

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANA BİLİM DALI



**SAĞLIKLI TAVUK DİŞKILARINDAN VE ÇEVRESEL  
MATERYALLERDEN İZOLE EDİLEN *ESCHERICHIA COLI*  
SUŞLARININ KOLİSTİN VE ÇOKLU ANTİBİYOTİK  
DİRENÇLİLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE  
GENOTİPLENDİRİLMESİ**

Doktora Tezi

**Ali SERDAR**

Danışman  
**Prof. Dr. Arzu FINDIK**

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırmaları Destekleme Kurulu Tarafından PYO.VET.1904.20.26 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN  
2024

## TEZ KABUL VE ONAYI

Ali SERDAR tarafından, Prof. Dr. Arzu FINDIK danışmanlığında hazırlanan “SAĞLIKLI TAVUK DIŞKILARINDAN VE ÇEVRESEL MATERYALLERDEN İZOLE EDİLEN *ESCHERICHIA COLI* SUŞLARININ KOLİSTİN VE ÇOKLU ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE GENOTİPLENDİRİLMESİ” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 13.02.2024 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

|        | Unvanı Adı Soyadı<br>Üniversitesi<br>Ana Bilim/Ana Sanat Dalı                                              | Sonuç                                                                     |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Başkan | Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ<br>Ondokuz Mayıs Üniversitesi<br>Veterinerlik Mikrobiyolojisi Ana<br>Bilim Dalı     | <input checked="" type="checkbox"/> Kabul<br><input type="checkbox"/> Ret |
| Üye    | Prof. Dr. Arzu FINDIK<br>Ondokuz Mayıs Üniversitesi<br>Veterinerlik Mikrobiyolojisi Ana<br>Bilim Dalı      | <input checked="" type="checkbox"/> Kabul<br><input type="checkbox"/> Ret |
| Üye    | Prof. Dr. Ertan Emek ONUK<br>Ondokuz Mayıs Üniversitesi<br>Su Ürünleri Hastalıkları Ana<br>Bilim Dalı      | <input checked="" type="checkbox"/> Kabul<br><input type="checkbox"/> Ret |
| Üye    | Prof. Dr. Gökçen DİNÇ<br>Erciyes Üniversitesi<br>Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim<br>Dalı                     | <input checked="" type="checkbox"/> Kabul<br><input type="checkbox"/> Ret |
| Üye    | Doç. Dr. Seyda CENGİZ<br>Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi<br>Veterinerlik Mikrobiyolojisi Ana<br>Bilim Dalı | <input checked="" type="checkbox"/> Kabul<br><input type="checkbox"/> Ret |

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ahmet TABAK  
Enstitü Müdürü

## BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet ☐ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☒

27/12/2023  
Ali SERDAR

## TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

**Tez Başlığı:** SAĞLIKLI TAVUK DIŞKILARINDAN VE ÇEVRESEL MATERYALLERDEN İZOLE EDİLEN *ESCHERICHIA COLI* SUŞLARININ KOLİSTİN VE ÇOKLU ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE GENOTİPLENDİRİLMESİ

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 27.12.2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 7

Tek kaynak oranı : % 2 çıkmıştır.

27/12/ 2023  
Prof. Dr. Arzu FINDIK

## ÖZET

### SAĞLIKLI TAVUK DIŞKILARINDAN VE ÇEVRESEL MATERYALLERDEN İZOLE EDİLEN *ESCHERICHIA COLI* SUŞLARININ KOLİSTİN VE ÇOKLU ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE GENOTİPLENDİRİLMESİ

Ali SERDAR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Veterinerlik Mikrobiyolojisi Ana Bilim Dalı

Doktora, Şubat/2024

Danışman: Prof. Dr. Arzu FINDIK

*Escherichia coli* (*E. coli*), kanatlılar da dahil olmak üzere birçok hayvan türünün bağırsak florasında bulunan kommensal bir mikroorganizmadır. Kanatlılarda klinik semptomlarla ilişkili izolatlar genellikle avian patojenik *E. coli* (APEC) olarak adlandırılır.

Kolistin, orijinal olarak spor oluşturan toprak organizması *Paenibacillus polymyxa*'dan izole edilen ve polimiksinler olarak bilinen bir antimikrobiyal ajandır. Kolistinler günümüzde insan sağlığında kullanılan son çare antimikrobiyallerden olup kolistine karşı direnç dünya çapında büyük ilgi görmektedir. Kolistin hem beşeri hem de veteriner hekimlikte yaygın olarak kullanılmakla birlikte, genellikle çoklu ilaca dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek amacıyla uygulanmaktadır.

Bu tez çalışmasında, hem insan hem de hayvan sağlığının önemli sorunlarından ve antimikrobiyal direncinin önemli örneklerinden biri olan kolistin direncinin, sağlıklı tavuk kloakal örnekleri ile beraber çevresel örneklerden de izole edilen *E. coli* suşlarındaki durumunun belirlenmesi, dirençten sorumlu bazı *mcr* genlerinin prevalansının ortaya konularak söz konusu izolatların ve dolayısıyla bu izolatların elde edildikleri tavukların kolistin direnci yönünden rezervuar olabilme potansiyellerinin belirlenmesi amaçlandı.

Bu çalışmadan elde edilen bulgular doğrultusunda, altlık, yemlik/suluklardan ve kloakal svaplardan elde edilen toplam 317 adet *E.coli* izolatının % 4,7'sinin *mcr-1*, %24,3'ünün *mcr-2*, sadece kloakal svaplardan elde edilen *E. coli* izolatlarının ise %10,1'inin *mcr-3* geni yönünden pozitif olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda toplam *E. coli* izolatının % 83,6'sında Çoklu Antimikrobiyal Direnci (MDR) tespit edildi.

Sonuç olarak, kolistin direncine sahip olan ve *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3* geni barındıran bakterilerin sağlıklı kanatlı dışkıları ile birlikte çevresel örneklerden de izole edilebiliyor olması, bu *E. coli* izolatlarının halk sağlığını tehdit edebilecek potansiyel risk olduğunu ortaya koymakta olup, bunun tek sağlık yaklaşımı ile çözülmesi gereken bir sorun olduğu açıktır. Aynı zamanda kolistin direncine sahip olan *E.coli* izolatlarının önemli ölçüde çoklu antimikrobiyal direnç profili sergilemesi, kolistin direncinin azaltılmasını destekleyen evrensel bir strateji geliştirmek için ilgili tüm uzmanlar arasında disiplinler arası bir işbirliği ve iletişimin gerekli olduğu kanısını ortaya çıkarmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** *E.coli*, Kolistin, Direnç

## ABSTRACT

### INVESTIGATION AND GENOTYPING OF COLISTIN AND MULTIPLE ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *ESCHERICHIA COLI* STRAINS ISOLATED FROM HEALTHY CHICKEN FEASTS AND ENVIRONMENTAL MATERIALS

Ali SERDAR

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Veterinary Microbiology

Ph.D., February/2024

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Arzu FINDIK

*Escherichia coli* (*E. coli*) is a commensal microorganism found in the intestinal flora of many animal species, including poultry. Isolates associated with clinical symptoms in poultry are often referred to as avian pathogenic *E. coli* (APEC).

Colistin is an antimicrobial agent originally isolated from the spore-forming soil organism *Paenibacillus polymyxa* and known as *polymyxins*. Colistin is one of the last resort antimicrobials used in human health today and resistance to colistin is of great interest worldwide. Colistin is widely used in both human and veterinary medicine, but is usually administered to treat infections caused by multidrug-resistant bacteria.

In this thesis, it was aimed to determine the status of colistin resistance, which is one of the important problems of both human and animal health and one of the important examples of antibiotic resistance, in *E. coli* strains isolated from healthy chicken cloacal samples as well as environmental samples, to determine the prevalence of some *mcr* genes responsible for resistance, and to determine the potential of these isolates and thus the chickens from which these isolates were obtained to be reservoirs in terms of colistin resistance.

In line with the findings obtained from this study, 4.7% of a total of 317 *E.coli* isolates obtained from litter, feeders and cloacal swabs were positive for *mcr-1*, 24.3% for *mcr-2* and 10,1% of *E.coli* isolates obtained only from cloacal swabs were positive for *mcr-3* gene. At the same time, Multiple Antibiotic Resistance (MDR) was detected in 83.6% of a total *E.coli* isolates.

In conclusion, the fact that colistin-resistant bacteria harboring *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3* genes can be isolated from healthy poultry feces as well as environmental samples reveals that these *E.coli* isolates are a potential risk that may threaten public health, and it is clear that this is a problem that needs to be solved with a single health approach. At the same time, *E.coli* isolates with colistin resistance exhibited a significant multi-antimicrobial resistance profile, suggesting that interdisciplinary collaboration and communication among all relevant experts is necessary to develop a universal strategy to support the reduction of colistin resistance.

**Keywords:** *E.coli*, Colistin, Resistance

## ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince her zaman bilgi ve desteğiyle yanımda olan, çalışmalarım konusunda beni yönlendirip, gereğinde motive eden ve doktora öğrenimim boyunca bana çok değerli katkılarda bulunan sayın danışman hocam Prof. Dr. Arzu FINDIK'a şükranlarımı sunuyorum.

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım süresince desteğini esirgemeyen, Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Timur GÜLHAN'a, bilgi ve tecrübeleriyle her zaman bana yol gösteren Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ'ye, Prof. Dr. Oktay GENÇ'e ve Doç. Dr. Özlem BÜYÜKTANIR YAŞ'a çalışmalarımındaki yardımları için Araş.Gör. Merve Gizem SEZENER, Dr. Volkan Enes ERGÜDEN, Veteriner Hekim Şeyda YAMAN, Veteriner Hekim Kübra KİREZ ve Veteriner Hekim Büsra YAMANOĞLU'na ve ekonomik katkıları nedeniyle Ondokuz Mayıs Üniversitesi'ne teşekkürü borç bilirim.

Doktora eğitimim süresince çalışmalarımın ilk gününden itibaren tüm çalışmalarım ve hayatımda büyük özveri ile yanımda olan sevgili eşim Gülnur SERDAR'a ve ailemize bu süreçte dahil olan biricik oğlum Mehmet Kağan SERDAR ile biricik kızlarım Mahinur Ela SERDAR ve Amine Güneş SERDAR'a minnettarlığımı sunarım.

