz enzimi olduğu ve bu enzimin, tipik olarak bir plazmid üzerindeki büyük bir transpozonda bulunan *blaZ* tarafından kodlandığı belirtilmiştir (Bondi vd., 1945).

Penisilin direncinin ortaya çıkışı ve yayılmasından sonra metisilin adı verilen yarı sentetik penisilinaza dirençli bir β-laktam geliştirildiği belirtilmiştir. Metisilin'in (Celbenin adıyla pazarlanmıştır) 1959'da kliniğe tanıtıldığı ve hemen ardından, Londra, Birleşik Krallık yakınlarındaki Guildford'daki aynı hastanede üç kişiden Temmuz ve Ekim 1960 arasında kültürlenen dirençli izolatlara ilişkin ilk raporların geldiği belirtilmiştir (Jevons, 1961). MRSA'nın, 1960'lı yıllarda metisilinin bulunmadığı ülkeler de dahil olmak üzere birçok ülkede ortaya çıktığı ve daha sonra dünyanın her tarafına yayıldığı belirtilmiştir (Ayliffe, 1997; Moellering, 2012).

Metisilinin artık klinik olarak kullanılmamasına ve hatta ticari olarak üretilmemesine rağmen, MRSA teriminin varlığını sürdürdüğü bilinmektedir. Ayrıca, metisilin direncinin yeni nesil sefalosporin β-laktamlar dışında hemen hemen tüm β-laktamlara karşı direnç olarak ortaya çıktığı belirtilmiştir. MRSA'nın aynı zamanda birden fazla alternatif antimikrobiyale karşı da direnç kazanabileceği ve bu da enfeksiyonun tedavisini daha da karmaşık hale getirebileceği hakkında değerlendirme yapılmıştır. Bu direncin, şiddetli MRSA enfeksiyonlarında son tedavi seçeneklerinden biri olarak kabul edilen vankomisin, linezolid ve daptomisin gibi yeni ajanları da kapsadığı belirtilmiştir (Liu vd., 2011).

Stafilokok cinsinin, insanlar ve/veya çeşitli hayvan türlerini kolonize edebilen 50'den fazla türü kapsadığı belirtilmiştir. Koagülaz üreten *S. aureus*'tan ayırt edilmesi için topluca koagülaz negatif stafilokoklar olarak anıldığı ifade edilmiştir. Bu türler arasında *S. epidermidis, S. lugdunensis, S. haemolyticus* ve *S. schleiferi* olduğu belirtilmiştir. *mecA* geninin insanlarda ve diğer çeşitli konakçı türlerinde taşıyıcılık ve hastalıktan izole edilen bir dizi stafilokok türünde mevcut olduğu rapor edilmiştir. *mecA*'nın kökeninin *S. sciuri* olduğu öne sürülmüştür. *mecA* evrimindeki kesin adımlar henüz açıklanmamış olsa da *mecA*'nın *S. aureus*'a aktarımının ortaya çıkmasından önce hayvan stafilokoklarında ortaya çıkan ve gelişen bileşenler olarak var olmuş olabileceği ifade edilmiştir (Couto vd., 1996).

β-laktam antimikrobiyal ilaçların bakteriyel hücre duvarı biyosentezini hedeflediği ve bunları inhibe ederek etki gösterdiği bilinmektedir. MRSA'nın, penisilin bağlayıcı protein 2a (PBP2a) yoluyla β-laktam antibiyotiklere karşı direnç kazandığı belirtilmiştir. PBP2a'nın (monofonksiyonel bir transpeptidaz), β-laktam antibiyotiklere karşı düşük afiniteye sahip olduğu ve dolayısıyla bu antibiyotikler tarafından inhibe edilemediği ifade edilmiştir (Makgotlho vd., 2009). MRSA'nın β-laktam antibiyotiklere direncinin, hareketli bir genetik element olan stafilokokal kaset kromozom *Mec*'in (SCC *mec*) edinilmesi yoluyla sağlandığı belirtilmiştir. SCC *Mec*'in, değiştirilmiş bir PBP'yi, özellikle de β-laktam antibiyotiklere karşı afinitesi azalmış olan PBP2a'yı kodlayan *mecA* genini taşıdığı belirtilmiştir (Sekizuka vd., 2020). MRSA klinik izolatlarının bir dizi antibiyotik sınıfına (örneğin, florokinolonlar, makrolidler, aminoglikozidler ve klindamisin) ve β-laktam antibiyotiklere karşı dirençli hale geldiği vurgulanmıştır. Bu ek direnç mekanizmalarının, biyofilm oluşumunun yanı sıra mutasyonlar ve edinilmiş direnç belirleyicilerinden de kaynaklandığı belirtilmiştir. Bu nedenle, MRSA izolatlarının çoklu ilaca dirençli (MDR) patojenler olduğu ve bu durumun da dünya çapında mortalite ve morbiditenin önemli bir nedeni haline geldiği ifade edilmiştir (Makgotlho vd., 2009).

S. aureus'un genellikle köpeklerin normal florasının bir parçası olarak kabul edilmediği; daha ziyade *S. pseudintermedius*'un bu türde baskın olduğu belirtilmiştir. MRSA'nın evcil hayvanlar, veteriner sağlık çalışanları ve veteriner kliniğinin çevresel yüzeyleri arasında bulaştığı gösterilmiştir (Feßler vd., 2018). Evcil hayvanların aynı MRSA ve metisiline dirençli *S. pseudintermedius* (MRSP) türlerini insan sahiplerine de taşıdıkları gösterilmiştir. Bu durumun da ev içi bulaşmanın muhtemel olduğunu düşündürdüğü belirtilmiştir (Morris vd., 2010).

1.1.7. Sefepim Dirençliliği

Dördüncü kuşak bir sefalosporin olan sefepimin, çok çeşitli gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı geniş bir aktivite spektrumuna sahip olduğu belirtilmiştir. Ek olarak sefepimin, ilaca karşı nispeten düşük afiniteye sahip olan β-laktamazların zayıf bir indükleyicisi olduğu ve bunlara karşı artan stabiliteye sahip olduğu belirtilmiştir. Sefepimin, üçüncü kuşak sefalosporinlere dirençli birçok gram negatif bakteriye karşı aktif ve seftazidime benzer antipsödomonal aktiviteye sahip olduğu ifade edilmiştir. Sefepimin metisiline dirençli stafilokoklara ve enterokoklara karşı etkinliği olmadığı ve anaerobik bakterilere karşı değişken aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Wynd vd., 1996).

AmpC β-laktamazlar'ın, belirli Enterobacteriaceae'lerin kromozomları üzerinde kodlanan ve klinik açıdan önemli hidrolize edici enzimler olduğu belirtilmiştir (Jacoby, 2009). *AmpC* β-laktamaz üreten mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların yaygın bir morbidite ve mortaliteye neden olabilecekleri ileri sürülmüştür (Park vd., 2009). Mevcut veriler *AmpC* β-laktamaz üreten organizmaların neden olduğu enfeksiyonların karbapenemlerle başarılı bir şekilde tedavi edilebileceğini göstermektedir (Pai vd., 2004). Bununla birlikte, seftriaksona kıyasla daha geniş spektrumlu aktiviteye sahip dördüncü kuşak bir sefalosporin olan sefepimin rolünün belirsizliğini koruduğu ifade edilmiştir (FDA, 2023). Enterobacter ve Citrobacter türlerinin neden olduğu enfeksiyonlarda, sefepim ile tedavi edilen hayvanlarda direncin ortaya çıkışının nadir olmasına rağmen üçüncü kuşak sefalosporinlerle tedavi edilen hayvanlarda dirence daha fazla rastlandığı gösterilmiştir (Marchou vd., 1987).

Penisilini parçaladığı bildirilen ilk bakteriyel enzimin, *E. coli*'nin *AmpC* β-laktamaz'ı olduğu ifade edilmiştir (Abraham vd., 1940). İsveçli araştırmacıların 1965 yılında *E. coli*'de penisilin direncinin genetiğine ilişkin sistematik bir çalışmaya başladıkları ve direncin adım adım arttığı mutasyonlara *ampA* ve *ampB* adını verdikleri belirtilmiştir. Bir *ampA* suşunda direncin azalmasıyla sonuçlanan mutasyon sonrasında bu gene *ampC* adı verildiği bildirilmiştir. *AmpC* suşlarının çok az β-laktamaz üretmesinden dolayı, *ampC*'nin enzim için yapısal gen olduğunu değerlendiren çalışmalar olduğu belirtilmiştir (Jacoby, 2009). *Amp* isimlendirmesinin çoğunun yıllar içinde değiştiği, ancak *AmpC* tanımının devam ettiği belirtilmiştir.

1.1.8. Amoksisilin Klavulanik Asit Dirençliliği

Amoksisilin-klavulanat'ın dünyada en yaygın kullanılan antimikrobiyallerden biri olduğu ve *Enterococcus* türleri, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus* türleri, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Corynebacterium diphtheria*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella spp.* dahil olmak üzere gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı benzer etkinliğe sahip olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, klavulanik asit ilavesiyle etki spektrumunun, tüm beta-laktamaz üreten suşlarını kapsayacak şekilde arttırdığını ve metisiline duyarlı Staphylococcus aureus (MSSA), *Neisseria spp.*, *Proteus spp.*, *Pasteurella multocida*'yı içerecek şekilde genişlettiği ifade edilmiştir (Evans vd., 2023).

Klavulanik asitin, kararsız β-laktam antibiyotiklerini bakteriyel β-laktamazların neden olduğu hidrolizden korumak için kullandığı ileri sürülmüştür. Bu nedenle, amoksisilinin antibakteriyel spektrumunun, klavulanat içeren kombinasyonlar halinde uygulandığında önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir (Sutherland, 1995). Klavulanik asit tarafından etkili bir şekilde inhibe edilen β-laktamazlardan bazılarının, *E.coli'*de en yaygın β-laktamazlar olan *TEM-1, TEM-2* ve *SHV-1* olduğu belirtilmiştir (Sousa vd., 1991). E. coli'de amoksisilin-klavulanik asit direncinin 1987 gibi erken bir tarihte rapor edildiği belirtilmiştir. Dirence neden olan mekanizmalar arasında plazmid tarafından kodlanan β-laktamazlar TEM-1, TEM-2 veya SHV-1'in aşırı üretimi, yapısal *AmpC* sefalosporinazın aşırı üretimi, OXA enzimlerinin üretimi (penisilinazlar β-laktamaz inhibitörleri tarafından zayıf şekilde inhibe edilir), OmpF ve/veya OmpC porinlerinde bir eksiklik ve inhibitöre dirençli TEM (IRT) β-laktamazların üretimi sayılmaktadır (Pérez-Moreno vd., 2004).

1.2. Çalışmanın Amacı ve Önemi

Antimikrobiyal dirençli bakteri türleri, hayvan ve insan sağlığı için giderek artan bir tehdittir. Bakterilerin antimikrobiyaller için geliştirdikleri direnç mekanizmaları, insan ve veteriner hekimliğinde klinik kullanım için halihazırda mevcut olan tüm bilinen antimikrobiyaller için neredeyse tamamen tanımlanmış veya açıklanmıştır. Edinilmiş bakteriyel antibiyotik direnci, normal hücresel genlerin mutasyonundan, yabancı direnç genlerinin edinilmesinden veya bu iki mekanizmanın birleşiminden kaynaklanabilir. Bakteriler tarafından kullanılan en yaygın direnç mekanizmaları arasında antimikrobiyalin enzimatik bozunması veya değiştirilmesi, antimikrobiyal hedef bölgedeki mutasyon, hücre duvarının antimikrobiyallere karşı geçirgenliğinin azalması ve antimikrobiyalin hücre zarı boyunca aktif akışı yer alır. Plazmidler, transpozonlar ve integronlar gibi hareketli genetik elemanların yayılması, insan ve veteriner hekimlik açısından önem taşıyan çeşitli bakteri türleri arasında antimikrobiyal direncin hızlı yayılmasına büyük ölçüde katkıda bulunmuştur. Antimikrobiyal direnç genlerinin mobil elementler üzerinde biriktiğinin gösterilmesi, çoklu ilaca direnç fenotiplerinin tek bir genetik olay aracılığıyla duyarlı bir alıcıya aktarılabileceği bir duruma yol açmaktadır. Antimikrobiyal dirençli bakteriyel patojenlerin artan prevalansı, hem hayvanlarda hem de insanlarda bulaşıcı hastalıkların gelecekteki tedavisi ve önlenmesi açısından ciddi etkilere sahiptir. Bakterilerin çevrelerine uyum sağlama ve farklı cinsler arasında DNA alışverişi yapma konusundaki çok yönlülük hem insan hem de veteriner hekimliğinde etkili antimikrobiyal yönetim ve enfeksiyon kontrol programlarının uygulanması ihtiyacını vurgulamaktadır.

Yukarıda belirtilen çalışmalar göz önüne alındığında bu çalışmanın hipotezi; hijyen koşullarına paralel olarak her ülkede farklı türden bakterilerin köpeklerde Otitis eksterna enfeksiyonlarına neden olduğu, Türkiye'nin de farklı bir bölge ve kendine özgü koşulları bulunması nedeniyle farklı enfeksiyon etkenlerine ve dolayısıyla antimikrobiyal direnç genlerinin de farklı olabileceği durumu üzerine kurulmuştur.

Bu doktora tezinin amacı; köpeklerde otitis eksternaya sebep olan bakterileri tespit etmek ve bunların dirençlilik profillerini ortaya çıkartarak, tedavi önerileri yapmak, hayvan ve insan sağlığını tehdit eden dirençlilik genlerinin tespitini yapmaktır.