Tüm eğitimim boyunca maddi, manevi destekleriyle beni yalnız bırakmayan, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim canım annem Ümmühan SERDAR'a ve canım babam Eyüp SERDAR'a yürekten sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, PYO.VET.1904.20.026 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

Veteriner Hekim  
Ali SERDAR

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| TEZ KABUL VE ONAYI .....                                                                              | i   |
| BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI .....                                                                  | ii  |
| TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI .....                                                            | ii  |
| ÖZET .....                                                                                            | iii |
| ABSTRACT .....                                                                                        | iv  |
| ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR .....                                                                              | v   |
| İÇİNDEKİLER .....                                                                                     | vi  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR .....                                                                         | vii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                                                 | ix  |
| TABLolar DİZİNİ .....                                                                                 | x   |
| 1. GİRİŞ .....                                                                                        | 1   |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                                                               | 4   |
| 2.1. Kolistinin İnsan ve Hayvan Hekimliğinde Kullanımı .....                                          | 6   |
| 2.2. Kolistinin Antimikrobiyal Etki Mekanizması .....                                                 | 8   |
| 2.3. Kolistin Direnç Mekanizması .....                                                                | 11  |
| 2.3.1. Doğal Direnç .....                                                                             | 12  |
| 2.3.2. Kazanılmış Direnç .....                                                                        | 13  |
| 2.3.2.1. Kromozomal Direnç .....                                                                      | 14  |
| 2.3.2.2. Plazmid Aracılı Direnç .....                                                                 | 19  |
| 2.4. Kolistin Direncinin Fenotipik ve Genotipik İdentifikasyonu .....                                 | 24  |
| 2.4.1. Fenotipik İdentifikasyon .....                                                                 | 24  |
| 2.4.2. Genotipik İdentifikasyon .....                                                                 | 25  |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM .....                                                                           | 29  |
| 3.1. Örnekler .....                                                                                   | 29  |
| 3.2. İzolasyon ve İdentifikasyon .....                                                                | 29  |
| 3.2.1. Altlık ve Yemlik-Suluk Materyallerinden İzolasyon ve İdentifikasyon .....                      | 29  |
| 3.2.2. Kloakal Swap Materyallerinden İzolasyon ve İdentifikasyon .....                                | 29  |
| 3.3. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi .....                                                            | 30  |
| 3.4. Kolistinin Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi .....               | 30  |
| 3.5. İzolatların DNA ekstraksiyonu .....                                                              | 31  |
| 3.6. Kolistin Direncinden Sorumlu <i>mcr</i> Genlerinin Belirlenmesi .....                            | 31  |
| 3.6.1. <i>mcr-1</i> Gen Varlığının Araştırılması .....                                                | 31  |
| 3.6.2. <i>mcr-2</i> Gen Varlığının Araştırılması .....                                                | 32  |
| 3.6.3. <i>mcr-3</i> Gen Varlığının Araştırılması .....                                                | 32  |
| 3.7. Genotiplendirme .....                                                                            | 32  |
| 4. BULGULAR ve TARTIŞMA .....                                                                         | 34  |
| 4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon .....                                                                | 34  |
| 4.2. İzolatların Antimikrobiyal Direnç Profilinin Belirlenmesi .....                                  | 34  |
| 4.3. <i>E.coli</i> İzolatları için Kolistinin Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Bulguları ..... | 38  |
| 4.4. Kolistin Direncinden Sorumlu <i>mcr</i> Genlerinin Belirlenmesi .....                            | 39  |
| 4.4.1. <i>mcr-1</i> Gen Varlığının Belirlenmesi .....                                                 | 39  |
| 4.4.2. <i>mcr-2</i> Gen Varlığının Belirlenmesi .....                                                 | 40  |
| 4.4.3. <i>mcr-3</i> Gen Varlığının Belirlenmesi .....                                                 | 40  |
| 4.5. Genotiplendirme .....                                                                            | 45  |
| 5. SONUÇ .....                                                                                        | 49  |
| KAYNAKLAR .....                                                                                       | 53  |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                                                        | 67  |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|            |                                                        |
|------------|--------------------------------------------------------|
| ABD        | : Amerika Birleşik Devletleri                          |
| AMEG       | : Antimikrobiyal Tavsiye Uzman Grubu                   |
| AMD        | : Antimikrobiyal İlaçlar                               |
| AMR        | : Antimikrobiyal Direnç                                |
| APEC       | : Avian Patojenik <i>Escherichia coli</i>              |
| BMD        | : Broth Mikrodilüsyon Yöntemi                          |
| AMEG       | : Antimikrobiyal Tavsiye Uzman Grubu                   |
| CDT        | : Birleşik Disk Testi                                  |
| CLSI       | : Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü         |
| CMR        | : Kolistin MİK İndirgeme Testi                         |
| CMT        | : Kolistin MAC Testi                                   |
| DA         | : Dipikolinik Asit                                     |
| DHFA       | : Dihidrofolik asit                                    |
| EDTA       | : Etilen Diamin Tetra Asetik Asit                      |
| EMA        | : Avrupa İlaç Ajansı                                   |
| EMB        | : Eozin-Metilen Blue                                   |
| ESBL       | : Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz               |
| EUCAST     | : Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi   |
| GLASS      | : Küresel Antimikrobiyal Direnç İzleme Sistemi         |
| GNB        | : Gram Negatif Bakteri                                 |
| IL         | : Interleukin                                          |
| ISO        | : Uluslararası Standardizasyon Örgütü                  |
| LAMP       | : Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon                |
| LPS        | : Lipopolisakkarit                                     |
| <i>mcr</i> | : Mobil Kolistin Direnci                               |
| MHA        | : Müller Hinton Agar                                   |
| MİK        | : Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu                    |
| MDR        | : Multidrug Resistant                                  |
| MDR-GNB    | : Multi Drug Resistance-Gram Negative Bacteria         |
| NCBI       | : National Center for Biotechnology Information        |
| NDARO      | : National Database of Antibiotic Resistance Organisms |
| NP         | : Natural Products                                     |
| OM         | : Outer Membran                                        |



|               |                                                    |
|---------------|----------------------------------------------------|
| PABA          | : Para amino benzoik asit                          |
| PBP           | : Penisilin Bağlayıcı Proteinler                   |
| PCR           | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu                      |
| PCU           | : Populasyon Düzeltme Birimi                       |
| RAPD-PCR      | : Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA              |
| RPNP          | : Modifiye Rapid Polimiksin NP Testi               |
| PRISMA        | : Meta Analiz için tercih edilen raporlama öğeleri |
| TCS           | : İki Bileşenli Sistem                             |
| THFA          | : Tetrahidrofolik asit                             |
| TNF- $\alpha$ | : Tümör Nekrozis Faktör –alfa                      |
| TPS           | : Tamponlanmış Peptonlu Su                         |
| TSA           | : Tryptik Soy Agar                                 |
| WGS           | : Tüm Genom Dizisi                                 |
| XDR           | : Geniş Ölçüde İlaça Dirençli                      |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1. Gram negatif hücre membranında kolistin antimikrobiyal etki mekanizması.....                                                                                                                                 | 9  |
| Şekil 2.2. Duyarlı hücrelerde (A) kolistin etki şeklinin ve dirençli hücrelerde (B) kolistine direncin moleküler mekanizmalarının şematik gösterimi.....                                                                | 11 |
| Şekil 2.3. Gram negatif mikroorganizmalarda polimiksin direncinde rol oynayan LPS modifikasyon mekanizmaları .....                                                                                                      | 17 |
| Şekil 4.1. <i>mcr-1</i> genine spesifik PCR görüntülenmesi M: Marker (100-1000 bp); Pozitif izolatlar: 2,6,9; Negatif izolatlar: 1,3,4,5,7,8.....                                                                       | 40 |
| Şekil 4.2. <i>mcr-2</i> genine spesifik PCR görüntülenmesi M: Marker (100-1000 bp); Pozitif izolatlar: 3,7; Negatif izolatlar: 1,2,4,5,6,8,9.....                                                                       | 40 |
| Şekil 4.3. <i>mcr-3</i> genine spesifik PCR görüntülenmesi M: Marker (100-1000 bp); Pozitif izolatlar: 1,2,4,5,6,7,8,9; Negatif izolatlar: 3.....                                                                       | 40 |
| Şekil 4.4. Kloakal numunelerden izole edilen fenotipik olarak kolistin dirençli <i>mcr-1</i> , <i>mcr-2</i> ve/veya <i>mcr-3</i> genlerine sahip izolatların RAPD-PCR jel görüntüsü. ....                               | 45 |
| Şekil 4.5. Kloakal numunelerden izole edilen fenotipik olarak kolistin dirençli <i>mcr-1</i> , <i>mcr-2</i> ve/veya <i>mcr-3</i> genlerine sahip izolatların RAPD-PCR jel görüntüsü. ....                               | 46 |
| Şekil 4.6. Altlık ve yemlik-suluk numunelerden izole edilen fenotipik olarak kolistin dirençli <i>mcr-1</i> ve/veya <i>mcr-2</i> genlerine sahip izolatların RAPD-PCR jel görüntüsü.....                                | 46 |
| Şekil 4.7. Altlık ve yemlik-suluk numunelerden izole edilen fenotipik olarak kolistin dirençli <i>mcr-1</i> ve/veya <i>mcr-2</i> genlerine sahip izolatların RAPD-PCR jel görüntüsü. ....                               | 47 |
| Şekil 4.8. Kloakal, altlık ve yemlik-suluk numunelerden izole edilen MDR ve fenotipik olarak kolistin dirençli <i>mcr-1</i> , <i>mcr-2</i> ve/veya <i>mcr-3</i> genlerine sahip izolatların RAPD-PCR jel görüntüsü..... | 48 |
| Şekil 4.9. Kloakal, altlık ve Yemlik-suluk numunelerden izole edilen MDR ve fenotipik olarak kolistin dirençli <i>mcr-1</i> , <i>mcr-2</i> ve/veya <i>mcr-3</i> genlerine sahip izolatların RAPD-PCR jel görüntüsü..... | 48 |

## TABLÖLER DİZİNİ

|                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 2.1. Kolistinin patojen bakterilere karşı etkinliği .....                                                                              | 13 |
| Tablo 2.2. <i>mcr</i> varyantlarının ülkelere ve hayvan türlerine göre dağılımı.....                                                         | 21 |
| Tablo 2.3. Gram negatif bakterilerin kolistin direnci kazanmada kullandıkları doğal ve kazanılmış direnç stratejileri.....                   | 23 |
| Tablo 3.1. <i>mcr-1</i> , <i>mcr-2</i> , <i>mcr-3</i> genlerinin belirlenmesinde ve genotiplendirmede kullanılan primerler .....             | 31 |
| Tablo 4.1. Altlık, yemlik-suluk ve kloakal svaplardan elde edilen <i>E.coli</i> izolatları.....                                              | 34 |
| Tablo 4.2. Altlık numunelerinden izole edilen <i>E.coli</i> izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık sonuçları .....                          | 35 |
| Tablo 4.3. Yemlik-suluklardan izole edilen <i>E.coli</i> izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık sonuçları .....                             | 35 |
| Tablo 4.4. Kloakal svaplardan izole edilen <i>E.coli</i> izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık sonuçları .....                             | 36 |
| Tablo 4.5. Kloakal, Altlık ve Yemlik-suluk numunelerinden izole edilen <i>E.coli</i> izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık sonuçları ..... | 36 |
| Tablo 4.6. <i>E. coli</i> izolatlarının çoklu antimikrobiyal, fenotipik ve genotipik ortak özellikleri .....                                 | 37 |
| Tablo 4.7. <i>E. coli</i> izolatlarının kolistin MİK değerleri.....                                                                          | 38 |
| Tablo 4.8. <i>E. coli</i> izolatlarının kolistin direncinden sorumlu <i>mcr-1</i> , <i>mcr-2</i> ve <i>mcr-3</i> gen varlıkları .....        | 41 |

# 1. GİRİŞ

Mikroorganizmalar yeryüzünün en eski canlılarıdır ve değişen yaşam koşullarına hızla uyum sağlayabilme özelliğine sahiptirler. Bu yetenekleri sayesinde kendilerine karşı geliştirilen her yeni antimikrobiyalden kaçacak bir yol bulmaktadırlar ve sonuç olarak da infeksiyonlarla savaşta en önemli engel olan antimikrobiyallere direnç sorunu ortaya çıkmaktadır. Antimikrobiyal ajanlara karşı gelişen direnç günümüzde bütün insanlığı tehdit edecek düzeyde çok önemli bir sorundur.

Polimiksinler, 1970'li yıllarda insan hekimliğinde sıkça kullanılıyorken, toksik etkileri, özellikle de böbrekler ve sinir sistemi üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle kullanımından vazgeçilmiştir (Falagas et al., 2005; Gallardo-Godoy et al., 2016). Ancak son yıllarda çoklu ilaca dirençli (MDR), özellikle de genişletilmiş spektrumlu sefalosporinlere ve karbapenemlere dirençli Gram negatif bakterilerin neden olduğu infeksiyonların prevelansındaki artış nedeniyle tekrar alternatif bir etken madde olarak ön plana çıkmıştır (Aghapour et al., 2019; Baron et al., 2016). Bununla birlikte kolistin son yıllarda yeniden kullanıma girmesiyle, direnç sorunu da ortaya çıkmış ve bu durum klinik durumu daha da karmaşıktır. Kolistin etkinliği hakkında değişik ülkelerden yapılan çalışmaların sayısı giderek artmaktadır. Ancak ülkemizde çoklu ilaca dirençli Gram negatif patojenlere karşı kolistin etkinliğini bildiren çalışma sayısı oldukça sınırlıdır.

*Escherichia coli* (*E. coli*), kanatlılar da dahil olmak üzere birçok hayvan türünün bağırsak florasında bulunan kommensal bir mikroorganizmadır (Guabiraba and Schouler, 2015). Bazı suşlar fırsatçı enfeksiyonlara neden olabilirken, bazıları birincil hastalığa neden olmalarını sağlayan spesifik virülans faktörleri içermektedir (Nolan et al., 2020). Kanatlılarda klinik semptomlarla ilişkili izolatlar genellikle avian patojenik *E. coli* (APEC) olarak adlandırılır.

Antimikrobiyal ilaçlar (AMD'ler), 1947'de keşfedilmelerinin ardından, kolistin de klinik kullanıma girmesiyle birlikte bakteri yükünü ve hastalık riskini azaltmak amacıyla hem insan sağlığında hem de veteriner hekimlikte 50 yıldan fazladır sığır, koyun, domuz ve kanatlılarda gastrointestinal infeksiyonların tedavisinde kullanılmışlardır (Brownlee and Jones, 1948; Li et al., 2019; Mead et al., 2022). Kolistin, orijinal olarak spor oluşturan toprak organizması *Paenibacillus*

*polymyxa*'dan izole edilen ve polimiksinler olarak bilinen bir antimikrobiyal ajandır. Bu gruptaki moleküller polimiksin A, B, C, D ve E'dir ve bunlardan sadece polimiksin E (kolistin) ve polimiksin B insanlarda klinik olarak kullanılmaktadır (WHO, 2018).

Kolistinler günümüzde insan sağlığında kullanılan son çare antimikrobiyallerden olup kolistine karşı direnç dünya çapında büyük ilgi görmektedir. Kolistin hem beşerî hem de veteriner hekimlikte yaygın olarak kullanılmakla birlikte, genellikle çoklu ilaca dirençli ve yaygın olarak ilaca dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek amacıyla uygulanmaktadır (Magiorakos et al., 2012).

Mikroorganizmaların antimikrobiyal ilaçlara maruz kalması, yeni antimikrobiyal direnç (AMR) mekanizmalarının gelişmesine veya antimikrobiyal direnç genleri ve mutasyonları barındıran suşların artmasına yol açarak sonraki tedavilerin etkinliğini azaltabilir (Larsson and Flach, 2022).

AMR, çağımızın şu anda karşı karşıya olduğu en önemli halk sağlığı tehditlerinden biridir ve Dünya Sağlık Örgütü'nün en büyük önceliklerden biridir (WHO, 2022).

'Tek Sağlık', Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından, birden fazla sektörün daha iyi halk sağlığı sonuçları elde etmek için iletişim kurduğu ve birlikte çalıştığı programlar, politikalar, mevzuat ve araştırmaları tasarlamak ve uygulamak için bir yaklaşım olarak tanımlanmaktadır. Çok sayıda benzer mikroorganizmalar, yaşadıkları ekosistemleri paylaştığı hem hayvanları hem de insanları enfekte etmektedir. Bu nedenle sadece bir sektörün çabasıyla bu sorunların önüne geçmek mümkün değildir. Herhangi bir konuya “Tek Sağlık” perspektifinden yaklaşmak, insanların, evcil hayvanların, vahşi yaşamın, bitkilerin ve çevrenin etkileşimlerine birlikte bakmayı gerektirir (WHO, 2022). Antimikrobiyal direnç, Tek Sağlık perspektifinin bir parçası olarak kapsamlı bir çalışmaya uygun, karmaşık epidemiyolojiye sahip bir halk sağlığı sorunudur. Antimikrobiyal direncin etkenleri arasında insanlarda, hayvanlarda ve çevrede antimikrobiyal kullanımı ve istismarı, ardından dirençli bakterilerin ve direnç belirleyicilerinin dünya çapında bu sektörler arasında yayılması yer almaktadır. Hayvan sağlığı ve tarım sektörlerindeki başlıca endişeler, Gram negatif bakteri enfeksiyonu ile mücadelede son çare ilaçlardan biri olan kolistin gibi insanlar için kritik öneme sahip antimikrobiyallerin hayvanlarda

yaygın olarak uygulanmasıdır. İnsan ve veteriner hekimliğinde nadir görülen bu durum *Enterobacteriaceae* familyasında kolistin direncinin ortaya çıkmasına neden olur. *mcr-I*'in ortaya çıkışı, kolistinin Çin ve Güneydoğu Asya çiftliklerinde kullanılması (Liu et al., 2016) ve daha sonra düzinelerce başka ülkeye yayılması (Marston et al., 2016; Mendes and Burdmann, 1992; Wang et al., 2018;) nedeniyle kesinlikle daha da şiddetlenmiştir. Daha önemlisi, antimikrobiyal direnç, dirençli bakteri ve direnç belirleyicilerinin bu sektörler içinde ve dünya genelinde yayılması ele alınmalıdır. Bu sorunu daha iyi yönetmek, mevcut antimikrobiyallerin, özellikle yüksek hacimlerde kullanıldığı yerlerde, uygunsuz kullanımlarını ortadan kaldırmak suretiyle, etkinliklerinin devamlılığını sağlamak yönünde adımlar atılmasını içermektedir (WHO, 2022).

Bu tez çalışmasında, hem insan hem de hayvan sağlığının önemli sorunlarından ve antimikrobiyal direncin önemli örneklerinden biri olan kolistin direncinin, sağlıklı tavuk kloakal örnekleri ile beraber çevresel örneklerden de izole edilen *Escherichia coli* suşlarındaki durumunun belirlenmesi, dirençten sorumlu bazı *mcr* genlerinin prevalansının ortaya konularak söz konusu izolatların ve dolayısıyla bu izolatların izole edildikleri tavukların kolistin direnci yönünden rezervuar olabileme potansiyellerinin belirlenmesi amaçlandı.

## 2. GENEL BİLGİLER

Patojenik mikroorganizmalarla mücadelede etkili olan antimikrobiyaller, keşfedildikleri 20. yüzyıldan bu yana hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Antimikrobiyal kontaminasyon ve antimikrobiyal direnç, küresel çevre ve sağlık sorunları haline gelmiştir. Beşeri hekimlikte ve hayvancılıkta çok sayıda antimikrobiyal kullanılmakta ve bu da artık antimikrobiyallerin çevreye sürekli olarak saçılmasına yol açmaktadır. Antimikrobiyal kullanımı sadece ekolojik zarara neden olmakla kalmaz, aynı zamanda antimikrobiyal direncin oluşmasını ve yayılmasını da teşvik eder. Antimikrobiyal kontaminasyonda ve antimikrobiyal direncin yayılmasında çevresel faktörlerin rolü genellikle göz ardı edilir (Wang et al., 2023). Antimikrobiyal direnç günümüzde dünya çapında insan, hayvan ve çevre sağlığını tehdit eden ciddi bir sorundur. Bu durum 2050 yılına kadar kontrol altına alınmazsa, ciddi ekonomik kayıplar ve hayvancılık üretiminde önemli bir düşüşle karşı karşıya kalınabilir.

*E. coli*, insanlarda idrar yolu enfeksiyonlarının ve yenidoğan menenjitinin ana nedenidir ve ayrıca kümes hayvanlarında ciddi bir bulaşıcı hastalık olan kanatlı kolibasilozuna da neden olur. Tavuklarda *E. coli*'nin neden olduğu diğer durumlar arasında yumurta sarısı enfeksiyonları, perikardit, peritonit ve osteomyelit yer alır. *E. coli*, insanlarda ve tavuklarda bulunan, direnç genlerini diğer patojenlere taşıyan ve yayan, halk sağlığını tehdit eden kommensal bir mikroorganizmadır. Kemirgenler, multidrug-resistant (MDR) *E. coli* de dahil olmak üzere insan sağlığını tehdit eden farklı zoonotik patojenleri taşır ve bulaştırır. Çevremizdeki kemirgenler, insanlar, çiftlik hayvanları ve çevreleri arasındaki etkileşim, antimikrobiyale dirençli bakterilerin ve onların direnç genlerinin taşınmasını kolaylaştırabilir. Çalışmalar, kümes hayvancılığının yaygın olduğu kırsal alanlarda, kümes altlıklarının insanlardan ve hayvanlardan gelen daha yüksek antimikrobiyal kalıntılarıyla kirlenmesine, bunun da antimikrobiyal direnç genlerinin artmasına ve yayılmasına yol açtığını belgelemiştir (Sonola et al., 2021).

Yapılan çeşitli araştırmalarla Gram negatif bakterilerin kolistin duyarlılıkları belirlenmiştir. Dünyanın farklı yerlerinden *Enterobacteriaceae*'larda kolistin direncini ortaya koyan birçok rapor vardır. İtalya'da 2010-2011 yılları arasında toplanan karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) izolatlarında kolistin insidansı %18,6'dır. Ayrıca bu oran İtalya'nın yoğun bakım ünitelerinde

%36,1'dir (Capone et al., 2013). Türkiye'de gıda zehirlenmesi vakalarından izole edilmiş *Salmonella spp.* suşlarında kolistine fenotipik direnç oranı %44,1 olarak bildirilmiştir (Kizil, 2020).