Dirençlilik genlerinin tespit edilmesi ile bu genlerin aktarımının ne düzeyde olacağı değerlendirilecek ve uygun antibiyotiğin seçimi için fikir verecektir. Farklı hayvanlarda aynı direnç genlerinin farklı antibimikrobiyallerde tespit edilmesi çapraz direnç mekanizmalarını tahmin etmemizi kolaylaştıracak, böylece tedavi seçeneklerini en doğru şekilde değerlendirmemizi sağlayacağı düşünülmektedir. Böylece hedefler;

1) Köpeklerde Otitis externa'ya neden olan bakteriyel etkenlerin tespiti,

2) Köpeklerde dış kulakta bulunan bakteriyel profilin belirlenmesi,

3) Köpeklerde dış kulakta mevcut antibiyotik direnç gen profilinin belirlenmesi,

4) Ortaya çıkan dirençlilik profiline göre alternatif antibiyotiklerin önerilmesidir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Numunelerin Toplanması

Bu çalışmada, Ankara'da pet hayvanları sağlığı merkezlerinden toplanan, klinik olarak kaşıntı, baş sallama, kulaktan kötü koku, tek taraflı veya çift taraflı otore (kulak akıntısı), kulaklarda tek veya çift taraflı sarkma, palpasyonda ağrı, eritem ve kulak derisi veya kulak kanalında artan kulak kiri miktarıyla birlikte şişlik gösteren bilateral otitis eksternalı toplam 25 köpeğin kulağından (iki kulaktan) alınan sürüntü örnekleri ile çalışıldı.

Çalışmanın deneme deseni doğrultusunda 15 farklı antibiyotik direnç geni çalışıldı. Böylece Tip I hata 0,05, etki büyüklüğü (d) 0,32 ve testin gücü 0,80 olarak alındığında minimum örnek genişliği n=25 olarak hesaplandı. Örneklem hesabı için G-Power ver. 3.1.9.6 istatistik paket programı kullanıldı. Hastaların anamnezi alındı ve hasta sahiplerinden araştırma onam formları doldurudu, hayvanların ırk, cinsiyet, yaş ve kilo durumları kaydedildi.

Hastalardan alınan örnekler; kulak kanalında kanamaya yol açmadan, dış kulak kanalında yaklaşık 0,5 cm ilerleyerek ve kulak kanalının duvar çeperine değerek alınan kulak kirleri ile sağlandı. Örnekler jelli sıvaplarla alındı. Jelli sıvap kullanılması özellikle anaerobik bakterilerin üreyebilmesi açısından havasız ortam oluşturabilmek için tercih edildi. Otitis eksterna bulguları gösteren her köpekten 2 adet jelli sıvap ve 1 adet normal sıvap örnekleri toplandı. Jelli sıvaplar mikrobiyolojik inceleme ve antibiyogram için ayrıldı. Diğer alınan örnek ise gen analizleri için, RNALater solüsyonu (DiaRex RL-0342, Diagen) içeren falkon tüplere aktarıldı. Hastaların ve hayvan sahiplerinin isimleri, laboratuvardan özel olarak sağlanan bu sıvapların ve falkonların numaralaları ile eşleştirildi ve kayıt edildi.

2.2. Örneklerin Saklanması ve Taşınması

Jelli sıvaplara alınan örneklerin bakteriyolojik incelenmesi aynı gün içerisinde laboratuvara ulaştırılarak sağlandı. Laboratuvara ulaştırılana kadar +4°C'de muhafaza edildi. RNALater solüsyonu içeren falkon tüplere alınan örnekler, 25 köpeğin tamamından örnek alınana kadar, -40°C'de muhafaza edildi. Belirtilen sayıya ulaşıldığında saklanan örnekler

laboratuvara ulaştırılmak üzere -40°C'de kalmalarını sağlayacak araç içi derin dorundurucuda saklanarak getirildi.

2.3. Bakteriyolojik İnceleme

Kulak sürüntüsü örnekleri alındıktan sonra hızla nutrient agar (Orbak. Türkiye), %5 defibrine koyun kanlı agarı (Orbak, Türkiye) ve MacConkey laktoz agar (MLA) (Orbak, Türkiye) üzerine inoküle edilip bir gece 37°C'de inkübe edildi. Bakteri izolatları, tek bir koloni alınarak ve taze %5 koyun kanlı agarda alt kültüre tabi tutularak saflaştırıldı. Koloni morfolojisi, Gram boyama, katalaz ve oksidaz testleri temel alınarak bakteri izolatları cins düzeyine kadar tanımlandı.

Gram pozitif koklar mikroskobik olarak incelendi ve *Staphylococcus* türleri ile *Streptococcus* türleri arasında ayrım yapmak için katalaz testine tabi tutuldu. Kümelerde katalaz pozitif ve oksidaz negatif gösteren Gram pozitif koklar *Staphylococcus spp* olarak, katalaz ve oksidaz testleri negatif gösteren Gram pozitif koklar ise *Streptococcus spp* olarak tanımlandı. Mikrokok olasılığına karşı tüm katalaz pozitif koklar oksidaz testi ve oksidasyon fermantasyon testine tabi tutuldu. Mikroskobik olarak Çin harfi görünümü gösteren Gram pozitif çubuklar *Corynebacterium spp* olarak tanımlandı. Nutritient agarda kümelenerek üreyen gram negatif çubuklar *Proteus spp* olarak, ama nutrient agarda yeşil pigmentasyon gösterenler *Pseudomonas spp* olarak tanımlandı. MLA üzerinde pembe parlak küçük koloni ve EMB (Eozin metilen blue agar) üzerinde metalik parlaklık gösteren Gram negatif çubuklar *E. coli* olarak tanımlandı (Agnihotri vd., 2019).

2.4. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

İzole bakterilerin antibiyotik duyarlılık testleri (The Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) önerdiği Kirby-Bauer Disk Difüzyon yöntemine göre yapıldı (CLSI, 2019). Antibiyotik duyarlılık test diskleri olarak Çizelge 2.1'de verilen 40 antibakteriyel maddenin diskleri kullanıldı. Agar plakaları 37°C'de 18-24 saat inkube edildi ve inhibisyon zon çapları CLSI standartlarına göre her bir disk için ölçüldü (CLSI, 2019; CLSI, 2020).

Alınan örnekler jelli sıvapta (Letsswab, Türkiye) bakteriyolojik analiz yapılana kadar +4°C'de kalacak şekilde saklandı. Antimikrobiyal duyarlılık testleri yapılacak olan

örnekler ekim yapılması için uygun hale getirildi. Ekim örneği, plak besiyerinin yüzeyine öze yardımı ile tek koloni (seyreltme ekimi) ekim tekniği uygulanarak ekildi. Gram pozitif mikroorganizmaların izolasyonu için seçici besiyeri olan %5 koyun kanı ile desteklenmiş kanlı agar kullanıldı. Stafilokokları tanımlamak için seçici besiyeri olan mannitol-salt agar (Orbak, Türkiye) kullanıldı. Gram negatif bakteriler için ise seçici ve ayırt edici besi yeri olan MacConkey agar (Orbak, Türkiye) kullanıldı. Aerobik olarak 37°C'de 24-48 saat inkübe edilerek üremeleri kontrol edildi. İzole bakteri türlerinin antimikrobiyal duyarlılık paternleri Mueller Hinton agar (Condalab, İspanya) kullanılarak disk difüzyon testi ile belirlendi ve antibiyotik diskleri çevresinde elde edilen inhibitör zon çapları, 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra ölçülüp, CLSI laboratuvar standartlarına göre değerlendirildi. Tüm izolatların oksasilin (metisilin) duyarlılık testi, oksasilin disk (Bioanalyse, Türkiye) difüzyonu ile yapıldı. Çeşitli mikrogramlarda 40 antibiyotik kullanılarak çıkan sonuçlarda, suşlar ilaca duyarlı veya dirençli olarak sınıflandırıldı, ara duyarlılık dirençli olarak kabul edildi ve sonuçlarda sadece dirençler rapor edildi. Bazı direnç genleri primerleri kullanılarak saflaştırılan koloniler PCR ile analiz edilip ve çoklu dirençlilik durumları belirlendi.

Çizelge 2.1. Köpeklerin dış kulak enfeksiyonlarında izole edilen bakterilerin duyarlılığını tespit etmek için kullanılan antibakteriyeller

1. Aminosidin (AN-60 µg)	15. Danofloksasi (DAN- 5 µg)	29. Penisilin G (P-10 µg)
2. Amoksisilin Klavulanik Asit (AMC- 30 µg/ 20-10)	16. Doksisikli (DO- 30 µg)	30. Sefaleksin (CL-30 µg)
3. Amoksisilin (20 µg)	17. Enrofloksasin (ENR- 10 µg)	31. Spektinomisin (SPT- 25 µg)
4. Ampisilin Kloksasilin (APX 30 µg/ 25-5)	18. Eritromisin (E- 15 µg)	32. Spiramisin (SP- 30 µg)
5. Ampisilin Sulbaktam (SAM 20 µg/ 10-10)	19. Florfenikol (FFC- 30 µg)	33. Streptomisin (S-25 µg)
6. Sefoperazon (CEP- 75 µg)	20. Fosfomisin (FF- 30 µg)	34. Sulfadiazin (SUZ- 30 µg)
7. Sefazolin (CZ- 30 µg)	21. İmipenem (IMP- 10 µg)	35. Sülfametoksazol Trimetoprim (SXT-25 µg/ 23,75- 1,25
8. Sefkuinom (CEQ- 30 µg)	22. Sefepim (FEP- 10 µg)	36. Sülfametoksazol (SMZ- 100 µg)
9. Seftiriakson (CRO- 30 µg)	23. Linkomisin (LMY- 15 µg)	37. Tetrasiklin (TE- 30 µg)
10. Kloramfenikol (C- 30 µg)	24. Siprofloksasin (CIP-10 µg)	38. Vankomisin (VA- 10 µg)
11. Klaritromisin (CLR- 15 µg)	25. Metronidazol (MET- 10 µg)	39. Trimetoprim (TMP- 30 µg)
12. Klindamisin (DA-10 µg)	26. Metisilin (MET- 5 µg)	40. Tulatromisin (TUL- 30 µg)
13. Kloksasilin (CX- 30 µg)	27. Neomisin (N- 30 µg)	
14. Kolistin (CT- 25 µg)	28. Oksitetrasiklin (T-OT- 30 µg)	

2.5. Direnç Genlerinin Belirlenmesi

Analizi yapılan direnç genleri, Antimicrobial Advice Ad Hoc Expert Group (AMEG), yani antimikrobiyal özel amaçlı tavsiye uzman grubu tarafından önerilen ve 12 Aralık 2019 tarihinde yayımlanan Avrupa Parlamentosu ve Konseyinin (EC) 726/2004 Sayılı Tüzüğünü yeniden değerlendirerek veteriner tıbbi ürünlerin arzı, imalatı, ithalatı, ihracatı, temini, dağıtımı, farmakovijilans, kontrolü ve kullanımında değişiklik yapılmasını öngören EU/2019/6 sayılı tüzüğünde A, B,C ve D kategorisinde yer alan antibiyotiklerden seçilmiştir (Çizelge 2.2), (EMA, 2019). Analizi yapılan genler; kolistin için, *mcr*-1, *mcr*-2, *mcr*-3, *mcr-4* ve *mcr-5* genleri, vankomisin için *van-A* ve *van-B* genleri, imipenem için *IMIP* geni ($_{bla}$*IMP*), seftriakson için *penA* geni, siprofloksasin için *Gyr-A, Gyr-B* genleri, metisilin için *Mec-A,* sefepim için *Amp_C,* amoksisilin klavulanik asit için *OXA-1* geni olarak belirlendi. Bu gen analizleri sayesinde hem köpeklerde otitis eksterna enfeksiyonlarına neden olan tüm bakteri çeşitleri hem de bazı antibiyotik direnç genleri belirlenmiş oldu.

Bakterilerden direnç genlerinin tespiti için PCR primerleri çizelge 2.3.'de gösterildiği gibi antibiyotiğe spesifik primerler ile Real Time-qPCR (ROCHE LightCycler® 480) ile analiz edildi ve çoklu dirençlilik durumları analiz edildi. Her bir antibiyotik direnci monoplex olarak yani tek tek çalışıldı.

DNA ekstraksiyonu için; sıvap numuneleri DiaRex® Stool Genomic DNA Extraction Kit (Kat No: SD-0323, Ankara) kullanılarak yapıldı. Kısaca 200 µL sıvap solüsyon numunesi üzerine 250 µL Lysis (LBD) solüsyonu eklendi. Ardından üzerine 15 mg cam ve 10 adet zirkon boncuk eklenerek homojenizatör cihazında 4000 g × 2 × 20 saniye uygulama yapıldı. Homojenizasyondan sonra üzerine 25 µL Proteinaz K (PKD) solüsyonu eklendi ve 56°C'de 60 dk inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sonunda tüm içerik 5000 g' de 5 dk santrifüj yapılarak süpernatant yeni tüpe aktarıldı. Süpernatant üzerine 200 µL Stool Lysis (SLD) solüsyonu eklendi ve 70°C' de 10 dk inkübasyon yapıldı. İnkübasyonun ardından lizata 250 µl mutlak etanol eklendi ve tüm içerik kolona aktarıldı. Kolon 8000 g × 1 dk santrifüj yapıldıktan sonra yeni tüpe aktarıldı. Ardından kit protokolüne göre yıkamalar yapıldıktan sonra 100 µL Elüsyon (EBD) solüsyonu eklendi ve 2 dk inkübasyondan sonra 8000 g × 1 dk santrifüj yapılarak genomik DNA elde edildi.

Bakterilerden direnç genlerinin tespiti için PCR primerleri antibiyotiğe spesifik primerler ile PCR yöntemiyle test edildi. Antibiyotik direnç genlerine ait fasta dosyaları NCBI veri tabanından elde edildi. Sonrasında primer 3 programında primer tasarımı yapıldı.

PCR için kullanılan metot evrensel olmakla birlikte çalışılan laboratuvarın kendi optimizasyon sistemi ile gerçekleştirilmiştir.