Sipahi (2023), yılında yaptığı bir çalışmada, 96 adet tavuk dışkı örneğiyle çalışmış ve laktozu fermente edemeyen mikroorganizmaları tanımlayarak direnç karakterlerini belirlemiştir. Buna göre izolatların 23'ünde (%85.18) test edilen 19 farklı antimikrobiyalden en az 1 antimikrobiyale karşı direnç görülmüştür. Ayrıca 17 izolatta (%63) çoklu ilaç direncine rastlanmıştır. Bu oranın oldukça yüksek olduğu düşünülmektedir. Çünkü örnekler ticari çiftliklerden toplanmamış, test materyal kaynağı olarak geleneksel tip köy tavukları seçilmiştir. Bu tavukların herhangi özel bir vitamin, antimikrobiyal ve benzeri bir takviye almadıkları bildirilmiştir. Dolayısıyla ticari tavuk çiftliklerinden alınan örneklerde bu oran daha da yüksek olabilmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada, tavuk dışkılarından (ticari tavuk çiftliklerinden toplanmış) izole edilen *E. coli*'lerde %100 oranında çoklu ilaç direncine rastlanmıştır (Al-Azad et al., 2019). Diğer bir çalışmada ise, *Salmonella* serovarları için bu çoklu ilaç direnci oranı %89.51 olarak bildirilmiştir (Şahan ve ark. 2016)

ABD'de, Zhao vd. (2005), elde ettikleri 95 APEC izolatından %59'unun nalidiksik aside, %16'sının enrofloksasine ve %3'ünün siprofloksasine dirençli olduğunu ve kinolonlara direncin *gyrA*, *gyrB* ve *parC*'deki mutasyonlar ve *acrAB* tarafından kodlanan çoklu ilaç direnci pompasının aşırı çalışmasıyla ilgili olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmada izolatların %92'sinin 3 veya daha fazla antimikrobiyale dirençli olduğu belirtilmiştir. Çin'de yapılan bir başka çalışmada, 10 kanatlı kümesinden alınan tavuk karaciğer örneklerinden 71 *E. coli* izolatının %80'inin 8 ve üzeri antimikrobiyale dirençli olduğu tespit edilmiştir (Yang et al., 2004).

Kolistin ABD'de kullanılmamakla birlikte, Avrupa'daki gıda üreten hayvanlarda terapötik bir ajan olarak ve ayrıca birçok Asya ülkesinde büyüme teşvik edici olarak kullanılmaktadır. Hayvanlarda kolistin direncinin ortaya çıkması ve daha sonra insanlarda da saptanması endişeyi daha da artırmıştır. Dirençli mikroorganizmaların hayvanlardan insanlara bulaştığını bildiren çalışmalar vardır. Yakın zamana kadar, aktarılabılır bir kolistin direnci varlığı belirlenememiş olup genellikle çok az araştırmacı kolistin direncini araştırmakla ilgileniyordu. *mcr-1*



geninin ilk keşfinden sonra, kolistin direncine ilgi artmaya başlamıştır ve bu konuyla ilgili çok sayıda makale yayınlanmıştır (Liu et al., 2016). Bugüne kadar, *mcr* aracılı direncin epidemiyolojisi büyük ölçüde belirsizliğini korumaktadır ve mutasyon aracılı direnç dahil olmak üzere bu direncin epidemiyolojisi hakkında daha iyi bir görüş elde etmek için yeni ve iyi planlanmış çalışmaların yapılması gerekmektedir. Çoğu çalışma günümüzde *mcr* aracılı direnç üzerine odaklandığından, mutasyon aracılı direnç ihmal edilmiştir. Bununla birlikte, kolistin direncinin yayılmasındaki önemi göz ardı edilmemelidir (Butaye and Wang, 2018).

### **2.1. Kolistinin İnsan ve Hayvan Hekimliğinde Kullanımı**

1950'lerde keşfedilen polimiksinler, Gram negatif bakterilere (GNB) karşı önemli aktiviteye sahip antimikrobiyal ajanlardır. Polimiksinler, *Bacillus polymyxa subspecies colistinus*'tan türetilmekte ve sadece Gram negatif bakterilere karşı aktif olarak kullanılmaktadır. Polimiksinlerin antimikrobiyal özelliği ilk olarak 1940'lı yıllarda, kolistinin ise 1950'lerde tanımlanmıştır. Daha sonra kolistinin polimiksin E ile aynı olduğu tespit edilmiştir (Stansly et al., 1947; Koyama et al., 1950). Kolistin 1980'lerin başlarına kadar Gram negatif basil infeksiyonlarını tedavi etmek amacıyla kullanılmıştır. Fakat nefrotoksitesi ve ikinci/üçüncü kuşak sefalosporinlerin mevcudiyeti nedeniyle, kolistinin tedavide kullanımına bir süre ara verilmiştir (Falagas et al., 2005; Gallardo-Godoy et al., 2016).

Polimiksin ailesindeki antimikrobiyaller, beş farklı kimyasal bileşikten (polimiksin A, B, C, D ve E) oluşur (Falagas et al., 2005; Gallardo-Godoy et al., 2016). Bu bileşiklerden sadece polimiksin B ve kolistin (polimiksin E) klinik olarak kullanılmaktadır (Landman et al., 2008; Cassir et al., 2013). Polimiksin B ile polimiksin E (kolistin) arasındaki fark tek bir aminoasit değişikliği (D-fenilalanin, D-lösinin yerine geçer) sonucu meydana gelmektedir (Stansly et al., 1947; Koyama et al., 1950). Kolistin sülfatın ticari preparatları, yağ asidi tortularına göre farklılık gösteren kolistin A ve kolistin B'dir. Toksisite nedeniyle, kolistin sülfat sadece topikal tedavi için kullanılır. Kolistimetat sodyum (ayrıca kolistin metansülfonat olarak da adlandırılır) parenteral kullanım için daha az toksik bir preparasyondur ve kolistinin formaldehit ve sodyum bisülfat ile işlenmesiyle üretilir. Mevcut müstahzarlar yağ asidi kalıntılarından farklı olarak kolistimetat A ve B'den oluşmaktadır (Li et al., 2006).

Kolistin, çoklu ilaca dirençli Gram negatif bakterilerin tedavisinde karşılaşılan sorunlar nedeniyle son zamanlarda beşeri hekimlikte 'yeniden keşfedilen' bir antimikrobiyaldir. Bağırsak enfeksiyonlarının tedavisi için kullanımı, ekonomik değeri olan hayvanlarla, özellikle domuzlarla sınırlıydı. Bununla birlikte, dünya çapında başka kullanımlar da bildirilmiştir. Kolistin ABD'de kullanılmamakla birlikte, Avrupa'da ekonomik değeri olan hayvanlarda terapötik bir madde olarak ve ayrıca birkaç Asya ülkesinde çiftlik hayvanlarının büyümesini hızlandırıcı olarak kullanılmaktadır (Butaye and Wang, 2018).

Kolistin hem beşeri hekimlikte hem de veteriner hekimlikte ticari olarak kullanılan katyonik antimikrobiyal bir peptittir. Son birkaç yıldır kolistin, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ve *K. pneumoniae* gibi çoklu ilaca dirençli (MDR) ve hatta geniş ölçüde ilaca dirençli (XDR) Gram negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlara karşı son savunma hattı olarak kabul edilmektedir. Başka bir ifadeyle MDR Gram negatif bakterilerin ortaya çıkması bilim adamlarının polimiksinlerin önemini daha da iyi anlamalarına neden olmuştur (Falagas and Kasiakou, 2005; Munoz-Price et al., 2013; Poirel et al., 2017). Özellikle  $\beta$ -laktam, aminoglikozid veya kinolon grubu antimikrobiyallerin kullanımlarının yetersiz kaldığı durumlarda, polimiksinler, özellikle de kolistin, tedavide alternatif olarak kullanılmaktadır (Li et al., 2005; Landman et al., 2008).

Kolistin, hayvanlarda profilaksi, metafilaksi ve tedavi amacıyla kullanılmasının yanında ekonomik değeri olan hayvanlarda büyümeyi teşvik etmek için bir yem katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır (Poirel et al., 2017). Kolistin, ekonomik değeri olan hayvanlarda son 50 yıldan beri yaygın şekilde kullanılmasına rağmen, veteriner hekimlikte kolistin direnci ile ilgili veriler, beşeri hekimliğindeki verilere oranla oldukça azdır. Sınırlı direnç verilerine dayanarak, ekonomik değeri olan hayvanlardan elde edilen izolatlar arasında (% 0.9-76.9) kolistin direnci, insanlardan gelen izolatlardan (% 0.1-8.8) daha yüksek oranda görülmektedir (Manageiro et al., 2017; Garcia et al., 2018).

Avrupa İlaç Ajansı (EMA)-Antimikrobiyal Tavsiye Uzman Grubu (AMEG); kolistin kullanımının, insan ve hayvan sağlığı üzerindeki etkisinin, direncin sonuçlarının ve hangi alternatif tedavilerin mevcut olduğunun tekrar değerlendirilmesini istemiştir. Ayrıca yeterli risk yönetimi önlemlerinin de alınması istenmiştir. Grubun tavsiyelerinin Veteriner Kullanımına İlişkin Tıbbi Ürünler

Komitesi ve İnsan Kullanımına Yönelik Tıbbi Ürünler Komitesi tarafından onaylandığını da belirtmişlerdir. EMA, tüm Avrupa Birliği (AB) üye devletlerinin, hayvanlarda kolistin kullanımını, Popülasyon Düzeltme Birimi (PCU) başına en az 5 mg kolistin hedef seviyesine düşürmesi gerektiğini önermektedir. Başarılı bir şekilde uygulandığında bu durumun, AB düzeyinde veteriner kullanımı için mevcut kolistin satışlarında yaklaşık %65'lik bir düşüşe yol açabileceği vurgulanmıştır. Haziran 2016'da, EMA, Avrupa veteriner hekimlik uygulamalarında kolistin kullanımıyla ilgili tavsiyelerini güncellemiş ve kolistin, AMEG'in 2. kategorisine dahil edilmesi gerektiğini söylemiştir (EMA/AMEG, 2016). EMA, bu kategorinin, Dünya Sağlık Örgütü tarafından insan sağlığı için kritik önem taşıyan belirli antimikrobiyal sınıfları içerdiğini de belirtmektedir (EMA, 2016).

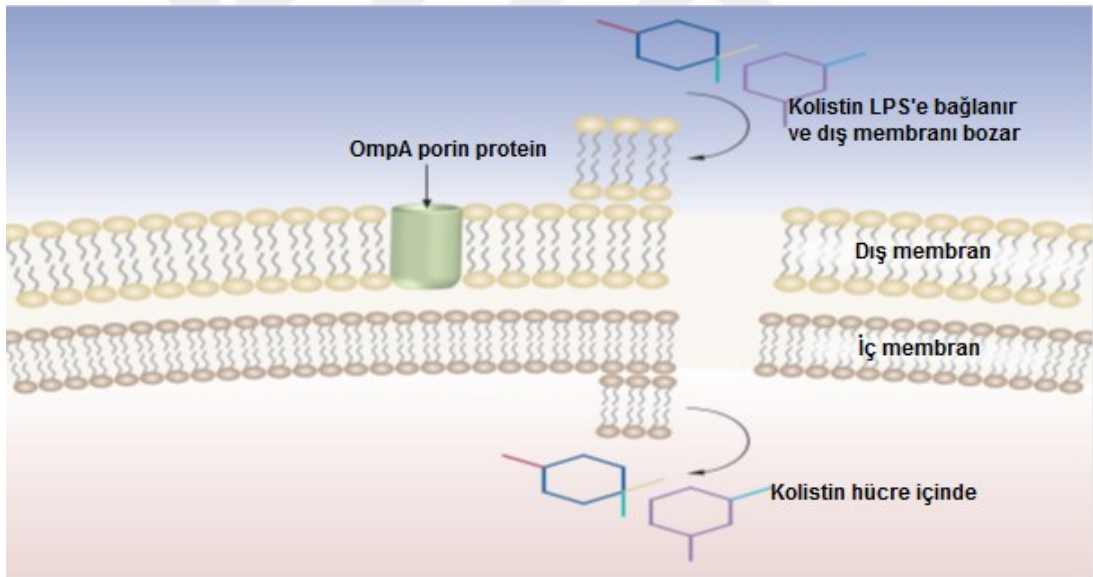
Hayvanlarda kolistin tüketimi, 20. yüzyılın ortasından bu yana özellikle düşük ve orta gelirli ülkelerde (Brezilya, Rusya, Hindistan, Çin ve Güney Afrika'da) oldukça artmıştır (Laxminarayan et al., 2016). Çin'deki ekonomik değeri olan hayvanlarda yıllık kolistin kullanımı, 2011'den 2015'e kadar 2470 ila 2875 ton arasında değişmiştir ve bu da Çin'i dünyadaki en büyük polimiksin kullanıcısı yapmıştır (Shen et al., 2016). Ayrıca, Çin Tarım Bakanlığı, Temmuz 2016'da hayvanlarda kolistin büyüme faktörü olarak kullanılmasını yasaklamıştır (Walsh and Wu, 2016).