PCR için, reaksiyon karışımları 0,2 µL polimeraz enzimi (Vivantis), 10 µL PCR miks (Diagen, Türkiye) 5 µL (0,5 µM F+R, Biomers Almanya), son hacmi 20 mL'ye getirmek için 5 mL genomik DNA'dan oluşmaktadır. PCR, Veriti (ABI, Amerika) ile gerçekleştirildi. Reaksiyon, 95°C'de 10 dk'lık bir denatürasyon aşamasıyla başlatıldı. PCR'de sıcaklık döngüleri 95°C'de 30 saniye, ardından 55°C'de 1 dk ve 72°C'de 1 dk'dan oluşmuş ve her döngü 40 kez tekrarlanmıştır. Son döngüyü, reaksiyon karışımının 72°C'de 10 dk inkübasyonu takip etti.

Çizelge 2.2. AMEG Kategorizasyonunun Özeti (EMA, 2019).

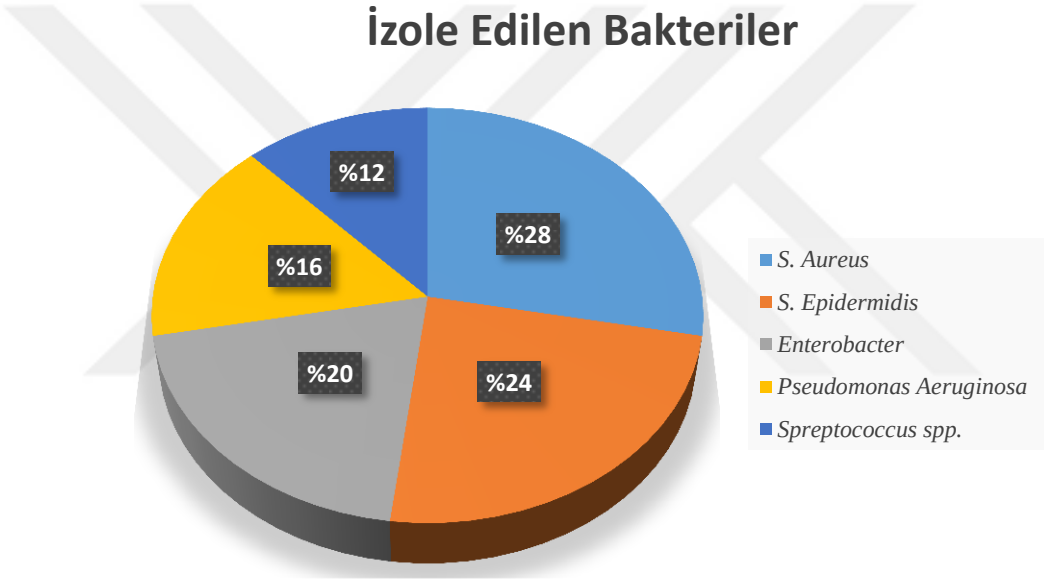
AMEG Kategorileri	Antibiyotik Sınıfları	Örnek Antibiyotik/Ler
Kategori A	Amdinopenisilinler	Mesillinam, Pivmesillinam
	Karbapenemler	Meropenem, İmipenem
	Diğer Sefalosporinler* ve Penemler, 3. Nesil Sefalosporinlerin Beta-laktamaz İnhibitörleriyle Kombinasyonları Dahil	Seftobiprol, Ceftarolin, Seftolozan-Sulbaktam
	Glikopeptitler	Vankomisin
	Glisilisiklinler	Tigesilin
	Ketolidler	Telitromisin
	Lipopeptitler	Daptomisin
	Mononaktamlar	Aztreonam
	Oksazolidinonlar	Linezolid
	Penisilinler: Karboksipenisilinler ve Üreidopenisilinler, Beta-laktamaz İnhibitörleriyle Kombinasyonlar Dahil	Piperazolin-Tazobaktam
	Fosfonik Asit ve Derivasyonları	Fosfomisin
	Pseudomonik Asitler	Mupirosin
	Rifampisinler	Rifampisin
	Riminofenazinler	Klofazimin
	Streptograminler	Pristinamisin
	Sülfonlar	Dapson
	Yalnızca Tüberküloz veya Diğer Mikobakteriyel Hastalıkları Tedavi Etmek İçin Kullanılan İlaçlar	İzoniasid,Etambutol, Pirazinamid
	AMEG Kategorizasyonunun Yayınlanmasının Ardından Beşeri Tıpta Yeni Yetkilendirilen Maddeler.	Belirlenecek
Kategori B	Sefalosporinler: 3. ve 4. Kuşak (Beta-laktamaz ve Kombinasyon Hariç)	Seftiofur,Sefovesin, Sefkuinom, Sefepim, Seftriakson
	Polimiksinler	Kolistin, Polimiksin B
	Kinolonlar	Enrofloksasin, Siprofloksasin, Oflaksasin
Kategori C	Aminoglikozidler (Spektinomisin Hariç)	Streptomisin, Gentamisin
	Aminopenisilinlerin Beta-laktamaz İnhibitörleriyle Kombinasyonu	Amoksisilin- Klavulanik Asit,
	Amfenikoller	Florfenikol, Tiamfenikol
	Sefalosporinler 1. Ve 2. Kuşak	Sefaleksin, Sefapirin
	Makrolidler	Tilosin, Tiloritromisin
	Linkozamidler	Klindamisin, Linkomisin
	Rifampisinler: Sadece Rifaksimin	Rifaksimin
Kategori D	Beta-laktamaz İnhibitörleri Olmadan Aminopenisilinler	Ampisilin, Amoksisilin
	Siklik Polipeptitler	Basitrasin
	Nitrofuran Derivasyonları*	Furozolidon
	Nitroimidazoller	Metronidazol
	Penisilinler: Anti-Stafilokok Penisilinler (Beta-laktamaz Dirençli Penisilinler)	Benzilpenisilin
	Aminoglikozidler: Sadece Spektinomisin	Spektinomisin
	Steroid Antibakteriyaller	Fusidik Asit
	Sülfonamidler,Dihidrofolat Redüktaz İnhibitörleri Ve Kombinasyonları	Sülfadiazin,Trimetoprim
	Tetrasiklinler	Oksitetrasiklin, Doksisiliklin

Çizelge 2.3. Real-time qPCR standartlarını üretmek için kullanılan primerler

Hedef gen	Primer adı	Primer sekans (5'➔3')
mcr-1	colistin_mcr_1-F	GTCCGTTTGTTCTTGTGG
	colistin_mcr_1-R	GTCTGTAGGGCATTTTGG
mcr-2	colistin_mcr_2-F	GTATTCTGTGCCGTGTATG
	colistin_mcr_2-R	GTATTGTTGGTTGCTGATTT
mcr-3	colistin_mcr_3-F	GCCTCATTTTGATTGGTTTC
	colistin_mcr_3-R	TAAGTTTGGTTTCGCCATTT
mcr-4	colistin_mcr_4-F	CCCGAACACTAAACCTAAC
	colistin_mcr_4-R	AAACATACAGGGTAGAGACA
mcr-5	colistin_mcr_5-F	ACTGATTCTGCTTGCTGT
	colistin_mcr_5-R	TCATTACCGCTTGTTTCC
van-A	Vancomycin_vanA-F	GATACAGGAAACGGCAAAAA
	Vancomycin_vanA-R	CATCATACGGGGATAACGA
van-B	Vancomycin_vanB-F	GCTTACCTACCCTGTCTTT
	Vancomycin_vanB-R	AATCAAATCATCCTCGTTCC
IMIP	Imipenem-F	GAGTGGCTTAATTCTCRATC
	Imipenem-R	AACTAYCCAATAYRTAAC
penA	Ceftriaxone-F	CGCAACCGTGCCGTT
	Ceftriaxone-R	GGGTATTGAATGTGTCTGTTGGA
gyr-A	Ciprofloxacin_gyrA_Salmonella-F	CAATAGAACCGAAGTTACCC
	Ciprofloxacin_gyrA_Salmonella-R	GGCAATGACTGGAACAAA
gyr-B	Ciprofloxacin_gyrA_Escherichia-F	GGCAATGACTGGAACAAA
	Ciprofloxacin_gyrA_Escherichia-R	GATAGAACCGAAGTTACCC
mec-A	Methicillin_MecA-F	GCAGTTATTGGTAAAAAGGGA
	Methicillin_MecA-R	GTTTGAGGGTGGATAGCA
amp-C	Cefepime_ampC-F	TTCTTGTCTACTTTTATCCCC
	Cefepime_ampC-R	ACTGCTATTTACGGCTTTTT
OXA-1	Amoxicillin+clavulanic acid_OXA1-F	TTTTCTGTTGTTTGGGTTTC
	Amoxicillin+clavulanic acid_OXA1-R	CTATGGTGTTTTCTATGGCT

3. BULGULAR

Antibiyogram ve bakteriyolojik analizlerde elde edilen bakterilerden baskın olanlar; *Enterococcus spp, Staphylococcus spp., Streptococcus spp., Pseudomonas aeruginosa* olarak belirlendi. Çalışmada kullanılan 25 kulak sıvabı numunesi kendine ait barkotlar ile isimlendirildi. Bu numunelerden *Enterobacter spp*. 5 hastada, *Streptococcus spp*. 3 hastada, *S.epidermidis* 6 hastada, *S.aureus* 7 hastada, *P.aeruginosa* 4 hastada izole edilmiştir (Şekil 3.1), (Çizelge 2.4). Tespit edilen direnç genleri her bir köpek için ırk, yaş, cinsiyet ve kg ağırlıklarına göre Çizelge 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. İzole edilen bakteriler ve oranları

Çizelge 3.1. İzole edilen baskın bakteri sayıları ve oranları

Bakteri Türleri	İzole Edilen Bakteri Sayısı (%)	İzolatların Oranı
S. aureus	7	28
S. epidermidis	6	24
Enterobacter spp.	5	20
Pseudomonas aeruginosa	4	16
Streptococcus spp.	3	12

İzole edilen bakteri türlerine göre dirençlilik durumu değerlendirildiğinde; *S.aureus* izole edilen tek bir örnek dışında tüm örneklerden izole edilen bakterilerin kolistine karşı dirençli olduğu bulundu. Tüm numunelerden izole edilen bakterilerin sefepim ve seftriakson'a karşı duyarlı olduğu belirlendi. *Enterobacter spp*. izole edilen tüm numuneler imipenem'e dirençliyken, *Streptococcus* türlerinin %60'ının, *S.epidermidis*'in %33'ünün, *S.aureus*'un %71'inin ve *P.aeruginosa*'nın %75'inin dirençli olduğu tespit edildi.

Bir başka antibiyotik grubu olan amoksisilin klavulanik asit için izole edilen *Enterobacter spp*.'lerin %40'ı, *Streptococcus spp*.'lerin %33'ü, *S. epidermidis*'in %33'ü, *S.aureus*'un %16'sı ve *P. aeruginosa*'nın %50'sinin dirençli olduğu bulundu.

Vankomisin dirençliliği elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, izole edilen *Enterobacter spp*.'lerin %20'si, *Streptococcus spp*.'lerin %66'sı, *S.epidermidis*'in %33'ü, *S.aureus*'un %16'sı ve *P. aeuruginosa*'nın %25'inin dirençli olduğu belirlendi.

Metisilin direnci elde edilen sonuçlara göre değerlendirildiğinde; izole edilen *Enterobacter spp*.'lerin %80'i, *Streptococcus spp., S. epidermidis* ve *S. aureus*'un tamamı ve *P. auruginosa*'nın %50'sinin dirençli olduğu tespit edildi.

Siprofloksasin için ise izole edilen *Streptococcus spp*.'lerin %33'ünün, *S. aureus*'un %14'ünün, *Enterobacter spp*,'lerin %60'ının, *S. epidermidis*'in %33'ünün ve *P. auruginosa*'nın %50'sinin dirençli olduğu bulundu.

Çizelge 3.2. Numune alınan köpek ırkları, özellikleri, baskın bakteri türü ve tespit edilen antibiyotik direnç genler

Sayı	**Köpek Irkı**	**Yaş-kilo-Cinsiyet**	**Baskın mikroorganizma**	**Tespit edilen direnç genleri**
1	Belçika Çoban	4 yaş- 35 kg-Dişi	*Pseudomonas aeruginosa*	*mcr-4, gyr-A*
2	Beagle	3 yaş- 17 kg-erkek	*Pseudomonas aeruginosa*	*mcr-4, Amp-C,gyr-A, pen-A, Van-B, mec-A*
3	Yorkshire Terrier	5 yaş- 3 kg-erkek	*Staphylococcus aureus*	*mcr-3, mcr-4, Pen-A*
4	Basset Hound	10 yaş- 36 kg-erkek	*Staphylococcus. epidermidis*	*Amp-C, Gyr-A, Gyr-B, OXA-1*
5	Golden Retrıever	10 yaş- 33 kg-erkek	*Pseudomonas aeruginosa*	*MCR-3, AMP-C, GYR-A, GYR-B*
6	Alman Kurdu	7 yaş- 30 kg-erkek	*Enterobacter spp.*	*mcr-4, Amp-C, Gyr-A, Gyr-B, Pen-A, Van-B, Mec-A*
7	Pug	8 kg- 4 yaş- dişi	*Enterobacter spp.*	*mcr-1, mcr-5, Mec-A*

Çizelge 3.2. Devam. Numune alınan köpek ırkları, özellikleri, baskın bakteri türü ve tespit edilen antibiyotik direnç genler