Avrupa Birliği'nde, kolistin bulaşıcı hastalıkların tedavisi ve önlenmesi amacıyla kullanılmasına rağmen, 2006 yılında ekonomik değeri olan hayvanlarda büyüme faktörü olarak kullanımı yasaklanmıştır (Maron et al., 2013). Avrupa Veteriner Antimikrobiyal Tüketim Sürveyans ağı, polimiksinlerin 2013-2015 döneminde en çok tüketilen beşinci antimikrobiyal olduğunu bildirirken, Finlandiya, İzlanda ve Norveç'te polimiksin satılmadığını bildirmiştir. Kanada ve Amerika Birleşik Devletleri gibi bazı gelişmiş ülkelerde, kolistin hayvanlarda kullanımı hiçbir zaman onaylanmamıştır (EMA/AMEG, 2016).

## **2.2. Kolistin Antimikrobiyal Etki Mekanizması**

Kolistin antibakteriyel aktivitesi Gram negatif bakterilerin dış zarında (OM) meydana gelir. Aynı zamanda, Gram negatif bakteriler, hücre yüzeyini oluşturan ve hidrofobik bileşenlerin ve antimikrobialların girişini sınırlayan lipopolisakkarit (LPS) zarının varlığıyla karakterizedir (Gogry et al., 2021; Vidaillac et al., 2012; Zgurskaya et al., 2015). Gram pozitif bakteriler hücre duvarlarında LPS

içermedikleri için polimiksinlerin aktivite spektrumunun dışında tutulurlar. Kolistinin en sık kullanım alanı; çoklu dirençli nozokomiyal patojenlerden; *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Klebsiella spp.* (karbapenemlere dirençli) ve *E. coli*, bazı Enterobakter türleri, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila* vb. Gram negatif bakterilerdir (Falagas and Kasiakou, 2005; Lim et al., 2010; Sultan et al., 2020). Fakat, *Proteus* türleri, *Providencia* türleri, *Morganella morganii*, *Pseudomonas mallei*, *Chromobacterium* türleri, *Burkholderia cepacia*, *Serratia marcescens*, *Edwardsiella* türleri, *Campylobacter*, *Vibrio cholera* ve *Brucella*, *Legionella* gibi bazı cinslere dahil türler kolistine doğal olarak dirençlidir. Ayrıca kolistinin Gram negatif koklara (*Neisseria* türleri), anaerobik bakterilere (Falagas and Kasiakou, 2005; Poirel et al., 2017) ve *Aeromonas* türlerine (*Aeromonas jandaei* hariç) karşı etkili olmadığı, *Aeromonas hydrophila*'nın ise kolistine karşı indüklenebilir bir dirence sahip olduğu bildirilmiştir (Fosse et al., 2003; Yahav et al., 2012).



Şekil 2.1. Gram negatif Hücre Membranında Kolistinin Antimikrobiyal Etki Mekanizması (Biswas et al., 2012).

Kolistinin ilk hedefi GNB'nin dış membranında bulunan LPS bileşenidir (Powers and Hancock, 2003; Nation et al., 2014). Kolistin öncelikle LPS'e ve spesifik olarak LPS'nin anahtar bileşeni olan lipid A'ya, kolistinin pozitif yüklü Dab molekülleri ve lipid A'nın negatif yüklü fosfat grupları arasındaki elektrostatik etkileşimi yoluyla bağlanır (Şekil 2.1) (Velkov et al., 2009). Kolistin, normal olarak LPS'in yapısını sağlamlaştıran kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) ve magnezyumun ( $Mg^{+2}$ ) yer

değiştirmesine neden olur ve sonuç olarak LPS'in üç boyutlu yapısı değişir. LPS'in ve iç hücresel içeriklerin kaybı, sitoplazmik zarın bozulmasına ve bakteriyel ölüme sebep olur. Kolistin, LPS için iki değerli (<sup>+</sup><sub>2</sub>) katyonlara göre en az üç kat daha fazla etkilidir (Gogry et al., 2021; Hancock, 1997).

Kolistin, OM'nin permeabilizasyonuna ve stabilizasyonuna yol açar (Hancock and Scott, 2000; Straus and Hancock, 2006). Bu mekanizma, kolistinin diğer antimikrobiyallerle olan sinerjistik etkisini ortaya koyar (Hancock, 1997). Rifampisin, vankomisin, meropenem,  $\beta$ -laktam, tigesiklin ve gentamisin gibi etkili hidrofilik antimikrobiyaller, kolistin tarafından membran bütünlüğünün bu şekilde bozulması nedeniyle sinerjistik olarak çalışabilirler (Bolla et al., 2011).

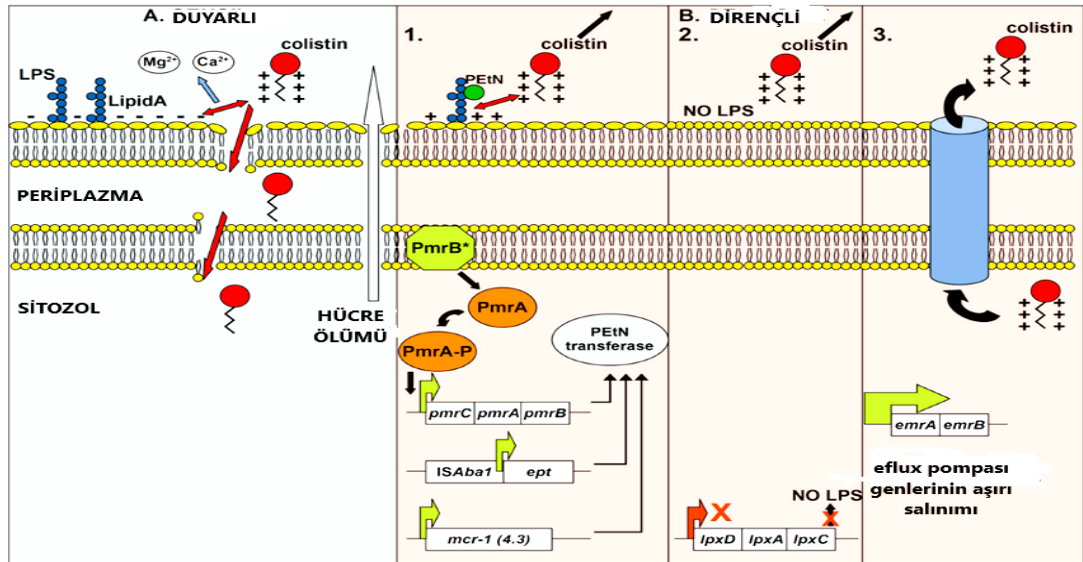
Ayrıca GNB'de hayati respiratorik enzimlerin (tip II NADH-kinon oksidoredüktazlar NADH-2) kolistin tarafından engellenmesiyle başka bir etki mekanizması daha ortaya çıkar (Deris et al., 2014). Kolistinin alternatif stratejisi, kolistinin lipid membrana bağlanması yoluyla hidroksil radikallerin üretimi ve hızlı hücre ölümünün indüklenmesiyle gerçekleşir. Serbest radikaller, kolistin bakteriyel dış membranı (OM) geçtiğinde üretilir. Hidroksil radikali üretimi, reaktif oksijen türlerinin üretimi yoluyla gerçekleşir; hidroksil radikalleri (OH<sup>•</sup>), süperoksit (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) ve hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), oksidatif strese neden olur. Kolistin OM ve IM'ye girip geçtiğinde O<sub>2</sub><sup>-</sup> üretilir, ardından O<sub>2</sub><sup>-</sup> süperoksit dismutaz tarafından H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye dönüştürülür. Daha sonra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ferröz demiri (Fe<sup>2+</sup>) ferrik demire (Fe<sup>3+</sup>) oksitler, ayrıca OH<sup>•</sup> oluşumuna neden olur; bu süreç Fenton reaksiyonu olarak bilinir. Bu reaksiyon bakteriyel DNA, protein ve lipitlerde oksidatif hasara yol açarak hücre ölümüne yol açabilir. Bu öldürme mekanizmasının, *A. baumannii* ve *E. coli*'nin kolistine duyarlı ve çoklu ilaca dirençli (MDR) izolatlarında meydana geldiği ancak polimiksine dirençli suşlarda gerçekleşmediği gösterilmiştir (Talbot et al., 2006 ; Velkov et al., 2013).

Kolistin, LPS'in lipid A bileşenine bağlandığı için ayrıca bir anti-endotoksin aktivitesine de sahiptir (Falagas et al., 2005). Bu nedenle kolistin, LPS moleküllerine bağlanarak ve onları nötralize ederek lipid A'nın endotoksin aktivitesini inhibe eder. Bu antibakteriyel aktivite mekanizması yalnızca in vivo olarak ortaya çıkar (Falagas et al., 2005; Li et al., 2005; Sherry and Howden, 2018). Bu şekilde kolistin, endotoksinin tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ) ve İnterleukin (IL)-8 gibi

sitokinlerin salınması sonucu meydana gelebilecek şok oluşturma kabiliyetini de önlemiş olur (Şentürk, 2005; Baeuerlein et al., 2009).

### 2.3. Kolistin Direnç Mekanizması

Kolistine karşı direncin ana mekanizması belirsiz olmasına rağmen GNB, kendilerini kolistine karşı ve diğer polimiksinlere karşı korumak için çeşitli mekanizmalar kullanırlar (Şekil 2.2). Literatüre göre kolistine direnç mekanizmalarının çoğu, in vitro maruziyet sonrasında ortaya çıkan adaptif mekanizmalardır (Aghapour et al., 2019; Biswas et al., 2012). LPS'in farklı yollardan modifikasyonu sonucunda kolistin direnci ortaya çıkmaktadır. Kolistine karşı gelişen direncin en yaygın sebeplerinden biri, LPS'nin değiştirilmesi ve negatif yükünün azaltılması yoluyla bakteriyel dış membranın modifikasyonudur (Srinivas and Rivard, 2017; Dalmolin et al., 2018; Landman et al., 2008; Nation and Li, 2009). Diğer strateji, akış pompası sistemlerinin aşırı miktarda salınmasıdır (Bengoechea and Skurnik, 2000). Başka bir mekanizma ise kapsül polisakkaritinin aşırı üretimidir. (Campos et al., 2004; Kim et al., 2014). Hiçbir enzimatik direnç mekanizması bildirilmemiştir. Ancak *P. polymyxa* suşlarının kolistinaz üretebildiği bildirilmiştir (Aghapour et al., 2019; Ito-Kagawa and Koyama, 1980).