8	Akita	36 kg- 1 yaş- erkek	*Streptococcus spp.*	*mcr-3, mcr-4, mcr-5, amp-C, gyr-A, gyr-B, Oxa-1, Pen-A, Mec-A*
9	Cocker	10 kg- 7 yaş- erkek	*Staphylococcus epidermidis*	*mcr-1, mcr-5, gyr-A, gyr-B, Pen-A, Oxa-1, Van-B, Mec-A*
10	Golden Retrıever	28 kg- 13 yaş- dişi	*Staphylococcus aureus*	*Amp-C, Gyr-A, Gyr-B, Pen-A, Mec-A*
11	Maltese Terrier	2,5 kg- 4 yaş- dişi	*Enterobacter spp.*	*mcr-3, Gyr-A, Oxa-1, Pen-A*
12	Cocker	9 kg- 11 yaş- erkek	*Staphylococcus epidermidis*	*mcr-1, mcr-3, mcr-4, Amp-C, gyr-A*
13	Bernese	6 yaş- 50 kg- dişi	*Staphylococcus aureus*	*amp-C, oxa-1, Pen-A, Gyr-A, Van-B*
14	Şivava	7 yaş-1.5 kg- erkek	*Staphylococcus aureus*	*Gyr-A, Gyr-B, Pen-A*
15	Golden Retriever	3 yaş- 28 kg- erkek	*Staphylococcus epidermidis*	*MCR-3, AMP-C, GYR-A, Pen-A, Van-B, Mec-A*
16	Golden Retriever	3 yaş- 33 kg- dişi	*Staphylococcus aureus*	*Gyr-A, Van-B, Mec-A*
17	King Charles	10 yaş- 15 kg- erkek	*Enterobacter spp.*	*mcr-1, Amp-C*
18	Yorkshire Terrier	7 yaş- 2 kg- erkek	*Staphylococcus aureus*	*mcr-3, mcr-5, gyr-A, Pen-A, Van-B, Mec-A*
19	Golden Retriever	3 yaş- 25 kg- dişi	*Streptococcus spp.*	*mcr-1, Amp-C, Oxa-1*
20	Golden Retriever	10 yaş- 33 kg- dişi	*Pseudomonas aeruginosa*	*mcr-3, mcr-5, gyr-A, Gyr-B, Pen-A*
21	Melez Köpek	2 yaş- 23 kg- dişi	*Staphylococcus epidermidis*	*mcr-5, Amp- C, Mec-A*
22	Golden Retriever	13 yaş- 40 kg- dişi	*Staphylococcus aureus*	*Amp-C, Gyr-A, Pen-A*
23	Kangal	1 yaş-45 kg- erkek	*Enterobacter spp.*	*Mcr-3, Mcr-5, Gyr-A*
24	Golden Retriever	9 yaş- 35 kg- dişi	*Streptococcus spp.*	*mcr-4, Gyr-A, Oxa-1, Pen-A, Mec-A*
25	Cocker	5 yaş- 11 kg- dişi	*Staphylococcus epidermidis*	*mcr-3, mcr-4, mcr-5, Amp-C, Gyr-A, Pen-A*

Direnç geni araştırılan 8 antibiyotik dışında kalan antibiyotikler için de antibiyogram yapılarak dirençlilik değerlendirildi. Çizelge 3.2'de bu antibiyotikler için numunelerin dirençlilikleri değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.3. 25 hastadan alınan örneklerin 40 adet antibiyotik için direnç ve duyarlıkları. (Çizelge içerisindeki dirençlilik: R, duyarlılık: S, ara duyarlılık: I olarak gösterilmiştir. Bu değerler CLSI 20.. Kılavuzunda verilen duyralılık ve dirençlilik oranları esas alınarak değerlendirilmiştir).

Antibiyotikler	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
Aminosidin	I	R	S	R	R	R	R	R	R	I	R	R
Amoksisilin klavulanik asit	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	I	I
Amoksisilin	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ampisilin kloksasisilin	R	R	I	R	R	I	R	R	R	I	I	R
Ampisilin sulbaktam	R	I	S	R	R	I	R	I	R	S	I	I
Sefepim	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Sefazolin	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R
Sefkuinom	R	R	I	R	R	R	R	R	R	I	R	R
Seftriakson	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Kloramfenikol	R	R	I	R	R	R	R	R	R	S	R	I
Klaritromisin	I	R	S	I	R	R	R	R	I	I	R	I
Klindamisin	R	R	R	R	R	I	R	I	R	I	I	R
Kloksasilin	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R
Kolistin	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I
Danofloksasin	I	S	S	I	R	S	I	I	I	S	I	S
Doksisiklin	R	I	S	I	R	I	I	S	R	I	S	R
Siprofloksasin	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R
Eritromisin	R	R	I	R	R	I	R	R	R	I	R	I
Florfenikol	I	I	S	R	R	I	R	I	I	S	I	I
Fosfomisin	S	S	S	S	I	R	R	R	R	S	I	S
Gentamisin	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S	R	S
İmipenem	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R
Kanamisin	R	I	I	I	R	R	I	R	R	I	R	R
Linkomisin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R
Marbofloksasin	S	S	S	I	S	S	I	I	S	S	S	S
Metronidazol	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Metisilin	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
Neomisin	R	I	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R
Oksitetrasiklin	I	I	S	I	R	R	I	R	R	S	R	I
Penisilin G	R	R	I	R	R	I	I	I	R	I	R	R
Sefaleksin	R	I	I	R	R	R	S	I	R	S	I	I
Spektinomisin	R	R	I	I	R	I	I	R	R	I	R	R
Vankomisin	R	R	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S
Streptomisin	R	R	I	R	I	I	I	R	R	S	R	R
Sulfadiazine	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Trimetoprim sulfametaksazol	I	S	S	I	R	I	R	I	I	S	I	S
Sülfametaksazol	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Tetrasiklin	R	R	I	R	R	R	I	R	R	I	R	I
Tilmikosin	I	I	S	S	R	I	I	I	I	S	S	I
Trimetoprim	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R

Çizelge 3.3. Devam. 25 hastadan alınan örneklerin 40 adet antibiyotik için direnç ve duyarlıkları.

Antibiyotikler	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**	**23**	**24**	**25**
Aminosidin	I	I	R	R	R	R	R	R	I	R	I	R	R
Amoksisilin klavulanik asit	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S
Amoksisilin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ampisilin kloksasisilin	I	I	I	R	R	R	R	R	I	I	I	R	S
Ampisilin sulbaktam	S	S	S	I	I	S	R	R	S	R	R	R	S
Sefepim	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Sefazolin	R	I	I	R	R	I	R	R	I	I	S	S	I
Sefkuinom	I	I	I	I	R	I	R	R	R	I	S	I	I
Seftriakson	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Kloramfenikol	I	S	S	R	I	R	R	R	I	S	I	R	R
Klaritromisin	S	S	I	R	R	R	I	I	R	S	R	I	R
Klindamisin	I	R	R	R	R	I	I	R	S	R	I	I	R
Kloksasilin	I	I	S	I	I	R	R	I	R	I	S	R	R
Kolistin	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	I
Danofloksasin	S	S	S	I	S	I	I	I	I	S	R	S	I
Doksisiklin	I	S	S	R	I	I	I	R	I	R	R	R	I
Siprofloksasin	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	R	S	R
Eritromisin	I	S	I	R	R	I	R	R	R	S	R	I	R
Florfenikol	I	S	S	I	R	S	I	I	R	I	R	R	S
Fosfomisin	S	S	S	I	R	S	I	I	R	I	R	R	I
Gentamisin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
İmipenem	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S
Kanamisin	R	I	I	R	R	R	I	R	R	R	R	I	R
Linkomisin	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	I	I	R
Marbofloksasin	S	I	S	R	S	S	I	S	S	S	R	S	S
Metronidazol	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Metisilin	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R
Neomisin	I	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	R	I
Oksitetrasiklin	I	I	S	R	R	S	R	R	I	I	R	R	I
Penisilin G	R	I	I	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R
Sefaleksin	S	S	S	R	S	S	I	R	R	S	R	I	I
Spektinomisin	I	S	S	R	R	I	I	R	R	S	I	I	I
Vankomisin	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R
Streptomisin	I	S	I	R	R	R	R	R	I	I	R	I	I
Sulfadiazine	R	I	I	R	R	I	R	R	I	I	I	R	R
Trimetoprim sulfametaksazol	S	S	S	R	I	I	R	I	S	S	R	R	R
Sülfametaksazol	R	I	R	R	R	R	R	R	I	I	I	R	R
Tetrasiklin	I	I	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	I
Tilmikosin	S	S	S	R	I	S	I	I	R	S	I	I	S
Trimetoprim	I	I	I	R	R	R	R	R	R	I	R	R	I

Direnç geni bakılmayan ve yalnızca antibiyogram sonuçlarına göre dirençlilik ve duyarlılıkları tespit edilen antibiyotiklerde her numunede aynı grup antibiyotiklerden farklı sonuçlar gözlenmiştir. Aynı bakteri izolasyonu yapılan numunelerde de aynı antibiyotiğe karşı oluşan dirençlilik ve duyarlılığın farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. En çok izole edilen bakteri türleri olan, *Enterobacter spp., Streptococcus spp., S. epidermidis, S. aureus, P. aeruginosa* suşları için her numune aminoglikozid grubu antibiyotikler grubunda olan aminosidin antibiyotiği için dirençli bulunmuştur. Bu gruptan bir diğer antibiyotik olan gentamisin için 21 numune duyarlı 4 numune dirençli, kanamisin antibiyotiğine tüm örnekler dirençli, nemomisin için 1 örnek duyarlı 24 örnek dirençli, spektinomisin için 3 örnek duyarlı 22 örnek dirençli ve son olarak bu gruptan streptomisin için 2 örnek duyarlı 23 örnek dirençli bulundu.

Sefalosporin grubundan klinik alanda en yaygın kullanılan sefazolin, sefkuinom ve sefaleksin için de antibiyogram yapılmıştır. Sefazolin için yalnızca 2 örnek duyarlı bulunmuş, 23 örneğin dirençli olduğu tespit edilmiştir. Sefkuinom antibiyotiğine duyarlılık sadece 1 örnekte tespit edilmiş olup, 24 tanesi dirençli bulunmuştur. Sefaleksin için 9 numune duyarlı 16 numune dirençli tespit edilmiştir. Fenikoller grubu antibiyotiklerden olan kloramfenikol ve florfenikol antibiyogramda değerlendirilmiştir. Her iki antibiyotik de pet hayvanlarında yaygın kullanılmayan antibiyotikler olup, dirençlilik duyarlılık paternleri sonuçlar değerlendirildiğinde kloramfenikol için 4 numune duyarlı 21 numune dirençli bulundu. Florfenikol için 6 numune duyarlı 21 numune dirençli bulundu. Makrolid grubu antibiyotiklerden klaritromisine karşı 4 örnek duyarlı 21 örnek dirençli, eritromisine karşı 2 örnek duyarlı 23 örnek dirençli, tilmikosine karşı 10 örnek duyarlı 15 örnek dirençli tespit edildi. Linkozamidler grubundan olan klindamisin için 1 numune için duyarlılık tespit edilirken, yine aynı gruptan olan linkomisin için tüm numuneler dirençli tespit edildi. Tüm numunelerde beta laktam grubu antibiyotiklerinden olan amoksisilin için dirençlilik değerlendirildiğinde her numune bu antibiyotiğe karşı dirençli bulunmuştur. Ampisilin kloksasilin için dirençlilik değerlendirildiğinde 24 numunenin dirençli sadece 1 tanesinin duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Ampisilin-sulbaktam için 25 numunenin 9'u duyarlı, 16'sı dirençli bulunmuştur. Kloksasilin için yalnızca 1 numunede duyarlılık bulunmuştur. Penisilin G'ye tüm örnekler dirençli bulunmuştur. Kinolon grubu antibiyotiklerden danofloksasin için 11 duyarlı 14 dirençli, marbofloksasin için 19 duyarlı 6 dirençli örnek tespit edildi. Tetrasiklin grubundan doksisiklin için 5 örnek duyarlı, 20 örnek dirençli, oksitetrasiklin için 4 örnek duyarlı 21 örnek dirençli ve tetrasiklin için 3 örnek duyarlı 22 örnek dirençli tespit edildi. Yeni bir fosfonik antibiyotik sınıf üyesi olan fosfomisine karşı 10 örnek duyarlı, 15

örnek dirençli bulundu. Nitroimidazol grubu olan metronidazol için tüm örneklerde dirençli tespit edildi. Sülfonamid grubu antibiyotiklerden olan sülfadiazin ve sülfametaksazol için tüm numuneler dirençli bulunurken sülfametaksazol-trimetoprim için 7 duyarlı 18 dirençli numune tespit edildi. (Çizelge 3.2).

Yapılan PCR analizlerinde, hiçbir örnekte IMIP (blaIMP), mcr-2 ve Van- A genleri tespit edilemezken diğer tüm genler analiz edilebildi. Alınan örneklerde en az 3 en fazla 12 gen tespiti yapılan numuneler bulundu. Direnç geni yönünden de incelenen amoksisilin klavulanik asit için dirençlilik numune bazında farklılık göstermiş olup, detayları yukarıda ifade edilen, toplam 17 numune duyarlı bulundu (Çizelge 3.2). Amoksisilin klavulanik asit için *OXA-1* geni araştırılmış olup, amoksisilin klavulanik asite karşı dirençli tespit edilmiş ancak direnç geni gözlenmemiş numuneler tespit edildi. Toplamda 7 örneğin *OXA-1* geni taşıdığı belirlendi (Çizelge 3.2). *P. aeruginosa, Enterobakter spp., S. aureus, S. epidermidis* izole edilen 4 örneğin *OXA-1* geni taşımadığı ancak amoksisilin-klavulanik asite dirençli olduğu tespit edildi. Kolistin dirençliliği ile ilişkili *mcr* genleri 6 örnek haricinde tüm numunelerde tespit edildi. Kolistin için duyarlı bulunan tek numune olan 18 nolu örnekte kolistin için bakteri direnç genleri qPCR ile *mcr-3* ve *mcr-5* olarak tespit edildi. Diğer tüm örneklerin disk difüzyon yöntemi ile incelendiğinde kolistine karşı dirençli olduğu bulundu ancak gen tespiti sağlanamadı. Antibiyogram sonuçlarında tüm numunelerin sefepim ve seftriaksona karşı duyarlı olduğu tespit edilirken bu numunelerden 7 tanesinde *Amp-C* geni, 15 tanesinde ise *Pen-A* geni tespit edildi. İmipenem antibiyotiği için 7 numune duyarlı bulunurken diğer tüm örnekler dirençli bulundu. Ancak hiçbir numunede bla*IMP* geni tespit edilmedi. Vankomisine karşı 17 örnek duyarlı bulunurken, 8 örnek dirençli bulundu. Bununla birlikte 7 örnekte *Van-B* geni tespit edildi. *Van-A* geni hiçbir örnekte tespit edilmedi. Gen tespiti yapılan örneklerde vankomisin duyarlı olan mikroorganizmaların da *Van-B* geni taşıdığı görüldü. Metisiline karşı 3 örnek duyarlı bulundu. 11 örnekte ise *mec-A* geni tespit edildi. Duyarlı bulunan bir örnekte de *mec-A* geni tespit edildi. Siprofloksasine karşı 9 örnek dirençli bulundu. Dirençli bulunan örneklerin tamamında *gyr* genleri tespit edildi. Bunların 2 tanesinde her iki (*gyr-A, gyr-B*) gen de tespit edilirken diğerlerinde sadece *gyr-A* geni bulundu. Hem her iki genin de tespit edildiği hem de dirençli olan numuneler arasında izole edilen bakteri türü ve hayvan benzerliği açısından anlamlı bir fark bulunamadı (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. İzole edilen bakteri gruplarının taşıdığı direnç genleri ve ilgili antibiyotiklere karşı dirençlilik/duyarlılık oranları (R:dirençli, S:duyarlı)

Bakteri Türleri	Antibiyotikler	Dirençli izolatların sayısı	Dirençli izolatların oranı (%)	Tespit edilen genler	Analiz edilen genlerin oranı (%)	R/S oranı
S. aureus	Seftriakson	0	0	*Pen-A*	85	0
	Siprofloksasin	1	14	*gyr-A/gyr-B*	71/28	0,16
	Kolistin	6	85	*mcr-3, mcr-4, mcr-5*	28/14/14	6
	Vankomisin	1	14	*van-B*	42	0,16
	Metisilin	7	100	*mec-A*	42	tanımsız
	Amoksisilin Klavulanik Asit	1	14	*Oxa-1*	14	0,16
	İmipenem	4	57	Tespit edilmedi	0	0,5
	Sefepim	0	0	*Amp-C*	42	0
S. epidermidis	Seftriakson	0	0	*Pen-A*	50	0
	Siprofloksasin	2	33	*gyr-A/gyr-B*	83/33	0,5
	Kolistin	6	100	*mcr-1/mcr-3/ mcr-4/mcr-5*	33/50/33/50	tanımsız
	Vankomisin	2	33	*van-B*	33	0,5
	Metisilin	6	100	*mec-A*	50	tanımsız
	Amoksisilin Klavulanik Asit	1	16	*Oxa-1*	16	0,16
	İmipenem	2	33	Tespit edilmedi	0	0,5
	Sefepim	0	0	*Amp-C*	83	0
Enterobacter spp.	Seftriakson	0	0	*Pen-A*	40	0
	Siprofloksasin	3	60	*gyr-A/gyr-B*	60/25	1,5
	Kolistin	5	100	mcr-1/mcr-3/ mcr-4/mcr-5	40/20/20/40	tanımsız
	Vankomisin	1	20	*van-B*	20	0,25
	Metisilin	4	80	*mec-A*	40	4
	Amoksisilin Klavulanik Asit	2	40	*Oxa-1*	20	1,5
	İmipenem	5	100	Tespit edilmedi	0	tanımsız
	Sefepim	0	0	*Amp-C*	40	0
Streptococcus spp.	Seftriakson	0	0	*Pen-A*	66	0
	Siprofloksasin	1	33	*gyr-A/gyr-B*	66/33	0,5
	Kolistin	3	100	*mcr-1/mcr-3/ mcr-4/mcr-5*	33/33/66/33	tanımsız
	Vankomisin	2	66	Tespit edilmedi	0	2
	Metisilin	3	100	*mec-A*	66	tanımsız
	Amoksisilin Klavulanik Asit	1	33	*Oxa-1*	100	0,5
	İmipenem	2	66	Tespit edilmedi	0	2
	Sefepim	0	0	*Amp-C*	66	0
Pseudomonas aeruginosa	Seftriakson	0	0	*Pen-A*	50	0
	Siprofloksasin	3	75	*gyr-A/gyr-B*	100/50	3
	Kolistin	4	100	*Mcr-3/mcr-4/mcr-5*	50/50/25	tanımsız
	Vankomisin	1	25	*van-B*	25	0,3
	Metisilin	4	100	*mec-A*	25	tanımsız
	Amoksisilin Klavulanik Asit	2	50	Tespit edilmedi	0	1
	İmipenem	3	75	Tespit edilmedi	0	3
	Sefepim	0	0	*Amp-C*	50	0

4. TARTIŞMA

Dünya Sağlık Örgütü 2024 yılı verilerine göre öncelikli patojenler listesine yer alan ve halk sağlığı önlemleri için; kritik, yüksek ve orta öncelik kategorilerine göre gruplandırılmış 15 antibiyotiğe dirençli patojen grupları belirlenmiştir. Kritik grupta; karbapenem dirençli *Acinetobacter baumannii*, 3. kuşak sefalosporinlere ve karbapenemlere direçli *enterobakter* grubu mikroorganizmalar ve rifampisin dirençli *Mycobacterium tuberculosis* olarak belirlenmiştir. Bunların direnç genlerini aktarma yetenekleri ve neden oldukları hastalıkların ciddiyeti sebebiyle özellikle düşük ve orta gelirli ülkelerde kritik öncelikli olarak listelendiği belirtilmiştir. Yüksek öncelikli grupta; Florokinolon dirençli *Salmonella typhi* ve *Shigella*, karbapenem dirençli *P. aeruginosa*, metisilin dirençli *S. aureus*, vankomisin dirençli *E. faecium* ve 3. kuşak sefalosporin dirençli *Neisseria gonorrhoeae* bakterilerinin yer aldığı belirtilmiştir. Orta öncelikli grupta ise Grup A (makrolid dirençli) ve B (penisilin dirençli) *Streptococci*, makrolid dirençli *Streptococcus pneumoniae* ve ampisilin dirençli *Haemophilus* bakterlerinin yer alığı belirtilmiştir (WHO, 2024). Bu çalışmada da DSÖ verileri göz önünde bulundurulduğunda kritik grupta yer alan *Enterobacter* türleri (%20) yüksek öncelikli grupta yer alan *S.aureus* (%28) ve *P.aeruginosa* (%16), orta öncelikli grupta yer alan *Streptococcu*s (%12) türleri belirtilen oranlarda tespit edildi.

Uluslararası düzeyde, antimikrobiyal direncin (AMR) ortaya çıkışını ve yayılmasını kontrol ederken bulaşıcı hastalıklara yönelik etkili bir tedavi oluşturabilmek amacıyla antibiyotikler için çeşitli sınıflandırma sistemleri geliştirilmiştir. Antimikrobiyalleri sınıflandırmak için kullanılan çeşitli yaklaşımlar arasında Avrupa ülkelerinde en çok tanınan sistemler; DSÖ, Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (WOAH) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) olarak belirtilmiştir (European Medicines Agency, 2024). DSÖ antimikrobiyalleri 3 gruba ayırmıştır. Bunlar; kritik öneme sahip antimikrobiyaller (CIA), çok önemli antimikrobiyaller (HIA) ve önemli antimikrobiyaller (IA) olarak belirtilmiştir (WHO, 2019). WOAH tarafından Veterinerlik Açısından Öneme Sahip Antimikrobiyal Ajanlar Listesi 2018 yılında revize edilmiş olup, bu revizyon sırasında terminolojisinin DSÖ sınıflandırma şemasına uyarlandığı belirtilmiştir (WOAH, 2024). Bu sınıflandırmalar içerisinde hayvan ve insan sağlığı için kritik antimikrobiyaller; kinolonlar/florokinolon (örn. danofloksasin, difloksasin, enrofloksasin, ibafloksasin, marbofloksasin, orbifloksasin ve pradofloksasin), makrolidler ve ketolitler (tulatromisin, eritromisin, spiramisin, tilosin, tilmikosin, tildipirosin, tilvalosin ve

gamitromisin), 3./4. nesil sefalosporinler (sefoperazon, seftiofur, sefovesin ve sefkuinom), polimiksinler (kolistin, polimiksin B) ve glikopeptitler (vankomisin, teikoplanin) olarak belirtilmiştir.

WOAH, bu antimikrobiyallerin koruyucu amaçla veya birinci basamak tedavi olarak kullanılmaması gerektiğini ve kullanımlarının mikrobiyolojik kültür ve antimikrobiyal duyarlılık testi sonuçlarına dayanması gerektiğini belirtmektedir. Bu çalışmada kritik antimikrobiyal grupları içerisinde yer alan antibiyotiklere yer verilmiştir ve antibiyogram sonuçlarına göre değerlendirilmiştir (Çizelge 3.2).

Polimiksinler, veteriner hekimlikte hem pet hayvanlarında hem de gıda amacıyla yetiştirilen hayvanlar için yaygın olarak kullanılmaktadır. Türkiye'de çiftlik hayvanları için ruhsatlı 18 müstahzarı olduğu bilinmektedir. Günümüzde çeşitli kaynaklardan elde edilen bilgilerle toplam 10 *mcr* varyantı (mcr-1 ila mcr-10) olduğu bildirilmiştir (Hamame vd., 2022). *mcr* genlerinin keşfinden birkaç yıl sonra, direnç genleri dünya çapında yayılmış ve insanlarda, hayvanlarda, gıdalarda ve çevrede, bazıları zoonotik vakalarda olduğu rapor edilmiştir (Dandachi vd., 2018; Yajol vd., 2014). Kolistin direnç genlerinin hayvanlarda insanlardan daha fazla tespit edildiği ileri sürülmüştür (Algalmmal vd., 2020). Bu nedenle hayvanların, mobil kolistin direnç genlerinin *(mcr*) aktarımında çok önemli bir rol oynayabildiği tahmin edilmektedir.

mcr gen aktarımının oluşma ihtimalinin daha fazla olduğu izolatların çoğunlukla enteropatojenik *E. coli* ve *Salmonella* sp. olduğu ifade edilmiştir (Kempf vd., 2016). Güney Kore'den 2018 ve 2019 yıllarında evcil hayvanlardan toplanan dışkı ve idrar örneklerinden elde edilen *E. coli* izolatlarında mobil kolistin direnç geni *mcr-1*'in varlığının tespit edildiği belirtilmiştir. İshalli bir köpekten izole edilen *E. coli* izolatının, florokinolonlar ve üçüncü kuşak sefalosporinler de dahil olmak üzere birçok antimikrobiyale karşı ek direnç sergilediği belirtilmiştir. Güney Kore'de yapılan bu çalışmanın evcil hayvanlarda *E.coli* tespit edilen vakalarda ilk *mcr* geni tespiti olduğu belirtilmiştir (Moon vd., 2020). Çin'de domuz çiftliğinde yaşayan köpeklerde yapılan bir çalışmada; dışkı, burun ve rektal sürüntülerden alınan örneklerde *E. coli* ve *Klebsiella pneumonia* izolatlarının bulunduğu ve bunlarda *mcr*-1 genin varlığının tespit edildiği belirtilmiştir (Lei vd., 2017).

Çin'de 2015 yılında ilk olarak tanımından bu yana, kolistin direnç geni mcr-1 dünya çapında insanlardan, gıda üreten hayvanlardan ve gıdalardan elde edilen izolatlarda rapor

edilmektedir (Liu vd., 2016). Ayrıca, yakın zamanda Belçika'da çiftlik hayvanları ile ilişkili *E. coli*'de yeni bir varyant olan *mcr*-2 tespit edildiği ifade edilmiştir (Xavier vd., 2016). Daha sonra yapılan çalışmalarda ise *mcr*-3, *mcr*-4 ve *mcr*-5 genlerinin *E.coli*, *Salmonella* ve *P. aeruginosa* şuşlarına karşı kolistin direnci araştırmasında tespit edildiği bilinmektedir (Boroviak vd., 2020; Ma vd., 2018; Yin vd., 2017). *mcr*-6 ve *mcr*-7 dışında diğer tüm *mcr* genlerinin çeşitli çalışmalarda köpeklerden rapor edildiği belirtilmiştir (Wang vd., 2021).

Köpeklerde otitis eksterna vakalarından elde edilen sonuçlara göre bu çalışmada bildiğimiz kadarıyla ilk defa *mcr* genlerinin tespiti sağlanmıştır. *mcr*-1 geni 25 hastanın %20'sinde tespit edilirken, *mcr*-3 geni %40 oranında, *mcr*-4 geni %32 oranında, *mcr*-5 geni %32 oranında tespit edildi. *mcr-2* geni ise hiçbir hastada tespit edilmedi. Yapılan çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda kolistin dirençliliğinde rol oynayan genlerin tespiti evcil hayvan grubu olan köpeklerde ilk kez bu kadar ayrıntılı olarak incelenmiş ve tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda köpeklerde tespit edilen *mcr* genlerine sahip köpeklerin bu geni taşıyacak bakterilerle temasta olabileceği olasılıklar değerlendirilmiştir. Ancak bu çalışmada yer alan hastaların çiftlik hayvanları ile bir arada olmadığı, herhangi bir hayvanın gaitası ile temasta olmadığı, kuru mama ile beslendiği, günde 2 ya da 3 kez dışarı çıktığı ve bu alanların site bahçesi olduğu bilgileri hasta sahiplerinden öğrenilmiştir. Bu bağlamda; *mcr* genlerinin hem bakteri çeşitliliği yönünden hem de köpeklerde otitis eksternaya sebep olabilecek bakterilerin bu gene sahip olması yönünden değerlendirildiğinde yapılan çalışmalara göre daha çok veri elde edilmiştir.