Şekil 2.2. Duyarlı hücrelerde (A) kolistinin etki şeklinin ve dirençli hücrelerde (B) kolistine direncin moleküler mekanizmalarının şematik gösterimi. A- Kolistin, dış ve iç zarların indüklenen bozulmasına bağlı olarak duyarlı hücrelerin lizisine neden olur. Kolistinin pozitif yüklü kısmı ile LPS'nin lipid A'sının negatif yüklü fosfat grupları arasındaki etkileşimler, LPS yapısını etkileyen kalsiyum ve magnezyum katyonlarının yer değiştirmesine yol açar. Geçirgenliğin bir sonucu olarak, kolistin iç zara nüfuz eder ve bütünlüğünü değiştirerek hücre içi materyalin sızmasına ve hücre ölümüne yol açar. B- Kolistine direnç birçok ortak mekanizma yoluyla ortaya çıkar. 1. Lipid A'ya PEtN parçası eklenmesinin bir sonucu olarak (*pmrCAB*, *eptA*'nın mutasyonları ve aşırı ekspresyonu

veya plazmit aracılı *mcr* genlerinin varlığı), dış zarın genel yükü değişir, böylece kolistin artık lipit A ile etkileşime giremez. 2. LPS biyosentetik yolunun etkisizleştirilmesi, kolistin hedef molekülü olan LPS'nin yokluğuyla sonuçlanır. 3. Spesifik akış pompalarının aşırı ekspresyonu, kolistin verimli bir şekilde dışarı atılmasına yol açarak dirence neden olur (Novovic and Jovcic, 2023).

Kolistine karşı direnç mekanizmaları başlıca doğal ve kazanılmış direnç mekanizmaları olmak üzere ikiye ayrılmıştır.

### 2.3.1. Doğal Direnç

Polimiksinler, çoğu *Enterobacteriaceae* grubu GNB'ye karşı duyarlıdır fakat *Proteus spp.*, *Morganella morganii*, *Providencia spp.*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia cepacia complex*, *Chromobacterium spp.*, *Edwardsiella spp.*, *Brucella*, *Legionella*, *Campylobacter* ve *Vibrio cholerae* gibi bazı cinslere dahil türler polimiksinlere doğal olarak dirençlidirler (Tablo 2.1) (Doern and Morse, 1980; Landman et al., 2008; Poirel et al., 2017). Ek olarak, polimiksinler Gram negatif koklar, Gram pozitif ve anaerobik bakterilere karşı da doğal olarak dirençlidirler.

Polimiksinlere karşı direnç, *Proteus mirabilis* ve *Serratia marcescens*'te LPS'nin katyonik ikame yoluyla modifikasyonu sonucunda doğal olarak meydana gelir. Bu türlerdeki direnç mekanizması, *arnBCADTEF* operonunun ve *eptB* geninin ekspresyonuyla bağlantılıdır. Bu şekilde LPS'e sırasıyla 4-amino 4-deoksi-L-arabinoz (L-Ara4N) ve fosfoetanolamin (pEtN) katyonik grupları bu operon ve gen tarafından eklenir. *P. mirabilis*'in LPS'inin L-Ara4N içerdiği ve bu bakterinin genomunun, LPS'in PETN ile modifikasyonuna aracılık eden *eptC* genini içerdiği gösterilmiştir (Aquilini et al., 2014; Sidorezyk et al., 1983). *P. mirabilis*'teki varsayılan lokuslar, amino arabinozun biyosentezinde veya transferinde rol alan bir taşıma proteinini, *ATPaz* genini ve *O-asetiltransferaz* genini kodlayan *sap* operonunu içerir (McCoy et al., 2001). Ayrıca *rppA/rppB TCS* (İki komponentli Sistem)'nin varlığının da *arnBCADTEF* operonunun aktivasyonunda rol oynadığı keşfedilmiştir (Jiang et al., 2010). Benzer şekilde bu operon, *S. marcescens*'te kolistine karşı doğal dirençten sorumludur (Aquilini et al., 2014; Jiang et al., 2010; Poirel et al., 2017).

Tablo 2.1. Kolistinin patojen bakterilere karşı etkinliği (WHO, 2018).

| Organizma                     | Doğal Durum (Polimiksinlere Karşı Dirençli veya Duyarlı )      |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i>       | Duyarlı                                                        |
| <i>Klebsiella spp.</i>        | Duyarlı                                                        |
| <i>Enterobacter spp.</i>      | Duyarlı                                                        |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Duyarlı                                                        |
| <i>Acinetobacter spp.</i>     | Duyarlı                                                        |
| <i>Salmonella spp.</i>        | Duyarlı                                                        |
| <i>Shigella spp.</i>          | Duyarlı                                                        |
| <i>Pasteurella spp.</i>       | Duyarlı                                                        |
| <i>Haemophilus spp.</i>       | Duyarlı                                                        |
| <i>Proteus spp.</i>           | Doğal Dirençli                                                 |
| <i>Providencia spp.</i>       | Doğal Dirençli                                                 |
| <i>Morganella morganii</i>    | Doğal Dirençli                                                 |
| <i>Serratia spp.</i>          | Doğal Dirençli                                                 |
| <i>Brucella spp.</i>          | Doğal Dirençli                                                 |
| <i>Neisseria spp.</i>         | Doğal Dirençli                                                 |
| <i>Chromobacterium spp.</i>   | Doğal Dirençli                                                 |
| <i>Burkholderia spp.</i>      | Doğal Dirençli                                                 |
| Gram-pozitif bakteriler       | Dış membranlarının bulunmaması nedeniyle doğal dirençlidirler. |

### 2.3.2. Kazanılmış Direnç

Kolistin direncinin ortaya çıkması, bu ilacın ampirik ve hedefe yönelik tedavide yaygın olarak kullanılmasına bağlı olabilir (Oostdijk et al., 2013). Bakterilerin kolistine duyarlılığı, hücre membranının içerdiği fosfolipid miktarı ve ortamda bulunan divalan katyonların düzeyi ile ilişkilidir. Kazanılmış direnç mekanizmaları, *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Klebsiella spp.* ve *Enterobacter spp.* gibi *Enterobacteriaceae* familyasının bazı üyelerinde tanımlanmış ve diğer bakteri türleri için tam olarak bilinmemektedir. Direnç mekanizmalarının, yatay gen transferi yoluyla aktarılamayan kromozomal mutasyonla bağlantılı olduğu varsayılmaktadır (Blair et al., 2015; Olaitan et al., 2014). Şu ana kadar aktarılabilir mekanizma olarak yalnızca bir direnç mekanizması (plazmid aracılı *mcr* gen/leri ile) tanımlanmıştır (Tablo 1) (Aghapour et al., 2019; Poirel et al., 2017).



Birçok gen ve operon, LPS'nin modifikasyonunda rol oynar ve bu da kolistin direncine yol açar. Bunlar arasında; *pmrC* ve *pmrE* genleri ve *pmrHFIJKLM* operon gibi LPS modifikasyonunda doğrudan rolü olan enzimleri kodlamaktan sorumlu genler ve operonlar; (Falagas et al., 2010; Olaitan et al., 2014), PmrAB ve PhoPQ dahil düzenleyici iki bileşenli sistemler (TCS) ve PmrAB sistemini düzenleyen *ctrAB*; (Cheng et al., 2016; Jayol et al., 2015), PmrAB ve PhoPQ dahil olmak üzere TCS'lerin negatif bir regülatörü olan *mgrB* geni; (Cannatelli et al., 2014), plazmid aracılı *mcr* genleri; (Liu et al., 2016; Xavier et al., 2016), kapsül biyosentezinin upregülasyonunun düzenleyicisi olarak Cpx ve PhoPQ sistemini düzenleyen eflüks pompası, KpnEF'nin aktivatörü olarak Rcs yer almaktadır. Gram negatif bakterilerin kolistin direnci kazanmada kullandıkları doğal ve kazanılmış stratejileri Tablo 2.1'de verilmiştir (Aghapour et al., 2019).

Kolistine karşı kazanılmış direnç kromozomal ve plazmid aracılı direnç olmak üzere iki şekilde ortaya çıkmaktadır.

#### **2.3.2.1. Kromozomal direnç:**

##### ***mgrB* Geni ve *PmrAB/PhoPQ* İki Bileşenli Düzenleyici Sistemler**

Bazı operonlar ve düzenleyiciler, LPS'nin PmrAB ve PhoPQ TCS'ler tarafından değiştirilmesinde rol oynar. *pmrABC* operonu, düzenleyici bir protein olarak PmrA'yı (BasR), sitoplazmik membrana bağlı sensör kinaz olarak PmrB'yi (BasS) ve varsayılan bir membran proteini olarak PmrC'yi kodlar (Gun, 2008). 1-fosfat veya 4-fosfat grubuna, L-arabinozamin (L-Ara4N) eklenmesi kolistin direncine yol açar (Olaitan et al., 2014). Genellikle L-Ara4N 4-fosfata bağlanır ve onu modifiye ederken PETN 1-fosfata bağlanır (Helander et al., 1994; Zhou et al., 2001). *pmrHFIJKLM* operonu (*arnBCDADTEF* veya *pbgPE* olarak da adlandırılır) ve PmrE, üridin difosfat glukuronik asitten L-Ara4N'yi sentezler ve bunu lipit A'ya sabitler (Gatzeva et al., 2005; Yan et al., 2007). L-Ara4N'nin biyosentezi *pmr* (*arn*) operonuna bağlıdır. Ayrıca, makrofaj fagozomları gibi çevresel uyarıcılar altında, yüksek demir konsantrasyonu ( $Fe^{3+}$ ) ve alüminyuma ( $Al^{3+}$ ) maruz kalmanın yanı sıra asidik pH da, PmrB'nin aktivasyonuna yol açar (Gun, 2008; McPhee et al., 2003). Öte yandan, düşük  $Mg^{2+}$  veya  $Ca^{2+}$  konsantrasyonu phoQ'nun aktivasyonuna yol açar (Gunn and Miller, 1996; Moskowitz et al., 2004). PmrB, PmrA'yı fosforilasyon yoluyla aktive eder ve PmrA da *pmrABC* ve *pmrHFIJKLM* operonlarının ve *pmrE* geninin düzenlenmesini aktive eder. Daha sonra bu operonlar ve genler, lipit A'ya

PETN ve L Ara4N eklenerek LPS modifikasyonuna yol açar (Barrow and Kwon, 2009; Gun, 2008). *pmrA/pmrB*'nin mutasyonu, *pmrABC* ve *pmrFHJKLM* operonlarının ve *pmrE* geninin yukarı regülasyonuna neden olur. *pmrA* ve *pmrB* genlerindeki kolistin direncine yol açan mutasyon *Klebsiella pneumoniae* ve *Salmonella entericca*'da tanımlanmıştır (Tablo 1) (Nordmann et al., 2016; Olaitan et al., 2015). Öte yandan *phoPQ* TCS, *PhoP*'yi bir düzenleyici protein olarak ve *PhoQ*'yu bir sensör kinaz olarak kodlar. Düşük magnezyum veya kalsiyum, asidik PH veya katyonik antimikrobiyal peptid koşulları altında *PhoPQ* etkinleştirilir ve bakterileri korur. (Gunn and Miller, 1996; Moskowitz et al., 2004). Aktive edilmiş *PhoPQ*, Lipid A'nın iki yolla modifikasyonuna yol açar: *PhoQ*, *pmrFHJKLM* operonunun transkripsiyonunu aktive eden fosforilasyon yoluyla kinaz aktivitesi ile *PhoP*'yi aktive eder, ardından Lipid A; (Groisman, 2001; Park and Groisman, 2014) ve *PhoP*, *PmrD* konnektör proteinini atlayarak dolaylı olarak *pmrA*'yı aktive eder, ardından *pmrHFJKLM* operonunun transkripsiyonunu aktive eder ve onu Lipid A'ya aktaran PETN'yi sentezler (Abavisani et al., 2023; Aghapour et al., 2019; Cheng et al., 2010; Groisman, 2001; Olaitan et al., 2014).