Güney Kore'de köpeklerdeki otitis eksterna vakalarında yapılan bir çalışmada; 197 *Enterococcus* izolatı arasında *E. faecalis*'in (%48,7) en yaygın olarak bulunduğu, bunu *E. faecium* (%21,3), *E. casseliflavus* (%11,7), *E. hirae* (%10,7), *E. avium* (%3,6), *E. gallinarum* (%2,5), *E. canintestini* (%1,0) ve *E. durans*'ın (%0,5) takip ettiği gösterilmiştir. Toplam 16 vankomisine dirençli *Enterococcus* izolatı (5 *E. faecalis*, 5 E. *faecium*, 2 *E. avium*, 2 *E. gallinarum*, 1 *E. casseliflavus* ve 1 *E. hirae*) tanımlandığı belirtilmiştir (Kwon vd., 2022). Mevcut çalışmada ise 5 örnekte tespit edilen enterokok suşlarının sadece birinde vankomisin dirençliliği (%20) ve bu örneğin de *van-B* direnç genini taşıdığı tespit edilmiştir. Kwon ve arkadaşlarına göre *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus*'un, doğası gereği vankomisine dirençli enterokoklar olduğu (VRE) ve bu türlerin yüksek oranda korunmuş bir genom bölgesinde glikopeptit direnç geni C'ye (*vanC*) sahip olduğu ileri sürülmüştür. Böylece Otitis eksterna

durumunda bu direnç özelliğinin önemi vurgulanmış ve düşük düzeyli antibiyotik direnci göz önüne alındığında etkili tedavi için hedef bölgeye yeterli antibiyotik konsantrasyonunda ulaşılması gerektiği yorumu yapılmıştır. Bununla birlikte, tedavi stratejisi açısından bakıldığında, kulak kanallarında yüksek antibiyotik konsantrasyonlarının sürdürülmesi zor olduğundan, bu antibiyotiğe dirençli bakteriler muhtemelen direncin uyarılmasına ve yeniden enfeksiyona katkıda bulunabileceği dşünülmektedir. Bu çalışmada vankomisin direnci gösteren 7 örneğin, izole edilen bakteri türleri dikkate alınmaksızın, %42.8'inde *vanB* geni tespit edilmiş ve 40 antibiyotik için antibiyogram analizi yapıldığı için tedavi seçeneği olarak en uygun antibiyotik seçimi sağlıklı bir şekilde sağlanabilmiştir.

Bu çalışmada otitis eksterna klinik tablosu gösteren köpeklerden alınan örneklerden elde edilen bulgularda vankomisin dirençliliği 25 hastanın %28'inde tespit edildi ve bu hastalardan izole edilen bakteri türlerinden vankomisine dirençli olanlar; *Enterobacter spp*., *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus spp*., *P. aeruginosa* olarak belirlendi. Bu bakterilerin vankomisin direnç genleri *vanA* ve *vanB* olacak şekilde incelendi. *VanA* genine hiçbir örnekte rastlanmazken elde edilen 3 vankomisin geni *vanB* olarak bulundu. Bu bağlamda vankomisin direnç geni aktarımı değerlendirildiğinde; genellikle *Enterobacter spp*.'lerinin dışkıyla taşındığı ve aktarıldığı bilindiğinden (Wang vd., 2021), kulak kanalından tespit edilen enterobakter türlerinin, bağırsak kanalından daha az yoğunlukta olabileceği gerçeği bulunduğundan gen tespitinin, her bakteride bulunamadığı yorumu çıkarılmaktadır.

İmipenem direncinin değerlendirilmesi birçok çalışmada köpeklerde inatçı kulak enfeksiyonlarının yaygın bir etkeni olan *P. aeruginosa* üzerinde çalışılmıştır; Malezya'da 2005 ila 2008 yılları arasında Tıp Fakültesi Hastanesinden rastgele toplanan 90 imipenem dirençli *P. aeruginosa* (IRPA) klinik izolatı, metallo-β-laktamaz (*MBL*) genlerinin farklı varyantlarının varlığı açısından değerlendirilmiş ve bu araştırmada ilk kez $_{bla}$*IMP*, $_{bla}$*VIM* genlerinin araştırıldığı belirtilmiştir (Khosravi vd., 2010). Çin'de 2013 yılında evcil hayvanlarda karbapenem dirençli Gram-negatif bakterilerin rutin sürveyans çalışması yapılarak ve çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa* izolatlarından $_{bla}$*IMP* geni araştırılmış ve sonuç olarak, insan klinik örneklerinden *P. aeruginosa* izolatlarından elde edilen genler ile köpeklerden elde edilen $_{bla}$*IMP-45* geninin genetik ortamının yüksek düzeyde benzerlik gösterdiği için bu gen aktarımının kaynağının insanlar olduğu sonucunun çıkartıldığı belirtilmiştir (Wang vd., 2014).

Bu çalışmada kulak kanalından alınan örneklerde *P. aeruginosa* tespit edilen numunelerin hepsinin imipenem dirençli olduğu tespit edildi. Çeşitli bakteriler izole edilen 25 örneğin %72'sinde imipenem dirençliliği tespit edilirken bu örneklerin hiçbirinde *blaIMP* geni tespit edilemedi. Bu duruma benzer bulgular içeren Çin'de yapılan bir çalışmanın sonucunda ortaya çıkan bilgilere göre; karbapenemlerin hayvanlarda kullanımının onaylanmadığı ve hayvanlarda bulunan karbapenemaz genlerinin çoğunun, çoklu dirençli integronların veya çoklu dirençli gen bölgelerinin bir parçası olduğunun, diğer antimikrobiyallerin uyguladığı seçici baskı altında karbapenemaz genlerinin birlikte seçilmesi ve birlikte aktarılmasının gösterildiği göz önüne alındığında farklı direnç genlerinin, karbapenemaz genlerinin yayılmasında önemli bir rol oynadığına dikkat çekilmiştir (Wang vd., 2015). Ayrıca Manhattan Kansas Eyalet Üniversitesi'nde yapılan bir çalışmanın verilerine göre; *P aeruginosa* izolatlarının %15-23'ünde karbapenem antibiyotiklerine duyarlılık olmadığı rapor edilmiştir (KuKanich vd., 2022).

Bu çalışmada ve örnek çalışmalarda görüldüğü üzere *P. aeruginosa'ya* karşı imipenem dirençliliği tespit edildi. DSÖ'nün yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi için öncelikli patojenler listesinin kritik grubunda yer alan kabapenemlere dirençli *P. aeruginosa'*ya yer vermiş olması, hayvan ve insan sağlığı açısından önem arz etmekte ve bu tezdeki bulguları destekler nitelikte değerlendirilmiştir (WHO, 2017).

Tahran Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde otitis eksterna olgularından alınan örneklerle yapılan bir çalışmanın sonuçlarına göre izole edilen tüm *Staphylococcus* türlerinin seftriaksona karşı düşük dirence sahip olduğu belirtilmiştir. Genel olarak izole edilen Gram negatif bakterilerin, seftriaksona düşük dirençli olduğu bulunmuştur (Zamankhan Malayeri vd., 2010). Bu çalışmada ise izole edilen tüm bakterilerin seftriaksona karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Ancak 15 numunede *PenA* geni bulunmuştur. Seftriakson dirençliliği ile yapılan birçok çalışmada *PenA* geni araştırılmamış olup bu tez ilk örneği teşkil ettiğinden dolayı, gen tespiti yapılan numunelerin hatalı olma ihtimali değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada direnç geninin araştırıldığı siprofloksasin için 25 numunenin %36'sında dirençlilik tespit edilirken diğer numunelerden elde edilen bakterilerin duyarlı olduğu tespit edildi. Alınan örneklerde *gyrA* ve *gyrB* genleri araştırıldı. Köpeklerde otitis eksternadan elde edilen bakterilerde bildiğimiz kadarıyla ilk kez bu genlerin araştırılması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarda *gyrA* geni %56 *gyrB* geni ise %52 oranlarında tespit edilmiştir. Her iki genin birden tespit edildiği numune sayısı 8 adettir. Dirençlilik tespit

edilmeyen numunelerde de *gyrA* ve *gyrB* genlerinin tespiti yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre siprofloksasin direnci *Streptococcus spp*.'lerin %33'ünde, *S. aureus*'un %14'ünde, *Enterobacter spp*.'lerin %60'ında, *S. epidermidis*'in %33'ünde ve *P. auruginosa*'nın %50'sinde tespit edilmiştir.

Güney Kore'de yapılan benzer bir çalışmada farklı florokinolon grubu antibiyotiklerin köpeklerde direnç geliştirme durumu araştırılmış ve sonuçlarda *P. aeruginosa* suşu elde edilen numunelerde en az direncin siprofloksasin için bulunduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada otitis eksternalı köpeklerden izole edilen florokinolon dirençli *P. aeruginosa*'da hem *gyrA* hem de *parC* genlerinde yeni QRDR mutasyonları tespit edildiği belirtilmiştir (Park vd., 2020). Genel olarak bu çalışma, evcil köpeklerde psödomonal enfeksiyonların tedavisinde florokinolon ajanlarının uygunsuz kullanımına ilişkin bir uyarı sunmaktadır.

Bu çalışmada en sık izole edilen bakteriler arasında yer alan *S. epidermidis, Enterobacter spp., Streptococcus spp., S. aureus* ve *P. aeruginosa* türleri için metisiline dirençlilik ve duyarlılıkları rapor edildi. *S. aureus* izole edilen örneklerde %14,2, *S. epidermidis* içeren örneklerde %50, *P. aeruginosa* içeren örneklerde %25, *Enterobakter spp.* içeren örneklerde %40 ve *Streptococcus spp.*, tespit edilen numunelerin hepsinde *mecA* geni tespit edildi. Metisiline duyarlı olarak sadece 3 örnek tespit edildi ve bu örneklerin hepsinde *mecA* geni tespit edildi. Bu duyarlı bulunan örneklerde izole edilen bakteri türleri *Enterobacter spp* (1) ve *P. aeruginosa*'dır (2). Yapılan bir araştırmada metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) suşlarının çoğunun beta-laktamlara karşı da duyarlı olduğu iddia edilmektedir (Paul vd., 2010). Bu çalışmada ise 40 farklı antibiyotik dirençliliği incelenmiş ve metisilin duyarlı olan 3 örneğin diğer beta laktam antibiyotiklere karşı da duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Bu durumda metisilin duyarlılığı tespit edilen numunelerin hepsinde *mecA* geninin bulunmuş olması, *mecA* geninin direnç mekanizmasında kendi başına rol almadığının göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Dördüncü kuşak bir sefalosporin olan sefepimin, çok çeşitli Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı geniş bir etki spektrumuna sahip olduğu belirtilmiştir. Güney Kore'de yapılan bir çalışmada kedi ve köpeklerden izole edilen *P. aeruginosa*'nın antimikrobiyal direnci araştırılmış ve klinik belirtileri olan 710 köpek ve 21 kediden toplam 45 (%6,2) *P. aeruginosa* izole edildiği belirtilmiştir. Bu çalışma sonuçlarına göre sefepime direnç %44,4 oranında görülürken bunu ofloksasin (%22,2), levofloksasin (%17,8),

norfloksasin (%8,9), siprofloksasin (%6,7), seftazidim, aztreonam, kolistin, polimiksin B ve gentamisin (%4,4) takip ettiği ifade edilmiştir (Cho vd., 2021). Bu çalışmada örneklerden elde edilen tüm bakteri türleri sefepime karşı duyarlı bulundu. Numunelerin %26'sında *ampC* geni tespit edildi ve izole edilen tüm bakteri türlerinde gözlendi. Böylece sefepimin etki spektrumu ve dirençliliği göz önünde bulundurulduğunda elde edilen sonuçların diğer çalışmaların sonuçlarıyla tutarlı olduğu düşünülmektedir.

ABD Veteriner okullarının hastanelerindeki köpek ve kedilerde antibiyotik kullanım yaygınlığını tespit etmek ve yaygın olarak reçete edilen antibiyotikleri, kullanım endikasyonlarını ve enfeksiyonlara verdikleri yanıtları belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmanın sonuçlarına göre; hem profilaktik olarak hem de yatışta ve reçeteli tedavilere %62 oranında amoksisilin klavulaik asitin tercih edildiği belirtilmiştir (Beaudoin vd., 2023). Sıklıkla tercih edilen amoksisilin klavulanik asitin direçlilik değerlendirmesi, birçok çalışmada yapılmıştır. Sırbistan'daki Novi Sad Üniversitesi Veterinerlik Bölümü Küçük Hayvanlara Yönelik Veteriner Kliniklerinde köpek otitis eksternasında en sık izole edilen bakterilere yönelik yapılan antibiyogram sonuçlarında; S. *pseudointermedius*'un penisiline ve amoksisiline en çok direnç gösterdiği (%74) ancak amoksisilin klavulanik asite en düşük direnç gösterdiği tespit edilmiştir (%10). Aynı çalışmada en çok izole edilen bir başka bakteri olan ve bu çalışmada da %16 oranında dördüncü sırada yer alan *P. aeruginosa* bakterisi için amoksisilin klavulanik asitin %100 oranında dirençli bulunduğu belirtilmiştir (Tesin vd., 2023). Bu çalışmada *P. aeruginosa* izole edilen numunelerin amoksisilin klavulanik asite karşı %50'si dirençli ve %50'si duyarlı bulunmuştur. Otitis externa vakalarında antibiyotik ve dirençlilik araştırılan çalışmaların çoğunda olduğu gibi bu örnek çalışmada da gen analizi sağlanmamış olup, ortak etken olan *P. aeruginosa* bakterisi için *OXA-1* geni hiçbir örnekte tespit edilmemiştir.

Danimarka'da yapılmış bir çalışmada köpeklerden alınan çeşitli örneklerden izole edilen bakterilerin çeşitli antibiyotiklere karşı direnci değerlendirilmiş ve bu çalışmanın sonuçlarında amoksisilin klavulanik asite karşı tüm bakterilerin duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada amoksisilin klavulanik asite karşı direnç tespit edilmemesi şaşırtıcı bulunsa da bu ilaç kombinasyonunun uzun yıllardır köpekler için çok sık kullanması ile direnç mekanizmalarının artması ihtimali olduğundan sonuçlar umut verici olarak değerlendirilmiştir (Pedersen vd., 2007).