*eptA* (*pmrC*), *eptB* (*pagC*) ve *eptC* (*cptA*) gibi çeşitli PETN kodlayan genler, LPS'nin farklı bölgelerine PETN ekleyebilmektedir (Park et al., 2015). *K. pneumoniae* ve *E. coli*'de kazanılmış kolistin direncine yol açan *phoP/Q* genlerinde mutasyon olduğu tespit edilmiştir (Cheng et al., 2015; Choi and Ko, 2013; Nordmann et al; 2016).

*mgrB* geni, *PhoPQ* TCS üzerinde negatif geri bildirim uygulayan 47 amino asitten oluşan küçük bir transmembran proteinini kodlar (Lippa and Goulian, 2009). Bu protein *PhoQ*'nun kinaz aktivitesini inhibe eder ve bu da *phoQ* geninin ekspresyonunu baskılar. Bununla birlikte, *mgrB* geninin mutasyonu/inaktivasyonu, *phoPQ* operonunun yukarı regülasyonuna ve ardından *pmrHFJKLM* operonunun aktivasyonuna neden olur. Son olarak L-Ara4N'nin üretimi, Lipid A'nın modifikasyonuna ve kolistin direncine yol açar (Cannatelli et al., 2013). *mgrB* geninde silinme, anlamsızlık, yanlış anlam, inaktivasyon ve ekleme mutasyonları gibi çeşitli mutasyonlar veya bozulmalar rapor edilmiştir. Raporlara göre *K. pneumoniae* ve *K. oxytoca*'da *mgrB* inaktivasyonunun, kolistin direncinin en yaygın mekanizması olduğu tespit edilmiştir (Cheng et al., 2015; Poirel et al., 2014). *mgrB* geninde bildirilen diğer değişiklikler arasında sırasıyla *mgrB*'de erken sonlanmaya ve

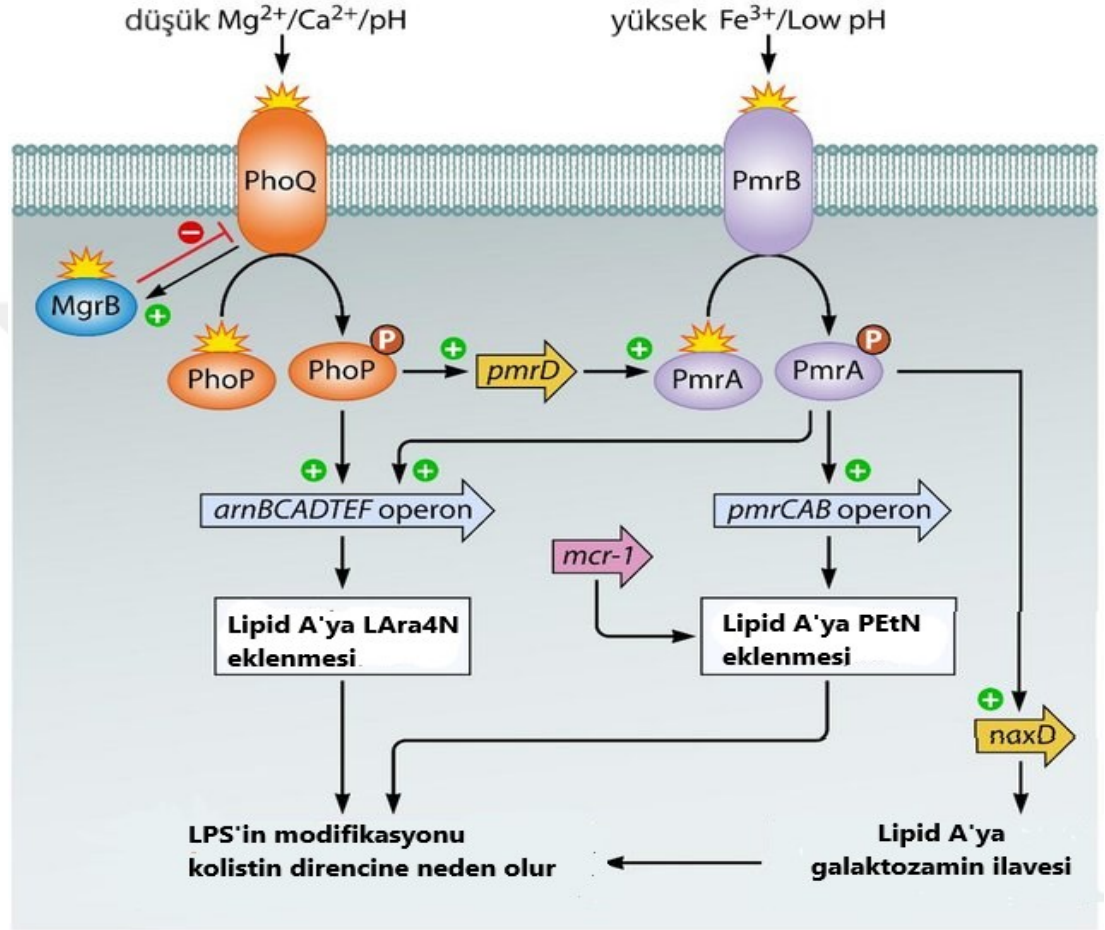
amino asit ikamelerine yol açan anlamsız ve yanlış mutasyonlar da yer almaktadır. 53,77 Gouliau ve arkadaşları, *mgrB* geninin silinmesinin, *E. coli*'de PhoP tarafından düzenlenen genin yukarı regülasyonuna yol açtığını göstermiştir (Lippa and Gouliau, 2009).

### **CrrAB İki Bileşenli Sistem**

*CrrAB* operonu iki proteini kodlar: düzenleyici protein olarak CrrA ve sensör kinaz proteini olarak CrrB. Wright ve arkadaşları, *crrB* mutasyonunun *K. pneumoniae*'de kolistin direncine yol açtığını bildirmişlerdir. Mutasyona uğramış CrrB proteini glikosiltransferaz benzeri bir proteini kodlayan *crrAB*'ye bitişik bir geni düzenler ve bu da Lipid A'nın modifikasyonuna yol açar (Wright et al., 2015). Cheng ve arkadaşlarının çalışmasında, CrrB proteinindeki altı aminoasit ikamesinin, kolistine karşı yüksek dirence yol açtığı bildirilmiştir (Cheng et al., 2016). Ancak *crrB* geninin mutasyonu/inaktivasyonu, *pmrAB* operonunun aşırı ekspresyonu yoluyla *pmrHFIJKLM* operonunun ve *pmrC* ve *pmrE* genlerinin aktivasyonuna yol açmıştır. Ayrıca L-Ara4N ve PETN'nin lipid A'ya üretimi ve eklenmesi kolistine karşı direnç kazanılmasına yol açmaktadır (Wright et al., 2015). CrrC'nin CrrAB ve *pmrAB* sistemleri arasında bir bağlantı sağladığı gösterilmiştir. *crrB* geninin mutasyonu *crrC* transkripsiyonunun artmasına neden oldu. Öte yandan, CrrB proteininin amino asit ikamelerinin bu proteinin otofosforilasyonunun artmasına ve dolayısıyla kolistin direncine yol açtığı ileri sürülmüştür (Cheng et al., 2016).

*E. coli*'de kromozomal ve plazmid aracılı kolistin direncinin mekanizması, kısaca şu şekilde özetlenebilir. Bir transmembran sensör protein kinazı olan PmrB, normalde çevresel düşük pH, yüksek  $Fe^{+}$  ve  $Al^{3+}$  iyonları tarafından aktive edilir. Aktive edilmiş PmrB, sırasıyla PETN ve L-Ara4N ekleyerek lipid A'yı değiştiren *pmrCAB* ve *arnBCADTEF* operonlarını yukarı regüle eden PmrA'yı fosforile eder. Lipid A modifikasyonu OM'nin daha az negatif yüküne yol açarak kolistin girişini engeller. Düşük pH ve  $Mg^{2+}$  iyonları, PhoP'yi fosforilasyon yoluyla aktive eden başka bir sensör protein kinazı olan PhoQ'yu aktif hale getirir. PhoP'nin etkinleştirilmesi, *PmrD* ve *arnBCADTEF* operonu dahil olmak üzere çeşitli genlerin ekspresyonuna yol açar. PmrD, fosforile edilmiş PmrA'yı stabilize ederek PhoPQ ve PmrAB'yi bağlar. PhoP ayrıca MgrB ekspresyonunu düzenler ve MgrB, PhoQ aktivitesini inhibe eder. TCS'lerin ve bunların düzenleyicilerinin farklı kısımlarının aşırı ekspresyonu, kolistine karşı kromozomal aracılı dirence yol açar veya

*E.coli*'deki kolistin direncine plazmit kaynaklı kolistin direnç genleri (*mcr*) de aracılık eder. *mcr* genleri *mcr*'yi kodlar. PEtN ekleyerek lipit A'yı değiştiren fosfoetanolamin transferaz enzimi, kromozomal yollara benzer şekilde membranın daha az negatif yüküne neden olur (Abavisani et al., 2023; Groisman, 2001; Winfield and Groisman, 2004).



Şekil 2.3. Gram negatif mikroorganizmalarda polimiksin direncinde rol oynayan LPS modifikasyon mekanizmaları (Ezadi et al., 2019) *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa*'da katyonik bileşiklerin (polimiksinler) varlığı, düşük  $Mg^{2+}$  ve  $Ca^{2+}$  konsantrasyonları, asidik pH ve yüksek  $Fe^{3+}$  konsantrasyonları gibi çeşitli stres koşullarının histidin tarafından algılanması kinazlar PhoQ ve PmrB, sırasıyla iki bileşenli sistemler (TCS'ler) PhoP-PhoQ ve PmrA-PmrB'yi aktive eder. *arnBCADTEF* ve *pmrCAB* operonlarının daha sonra aktivasyonu, sırasıyla 4-amino-4-deoksi-L-arabinoz (L-Ara4N) ve fosfoetanolaminin (PEtN) lipid A'ya sentezine ve eklenmesine yol açar. Ek olarak *pmrAB*, *pmrD* geninin ürünü aracılığıyla PhoP-PhoQ tarafından aktive edilir ve bu da *arnBCADTEF* operonunun aktivasyonu için PmrA'yı aktive eder. MgrB'nin (PhoP-PhoQ sisteminin negatif bir regülatörü) amino asit ikameleri ile etkisizleştirilmesi, *phoP-phoQ* operonunun aşırı ekspresyonuna da yol açarak *pmrHFIJKLM* operonunun aktivasyonuna neden olur, dolayısıyla L Ara4N üretimine yol açar. *pmrCAB* operonunun ve *naxD* geninin yukarı regülasyonu, sırasıyla PEtN ve galaktozaminin Lipid A'ya eklenmesini teşvik eder. Ayrıca yakın zamanda tanımlanan fosfoetanolamin transferazı kodlayan *mcr-1* geninin polimiksin direncinin ana mekanizması olduğu gösterilmiştir.