Bu çalışmada 25 adet köpeğin kulak kanalından alınan örneklerde amoksisilin klavulanik asit için izole edilen bakteri dirençliliği değerlendirildiğinde; *Enterobacter spp.* tespit edilen numunelerden %40'ı dirençli %60'ı duyarlı, *Streptococcus spp*. tespit edilen 4 numunenin %66,6'sının duyarlı %33,3'ü dirençli, *S. epidermidis* tespit edilen 6 numunenin %33,3'ü dirençli %66,6'sı duyarlı, *S. aureus* tespit edilen 7 numunenin %14,2'si dirençli %85,7'si duyarlı, *P. aeruginosa* izole edilen numunelerin %50'si dirençli %50'si duyarlı bulundu. Hem dirençli hem de duyarlı bulunan numunelerde *OXA-1* geni tespit edildi.

5. SONUÇ

Önerilen projenin konusu dış kulak enfeksiyonu şikayetiyle veteriner kliniklerine getirilen köpeklerden sahibinden onay alınması ve onam formu imzalatılması koşuluyla kulak sürüntüsü alınarak enfeksiyona neden olan bakteri/leri tespit etmek, enfeksiyona neden olan bakterileri antibiyograma tabi tutarak direnç ve duyarlılık profillerini tespit etmek, ayrıca kulak sürüntüsünde dirençliliğe neden olabilecek seçilen direnç genlerinin araştırılmasıdır. Kulakta enfeksiyona neden olmayan bakterilerde de direnç geni olabileceği ve bu genlerin aynı ortamda yaşayan insanlara da geçebileceği öngörüldüğünden konu hem hayvan hem de halk sağlığını yakından ilgilendirmektedir.

Enfeksiyona neden olan bakterilerin antibakteriyellere duyarlı/dirençli olduğunun belirlenmesi tedavide hangi antibiyotiğin kullanılması gerektiğinin bilinmesi açısından önem taşımaktadır. Bunun dışında çalışmanın diğer amaçlarından biri olan kulaktaki antibakteriyel dirençlilik genlerinin belirlenmesiyle bu genlerin aynı ortamda yaşayan ve onlara temas eden insanlara da geçebileceği bilindiğinden, en azından köpeklerle temas eden ve onlarla birlikte yaşayan insanların hangi tehlikelere maruz kalabilecekleri konusunda uyarılar yapılabilecek, böylece farkındalık arttırılabilecektir.

Yapılan çalışmada Otitis externa olduğu tespit edilen 25 köpekten alınan kulak sürüntülerinde *Enterobacter spp., Streptococcus spp., S. epidermidis, S. aureus, P. aeruginosa* bakteri türleri tespit edilmiştir. Böylece en azından Ankara'da yerleşik köpeklerin kulak enfeksiyonlarına en fazla neden olan bakterilerin stafilokoklar olduğu tespit edilmiştir. Direnç genleri incelenen antibiyotiklerden, örneklerin hepsinin duyarlı bulunduğu seftriakson ve sefepimi sırasıyla en az direnç tespit edilen vankomisin (18), amoksisilin klavulanik asit (17) siprofloksasin (15) takip etti. Yapılan PCR analizlerinde, hiçbir örnekte $_{bla}$*IMP, mcr-2* ve *Van- A* genleri tespit edilemezken diğer tüm genler her örnekte en az 3 en fazla 12 adet tespit edilebilmiştir. Bu sonuçlara göre çalışmanın anlamlı kabul edilebilecek verilere ulaştığı ve direncin köpekler arasında da oldukça yaygın olabileceği gözlenmiştir. Böylece mevcut araştırmadan köpeklerde otitis eksternaya neden olan ve hijyen koşullarına paralel olarak her ülkede farklı olması muhtemel patojenler belirlenerek klinik vakaların hangi antibiyotiklerle tedavi edilebileceği belirlenmiş ayrıca hayvanlardan insanlara veya insanlardan hayvanlara geçebilen direnç genleri konusunda bilgi sahibi olunmuştur.

Sonuç olarak AMR ile mücadele etmek için “Tek Sağlık” yaklaşımını (insan, hayvan, bitki ve çevre sağlığı) desteklemek önemlidir. Bu da küresel değişimi hızlandırmayı, geleceği güvence altına almak için yenilik yapmayı, daha etkili eylemler için iş birliği yapmayı, sürdürülebilir girişimciliğe yatırım yapmayı, küresel yönetimi ve hesap verebilirliği güçlendirmeyi gerektirir. Birçok antimikrobiyal hem hayvan hem de insanlarda kullanılmaktadır. AMR, antimikrobiyaller yalnızca sağaltım ve nadiren profilaksi amacıyla kullanıldığında ve asla büyümeyi hızlandırmak için kullanılmadığında azaltılabilir. AMR ile mücadelenin başarısı için tıbbi uygulamada kullanılan antimikrobiyal sınıflarının ve miktarlarının sıkı ve verimli bir şekilde kontrol edilmesi ve çevreye yayılan dirençli bakterilerin çoğalmasının izlenmesi ve kontrol edilmesi gerekir.

KAYNAKLAR

Abraham, E.P. and Chain E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature,* 146:837.

Algammal, A.M., Hetta, H.F., Elkelish, A., Alkhalifah, D.H.H., Hozzein, W.N., Batiha, G.E.S., El Nahhas, N. & Mabrok, M.A. (2020). Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA): One Health Perspective Approach to the Bacterium Epidemiology, Virulence Factors, Antibiotic-Resistance, and Zoonotic Impact. *Infect. Drug Resist,* 13(1),3255.

Ameyama, S., S. Onodera, M. Takahata, S. Minami, N. Maki, K. Endo, H. Goto, H. Suzuki & Y. Oishi. (2002). Mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 gene (penA) in clinical isolates of Neisseria gonorrhoeae with reduced susceptibility to cefixime. *Antimicrob. Agents Chemother*, 46, 3744-3749.

Arthur, M., Molinas, C. & Courvalin, P. (1992). The VanS-VanR two-component regulatory system controls synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in Enterococcus faecium BM4147. *J. Bacteriol.*, 174, 2582–2591.

Arthur, M., Depardieu, F., Reynolds, P. & Courvalin, P. (1993). Quantitative analysis of the metabolism of soluble cytoplasmic peptidoglycan precursors of glycopeptide-resistant enterococci. *Mol. Microbiol.*, 21, 33–44.

Aslam, B., Wang, W., Arshad, M.I., Khurshid, M., Muzammil, S., Nisar, M.A., Alvi, R.F., Aslam, M.A., Qamar, M.U. & Salamat, M.K.F. (2018). Antibiotic resistance: A rundown of a global crisis. *Infect. Drug Resist,* 11, 1645–1658.

Ayinalem, G., Gelaw, B., Belay, A. & Linjesa, J. (2013). Drug use evaluation of ceftriaxone in medical ward of Dessie Referral Hospital, North East Ethiopia. *Int J Basic Clin Pharmacol*, 2(6), 711-717.

Ayliffe, G.A.J. (1997). The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Clin. Infect. Dis*. 24, 74–79.

Awosile, B.B., Mcclure, J.T., Saab, M.E. & Heider, L.C. (2018). Antimicrobial resistance in bacteria isolated from cats and dogs from the Atlantic Provinces, Canada from 1994-2013. *Can. Vet. J.*, 59,885–893.

Beaudoin, A.L., Bollig E.R., Burgess, B.A., Cohn, L.A., Cole, S.D., Dear, J.D., Fellman, C.L., Goggs, E.F., Johnston, A., Kreuder, A.J., KuKanich, K., LeCuyer, T.E., Menard, J., Reagan, K.L., Sykes, J.E., Veir, J.K., Viviano, K., Wayne, A. & Granick, J.L. (2023). Prevalence of antibiotic use for dogs and cats in United States veterinary teaching hospitals. *J. Vet. Intern. Med.*, 37(5),1864-1875.

Barriere, S.L. and Flaherty, J.F. (1984). Third-generation cephalosporins: a critical evaluation. *Clin Pharmacol*, 3(4),351–373.

Belkum, A., Braak, N., Thomassen, R. & Endtz, H. (1996). Vancomycin-resistant enterococci in cats and dogs. *Lancet*, 348,1038–1039

Barnard, F.Y. and Maxwell, A. (2001). Interaction Between DNA Gyrase And Quinolones: Effects Of Alanine Mutations At Gyra Subunit Residues Ser83 And Asp87. *Antimicrob Agents Chemother*. 45, 1994-2000.

Bhat, A.H. (2021).Bacterial zoonoses transmitted by household pets and as reservoirs of antimicrobial resistant bacteria. *Microb. Pathog*., 155,104891.

Bondi, A. and Dietz, C.C. (1945). Penicillin resistant staphylococci. *Exp. Biol. Med*. 60,55–58.

Bora, A, Sanjana, R, Jha, B.K, Mahaseth, S.N. & Pokharel, K. (2014). Incidence Of Metallo-Betalactamase Producing Clinical İsolates Of Escherichia Coli And Klebsiella Pneumoniae İn Central Nepal. *Bmc Res. Note*., 7,557.

Borowiak, M., Baumann, B., Fischer, J., Thomas, K., Deneke, C., Hammerl, J. A. & Malorny, B. (2020). Development of a novel mcr-6 to mcr-9 multiplex PCR and assessment of mcr-1 to mcr-9 occurrence in colistin-resistant Salmonella enterica isolates from environment, feed, animals and food (2011–2018) in Germany. *Front. microbiol.*, 11,80.

Bourély, C. (2019). Why do veterinarians ask for antimicrobial susceptibility testing? A qualitative study exploring determinants and evaluating the impact of antibiotic reduction policy. *Prev. Vet. Med.*, 159, 123–134.

Campoli-Richards, D.M., Monk, J.P., Price, A., Benfield, P, Todd, P.A & Ward, A. (1988). Ciprofloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs*, 35,373-447.

Catry, B., Cavaleri, M., Baptiste, K., Grave, K., Grein, K. & Holm, A. (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.

Cetinkaya, Y., Falk, P. & Mayhall, C.G. (2000). Vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Microbiol. Rev*., 13,686–707.

CLSI. (2019) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA ABD

CLSI. (2020) Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard Document 5th ed. CLSI supplement VET01S.

Couto, I., Lencastre, H., Severina, E., Kloos, W., Webster, J.A. (1996). Ubiquitous Presence Of A Meca Homologue İn Natural İsolates Of Staphylococcus. *Sciuri. Microb. Drug Resist. Mech. Epidemiol. Dis.* 2,377–91.

Dandachi, I., Chabou, S., Daoud, Z. &Rolain, J.M. (2018). Prevalence and emergence of extended-spectrum cephalosporin-, carbapenem- and colistin-resistant gram negative bacteria of animal origin in the Mediterranean basin. *Front. Microbiol*. 9,2299

De Martino, L., Nocera, F.P., Mallardo, K., Nizza, S., Masturzo, E., Fiorito, F., Iovane, G. & Catalanotti, P. (2016). An update on microbiological causes of canine otitis externa in Campania Region, Italy. *Asian Pac J Trop Biomed*. 6, 384-389.

Deshmukh, D.G, Damle, A.S, Bajaj, J.K, Bhakre, J.B. & Patwardhan, N.S. (2011). Metallo-B Lactamaseproducing Clinical İsolates From Patients Of A Tertiary Care Hospital. *JLP.*, 3,93.

European Medicines Agency. (2024, 20 Mayıs). Categorisation of Antibiotics Used in Animals Promotes Responsible Use to Protect Public and Animal Health. https://www.ema.europa.eu/en/news/categorisation-antibiotics-used-animals-promotes-responsible-use-protect-public-animal-health

Edmunds, A.L. (2017). FDA-Approved Ciprofloxacin Suspension Gel for Pediatric Otitis Media With Effusion, 42(5), 307-311.

Evans, J., Hanoodi, M. & Wittler, M.. (2023, 5 Mayıs). Amoxicillin Clavulanate https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538164/

Feßler, A. T., Schuenemann, R., Kadlec, K., Hensel, V., Brombach, J., Murugaiyan, J. & Schwarz, S. (2018). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius (MRSP) among employees and in the environment of a small animal hospital. Vet. Microbiol., 221, 153–158.

Flores-Velázquez, V.J., Rocío, P. (2021). Pseudomonas Aeruginosa: Mechanisms Of Resistance To Antibiotics And Case Analysis. *Gsc Biol. Pharm. Sci*. 14,179–188.

Food And Drug Administration Information For Healthcare Professionals (2023). Cefepime. Http://Www.Fda.Gov/Drugs/Drugsafety/Postmarketdrugsafetyınformationforpatientsandproviders/Drugsafetyınformationforheathcareprofessionals/Ucm167254.Htm

Gogry, F.A., Siddiqui, M.T., Sultan, I. & Haq, Q.M.R. (2021). Current Update on Intrinsic and Acquired Colistin Resistance Mechanisms in Bacteria. *Front. Med.*, 8,677720.

Goldstein, F.W, Pean, Y. & Gertner, J. (1995). Resistance to ceftriaxone and other beta-lactams in bacteria isolated in the community. The Vigil'Roc Study Group. *Antimicrob Agents Chemother*, 39(11), 2516-2519.

Guardabassi, L., Schwarz, S. & Lloyd, D.H. (2004). Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *J Antimicrob Chemother*, 54(2),321-32.

Hamame, A., Davoust B., Hasnaoui, B., Mwenebitu, D.L., Rolain, J.M. & Diene, S.M. (2022). Screening of colistin-resistant bacteria in livestock animals from France. *Vet Res* 53, 96.

Hariharan, H., Coles, M., Poole, D., Lund, L. & Page, R. (2006). Update on antimicrobial susceptibilities of bacterial isolates from canine and feline otitis externa. *Can. Vet. J*. 47, 253.

Hegstad, K., Mikalsen, T., Coque, T.M., Werner, G. & Sundsfjord, A. (2010). Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium. *Clin Microbiol Infect*. 16,541– 554.

Hooper, D.C. (2000). Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis.* 31: 24– 28.

Hopkins, K.L., Davies, R.H., & Threlfall, E.J. (2005). Mechanisms of quinolone resistance in Escherichia coli and Salmonella: recent developments. *International J. Antimicrob. Agents*, 25(5), 358-373.

Jacoby, G.A. (2009). Ampc Beta-Lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 22, 161-82

Jevons, MP. (1961). Resistant Staphylococci. *BMJ*., 1,124–25

Jo, H.J., Chae, H.S., Kim, H.J., Kim, M.J., Park, G.N., Kim, S.H., & Chang, K.S. (2012). High prevalence of Enterococcus *spp*. From dogs with otitis externa. *Korean J Vet Serv*, 35(2), 99-104.

Kaye, K.S., Pogue, J.M., Tran, T.B., Nation, R.L. & Li, J. (2016). Agents of Last Resort: Polymyxin Resistance. *Infect. Dis. Clin*. 30, 391–414.

Kempf, I., Fleury, M.A, Drider, D., Bruneau, M., Sanders, P., Chauvin, C., Madec, J.Y. & Jouy, E. (2013). What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceae in avian and pig production in Europe*? Int J Antimicrob Agents*, 42,379–383

Khosravi, Y., Tay, S.T., & Vadivelu, J. (2010). Metallo-β-lactamase–producing imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa clinical isolates in a university teaching hospital in Malaysia:

detection of IMP-7 and first identification of IMP-4, VIM-2, and VIM-11. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 67(3), 294-296.

KuKanich K. S., Bagladi-Swanson, M. & KuKanich, B. (2022). Pseudomonas aeruginosa susceptibility, antibiogram and clinical interpretation, and antimicrobial prescribing behaviors for dogs with otitis in the Midwestern United States. *J. Vet. Pharmacol. Ther*, 45(5), 440-449. https://doi.org/10.1111/jvp.13077

Kwon J., Ko H. J., Yang M. H., Park C. & Park S. C. (2022). Antibiotic Resistance and Species Profile of Enterococcus Species in Dogs with Chronic Otitis Externa. Vet. Sci. 9(11): 592. https://doi.org/10.3390/vetsci9110592

Lei, L., Wang, Y., Schwarz, S., Walsh, T.R., Ou, Y., Wu, Y., Li, M. & Shen, Z. (2017). mcr-1 in Enterobacteriaceae from Companion Animals, Beijing, China. *Emerg. Infect. Dis*. 23,710

Li, Y., Fernández, R., Durán, I., Molina-López, R. A., & Darwich, L. (2021). Antimicrobial resistance in bacteria isolated from cats and dogs from the Iberian Peninsula. *Front Microbiol*, 11, 3628.

Lin, D., Foley, S.L. & Qi, Y. (2012). Characterization of antimicrobial resistance of Pseudomonas aeruginosa isolated from canine infections. *J Appl Microbiol*. 113,16–23

Lister, P.D, Wolter, D.J & Hanson, N.D. (2009). Antibacterial-resistant Pseudomonas aeruginosa: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*, 22, 582-610.

Liu, C., Bayer, A., Cosgrove, S. E., Daum, R. S., Fridkin, S. K., Gorwitz, R. J. & Chambers, H. F. (2011). Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in adults and children. *Clin. Infect. Dis.*, 52(3), e18-e55.

Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B. & Huang, X. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism mcr-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis*. 16,161–168.

Livermore, D.M. (1992). Interplay of impermeability and chromosomal β-lactamase activity in imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob Agents Chemother*, 36,2046-8.

Lyskova, P., Vydrzalova, M. & Mazurova, J. (2007) Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria and yeasts isolated from healthy dogs and dogs with otitis externa. *J. Vet. Med.*, 54, 559–563.

Lu, J.J., Perng, C.L., Ho, M.F., Chiueh, T.S. & Lee, W.H. (2001). High prevalence of VanB2 vancomycin-resistant Enterococcus faecium in Taiwan. *J Clin Microbiol*. 39,2140–2145.

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. *J. Antimicrob. Chemother*., 73(7), 1777-1780.

Makita, K., Sugahara, N., Nakamura, K., Matsuoka, T., Sakai, M. & Tamura, Y. (2021). Current Status of Antimicrobial Drug Use in Japanese Companion Animal Clinics and the Factors Associated With Their Use. *Front. Vet. Sci*. 8,1119

Marchou, B, Michea-Hamzehpour, M, Lucain, C. & Pechere, J.C. (1987). Development Of Beta-Lactam-Resistant Enterobacter Cloacae İn Mice, *J Infect Dis*. 156, 369-73.

Makgotlho, P.E., Kock, M.M., Hoosen, A., Lekalakala, R., Omar, S., Dove, M. & Ehlers, M.M. (2009). Molecular identification and genotyping of MRSA isolates. *Immunol. Med. Microbiol*, 57, 104–115

Meyer, E., Schwab, F., Schroeren-Boersch, B. & Gastmeier, P. (2010). Dramatic increase of third-generation cephalosporin-resistant E. coli in German intensive care units: secular trends in antibiotic drug use and bacterial resistance, 2001 to 2008. *Crit Care*, 14(3), 1-9.

Moellering, R.C. (2012). MRSA: the first half century. *J. Antimicrob. Chemother*. 67,4–11.

Morris, D.O. (2010) Medical therapy of otitis externa and otitis media. *J Small Anim Pract.*, 34, 541–555

Neu, H.C., Meropol, N.J. & Fu, K.J. (1981). Antibacterial activity of ceftriaxone (Ro 13-9904), a beta-lactamase-stable cephalosporin. *J. Antimicrob. Chemother* 19,3.

Novović, K. and Jovčić B. (2023). Colistin Resistance in Acinetobacter baumannii: Molecular Mechanisms and Epidemiology. *Antibiotics*, 12(3), 516.

Olaitan, A.O, Morand, S. & Rolain, J.M (2016) Emergence of colistin-resistant bacteria in humans without colistin usage: a new worry and cause for vigilance. *Int J Antimicrob Agents*, 47,1–3

Pai, H, Kang, C.I. & Byeon, J.H. (2004). Epidemiology And Clinical Features Of Bloodstream İnfections Caused By Ampc-Type-Beta-Lactamase-Producing Klebsiella Pneumoniae. *Antimicrob Agents Chemother*. 48, 3720-8

Papich, M. In, Papich, M.G (2011). Vancomycin. Saunders Handbook of Veterinary Drugs. 3rd ed. St. Louis: *Elsevier Saunders* 1,798-800.

Parasana, D.K., Makwana, P.M., Shobha, K., Prakruti, J.P. & Irshadullakhan, H.K. (2023). Isolation and Identification of Corynebacterium Species from cases of skin and ear infection of dogs. *Int. J. Vet. Sci. Anim. Husb.*, 8, (6): 31-33.

Park, Y.S., Yoo, S, Seo, M.R., Kim, J.Y., Cho, Y.K. & Pai, H. (2009). Risk Factors And Clinical Features Of İnfections Caused By Plasmid-Mediated Ampc Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents*. 34,38-43.

Paterson, S. (2016). Discovering the causes of otitis externa. In Practice. *Focus*, 7-11.

Paul, M., Zemer-Wassercug, N., Talker, O., Lishtzinsky, Y., Lev, B., Samra, Z. & Bishara, J. (2011). Are all beta-lactams similarly effective in the treatment of methicillin-sensitive Staphylococcus aureus bacteraemia? *CMI*, 17(10), 1581-1586.

Pedersen, K., Pedersen, K., Jensen, H., Finster, K., Jensen, V. F. & Heuer, O. E. (2007). Occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from diagnostic samples from dogs. *Antimicrob Agents Chemother*, 60(4), 775-781.

Pe´rez-Moreno, M., Carulla, M., Rubio, C., Jardı´ A.M. & Zaragoza, J. (2004). Mechanisms of reduced susceptibility to amoxycillin–clavulanic acid in Escherichia coli strains from the health region of Tortosa (Catalonia, Spain) *CMI*, 10, 234-241

Pogue, J.M., Ortwine, J.K. & Kaye, K.S. (2017). Clinical considerations for optimal use of the polymyxins: A focus on agent selection and dosing. *CMI.*, 23(4), 229–233.

Quinn, P.J. Markey, B.K., Leonard, F.C., Hartigan, P., Fanning, S. & Fitzpatrick, E.S. (2011). *J. Vet. Med*. Wiley-Blackwell: Chichester.

Rubin, J.E., Walker, R.D. & Blickenstaff, K. (2008). Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone resistance of Pseduomonas aeruginosa isolated from canine infections. *Vet Microbiol*. 131, 164–172.

Schnepf, A., Kramer, S. Wagels, R. Volk, H.A. & Kreienbrock, L. (2021). Evaluation of Antimicrobial Usage in Dogs and Cats at a Veterinary Teaching Hospital in Germany in 2017 and 2018. *Front. Vet. Sci*. 8, 689018.

Schwarz, S., Johnson, A.P. (2016). Transferable resistance to colistin: a new but old threat. *J. Antimicrob. Chemother*. 71,2066–2070

Sekizuka, T., Niwa, H., Kinoshita, Y., Uchida-Fujii, E., Inamine, Y. and Kuroda, K. (2020). Identification of a mecA/mecC-positive MRSA ST1-t127 isolate from a racehorse in Japan. *J. Antimicrob. Chemother*, 75,292–295.

Serizawa, M., Sekizuka, T., Okutani, A., Banno, S., Sata & T., Inoue. (2010). Genomewide screening for novel genetic variations associated with ciprofloxacin resistance in Bacillus anthracis. *Antimicrob. Agents Chemother*, 54, 2787-2792.

Shahhat M. S. A., Gaballa E. A. E. Y., Rohman E., Abd R. Z., Mohammed M. N., Yassin A. S. (2021). Association between mutations in GyrA/B and ParC/E genes of Acinetobacter baumannii clinical isolates and fluoroquinolones resistance. *Microbes Infect. Dis*. 2(2):343-351.

Skinner, D. and Keefer, C.S. (1941). Significance of bacteremia caused by Staphylococcus aureus: a study of one hundred and twenty-two cases and a review of the literature concerned with experimental infection in animals. *Arch. Intern. Med*. 68,851–75

Sousa, J.C., Carneiro, G. Peixe, M.L., Qeiros, M.L. & Rebelo, I. (1991). Characterization of beta-lactamases encoded by pathogenic strains of Escherichia coli from Portugal. *J Antimicrob Chemother*, 14, 437-440

Strateva, T. and Yordanov, D.P. (2009). Pseudomonas aeruginosa – a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol*. 58,1133–1148.

Sutherland, R. (1995). β-Lactam/β-lactamase inhibitor combinations: antibacterial activity and clinical applications. *Infection*, 23, 191-200

Tesin, N., Stojanovic, D., Stancic, L., Kladar, N. & Ružíc, Z. (2023). Prevalence of the microbiological causes of canine otitis externa and the antibiotic susceptibility of the isolated bacterial strains. *Pol. J. Vet. Sci.*, 26(3),449-459.

Tony, T., Blake, H.S. & Patrick, M.Z. (1988). Ciprofloxacin.

Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C.A. & Vollmer, W. (2012). From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol*,10,123–136.

Vergis, E.N., Hayden, M.K., Chow, J.W., Snydman, D.R., Zervos, M.J., Linden, P.K., Wagener, M.M., Schmitt, B. & Murder, R.R., (2001). Determinants of vancomycin resistance and mortality rates in enterococcal bacteremia: A prospective multicenter study. *Ann. Intern. Med*. 135,484–492.

Von Silva-Tarouca, M.S.E., Wolf, G. & Mueller, R.S. (2019).Determination of Minimum Inhibitory Concentrations for Silver Sulfadiazine and Other Topical Antimicrobial Agents against Strains of Pseudomonas aeruginosa Isolated from Canine Otitis Externa. *Vet. Dermatol*,30, 145

Wang, G., Liu, H., Feng, Y., Zhang, Z., Hu, H., Liu, J., Qiu, L., Guo, Z., Huang, J. & Qiu, J. (2021). Colistin-resistance mcr genes in Klebsiella pneumoniae from companion animals. *J. Glob. Antimicrob. Resist*. 25, 35–36

Wang, Y., Wang, X., Schwarz, S., Zhang, R., Lei, L., Liu, X. & Shen, J. (2014). IMP-45-producing multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa of canine origin. *J Antimicrob Chemother*, 69(9), 2579-2581.

WHO (2019). Critically Important Antimicrobials for Human Medicine 6th revision. IGO licence CC BY-NC-SA 3.00 IGO.

WHO (2024, 14 Haziran). Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics Are Urgently Needed. https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed

Wiegand, S., Berner, R., Schneider, A., Lundershausen, E. & Dietz, A. (1988). Otitis Externa. Dtsch Arztebl. 116, 224-234.

WOAH (2024, 14 Haziran). WOAH List of Antimicrobials of Veterinary Importance. https://www.woah.org/app/uploads/2021/06/a-oie-list-antimicrobials-june2021.pdf

World Health Organization (2021). World Health Organization model list of essential medicines: 21st list 2019. Geneva: World Health Organization.

Wynd M.A. and Paladino J. (1996) Cefepime: A Fourth-Generation Parenteral Cephalosporin. *Ann. Pharmacother.*, 30: 1414-1424

Xavier, B.B., Lammens, C., Ruhal, R., Kumar-Singh, S., Butaye, P., Goossens, H. & Malhotrakumar, S. (2016). Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in Escherichia coli, Belgium. *Euro. Surveill*. 21,30280.

Zamankhan Malayeri, H., Jamshidi, S., Zahraei Salehi, T. (2010). Identification and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria causing otitis externa in dogs. *Vet. Res. Commun*, 34: 435-444. https://doi.org/10.1007/s11259-010-9417-y