Kolistin direnci çoğunlukla kromozomal olup, genellikle spesifik iki bileşenli regülatör sistemlerini kodlayan genlerde mutasyonlara neden olabilen değişiklikler sonucu meydana gelmektedir. PhoP/PhoQ ve PmrA/PmrB iki komponentli düzenleyici sistemlerdir ve GNB’de kolistin direncine neden olan genlerin ekspresyonlarını kontrol ederler. MgrB geni PhoP/PhoQ sisteminin regülatörü olan MgrB proteinini kodlar. Bu gende meydana gelen inaktivasyonlar ve mutasyonlar kolistin direnci ile ilişkilendirilmiştir. Kromozomal mutasyonlardan kaynaklanan direnç, genellikle bakteriler arasında yatay olarak aktarılmamaktadır (McPhee et al., 2003). Kolistin veya diğer polimiksinlere karşı kazanılmış direnç hakkında çok sınırlı veri vardır. Güney Almanya’da yapılan bir çalışmada kistik fibrozisli hastalarda mukoid olmayan *P.aeruginosa* suşlarının %15.3’ü, mukoid *P.aeruginosa* suşlarının ise %3.2’sinin kolistine karşı direnç geliştirdiği tespit edilmiştir (Gales et al., 2006). *Salmonella* spp. ve *E. coli*’deki polimiksin’e karşı oluşan kazanılmış direnç mekanizmasının, LPS’deki fosfat gruplarının yer değiştirmesi ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Peterson et al., 1987). *A.baumannii*’de ise, kromozom aracılı kolistin direncinin iki ana mekanizması tanımlanmıştır. Birincisi, lipopolisakkarit üretiminin kaybı ikincisi de bakterilerin çevresel koşullara cevap vermesi, lipid modifikasyonunu etkilemesi ve bakteriyel membran geçirgenliğini azaltmasına izin veren sistemin modifikasyonudur (Olaitan et al., 2014; Ahmed et al., 2016).

*Salmonella* spp. ve *E. coli*’de polimiksinlere karşı kazanılmış direnç gözlenmiştir. Bu patojenler için, fosfat gruplarının lipopolisakaritlerin içinde bulunması, polimiksinlere karşı daha az duyarlılığa neden olmuştur (Boll et al., 1994; Landman et al., 2008; Nummila et al., 1995; Peterson et al., 1987). Lipid A gruplarının esterlenmesi, 4-fosfat (4-amino 4-deoksi-L-arabinopiranoz) ve glikosidik difosfat (2-aminoetanol ile) gibi anyonik yüklerde bir azalmaya neden olur. Yüzey yükündeki bu değişim, katyonik polimiksinlerin bakterilerin anyonik yüzeylerine bağlanmalarında azalmaya neden olur. *K. pneumoniae* için, 4-amino-4-deoksi-L-arabinopiranoz ile lipopolisakaritlerdeki fosfat gruplarının yer değiştirmesi de polimiksinlere direnç ile ilişkilendirilmiştir (Helander et al., 1996; Landman et al., 2008).

Bazı bakteriler için polimiksin direncinin kültür ortamının koşullarından etkilendiği kabul edilmiştir. Örneğin *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

hücrelerinde, karbon, azot veya fosfat yönünden zenginleştirilmemiş besi yeri kullanımının, bu bakterilerin polimiksinlere karşı duyarlılıklarının azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir (McLeod and Spector, 1996). Ayrıca, Typhimurium'da  $Mg^{+2}$  seviyelerinin düşük olması, *pmrCAB* lokusunun bir transkripsiyonel aktivatörü olan PhoP'nin indüklenmesine yol açmaktadır. PmrA ile aktive olan genler vasıtasıyla, lipopolisakarit moleküllerinde negatif yükler azalmakta, böylece  $Mg^{+2}$  için membran gereksinimi azalmaktadır. Böylece polimiksinler için gerekli katyonik bağlanma gerçekleşmemekte ve direnç gelişmektedir (Groisman et al., 1997).

#### 2.3.2.2. Plazmid Aracılı Direnç

Çok yakın zamana kadar, aktarılabılır kolistin direncinden bahsedilmemekteydi ve az sayıda araştırmacı genel olarak kolistin direnciyle ilgileniyordu. Ancak *mcr-I* geninin ilk keşfinden sonra, araştırmacılar bu konuyla daha fazla ilgilenmeye başladı ve bu konuda pek çok literatür yayınlandı (Liu et al., 2016). Bugüne kadar, *mcr* aracılı direncin epidemiyolojisi büyük ölçüde belirsizliğini korurken, mutasyon aracılı direnç de dahil olmak üzere bu direncin epidemiyolojisi hakkında daha iyi bir görüş elde etmek için yeni çalışmaların yapılması gerekiyordu. Çoğu çalışma artık *mcr* aracılı dirence odaklandığından, mutasyon aracılı direnç ihmal edilmiştir. Ancak mutasyon aracılı direncin kolistin direncinin yayılmasındaki önemi de küçümsememelidir.

Plazmid aracılı kolistin, direnç genlerinin duyarlı suşlara kolay aktarımı nedeniyle önemli bir sorun ve küresel bir endişe kaynağıdır. *mcr* genleri kolistin direncinin yatay transferinden sorumludur. Bu plazmid aracılı genler ilk olarak Kasım 2015'te Çin'de domuz ve etten izole edilen *E.coli*'de rapor edilmiştir. MCR, PETN enzim ailesinin bir üyesidir ve ekspresyonu, PETN'nin lipid A'ya eklenmesine yol açmaktadır. Literatüre göre izolatlar, *mcr-I* genini taşıyanlar, başka direnç mekanizmaları olmaksızın kolistine karşı direnç gösterirler. İzolatlarda *mcr-I*'in varlığı, diğer direnç mekanizmaları olmaksızın kolistin direnci için yeterlidir, çünkü bu geni taşıyan izolatlar, kolistin MİK'inde dört ila sekiz kat artış göstermiştir. *mcr-I* üretiminin lizozimlere karşı dirence yol açtığını belirtmekte de fayda vardır. Devam eden keşifler ile *mcr* genlerinin çeşitliliği giderek daha fazla önem kazanmıştır. *mcr* direnç genlerinin varlığı, yüksek oranlarda kolistin kullanan ülkelerle hiç kullanmayan ülkeler de dahil olmak üzere tüm dünyada tespit edilmiştir. Bugüne kadar, çok yakın zamanda rapor edilen *mcr-10* ile birlikte, 10 farklı *mcr* geni

keşfedilmiştir (Wang et al., 2018; Wang et al., 2020). *mcr* genlerinin varlığı, insanlar ve sinekler de dahil olmak üzere çok çeşitli hayvanlarla ilişkilendirilmiştir (Zhang et al., 2017; Zang et al., 2018). Farklı genlerin prevalansı, kültür veya kültür dışı teknikler kullanıldığında önemli ölçüde farklılık gösterir. Ayrıca, bu *mcr* genlerinin her birinin çoklu varyantları vardır (Zhang et al., 2017; Zang et al., 2018; Chen et al., 2018). Bu durum birlikte ele alındığında, *mcr* ile ilişkili kolistin direnç mekanizmalarının yakın zamanda keşfedildiğini göstermektedir. Bugüne kadar, kolistin direnci esas olarak kommensal bakterilerde tespit edilmiş ve hayvan patojenlerini inceleyen az sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak 2010 yılında, hayvanlardan izole edilen patojenik *E. coli*' suşlarında kolistin direncinde keskin bir artış olduğunu ortaya koyan çalışmalar yapılmıştır (Boyen et al., 2010).

*mcr* ile ilişkili kolistin direncinin epidemiyolojisini tam olarak anlamak için, kolistin kullanıldığı ülkeler de dahil olmak üzere dünyanın farklı yerlerinde *mcr* genlerinin yaygınlığı, varyantları, konumu (plazmitler) ve klonal soyları hakkında iyi standardize edilmiş çalışmalara ihtiyaç olduğu açıktır (Butaye and Wang, 2018).

İlk plazmid aracılı kolistin direnç mekanizması 2015 yılında bildirilmiştir (Liu et al., 2016). Şangay'da çiftlik hayvanlarında *E. coli*'ye yönelik yapılan yıllık direnç gözetimi sırasında, domuzlardan elde edilen *E. coli* izolatları arasındaki kolistin direnci prevalansının (%55'in üzerinde) şaşırtıcı düzeyde yüksek olduğu tespit edilmiştir (Wu et al., 2018). Kolistin direncinin bu kadar yaygın olmasının, transfer edilebilir bir kolistin direnç mekanizmasının varlığına işaret edebileceği düşünülmüştür. Bu hipotezi test etmek için konjugasyon deneyi yapılmış ve kolistine dirençli *E. coli* suşu SHP45'ten biri seçilerek kolistin direnci alıcıya başarıyla aktarılmıştır. Transfer edilen plazmid pHNSHP45, tam olarak sekanslanmış ve *mcr-I* (mobil-kolistin direnci) olarak adlandırılan genin kolistin direnci ile ilişkili olduğu keşfedilmiştir. *mcr-I* tarafından kodlanan proteinin işlevi, Lipid A analizi ile doğrulanmıştır (Liu et al., 2016). Plazmid aracılı bir kolistin direnç geninin (*mcr-I*) ortaya çıkması, kolistin direncinin gelişmesini hızlandırabileceği ve böylece kolistin etkinliğini tehdit ederek küresel kaygıya yol açabileceğini düşündürmüştür. Bugüne kadar, 50'den fazla ülkede *mcr-I* genini taşıyan suşların varlığı gösterilmiş ve bu gen çevre, gıda, insan ve hayvan kaynaklı birçok *Enterobacteriaceae* türünde (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Cronobacter sakazakii*, *Kluyvera ascorbata*,

*Citrobacter freundii*, *Citrobacter braakii*, *Providencia rettgeri* ve *Raoultella ornithinolytica*) tespit edilmiştir (Bakthavatchalam et al., 2017; Feng, 2018). Ayrıca farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda 10 *mcr* varyantı tespit edilmiş ve bu varyantların verileri Genbank'ta mevcuttur (*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7*, *mcr-8*, *mcr-9*, *mcr-10*) (Tablo 2.2) (Dalmolin et al., 2018; Wang et al., 2020). *mcr-2* geni 1.617bp uzunluğunda, *mcr-1*'den (1.626 bp) dokuz baz daha kısadır ve *mcr-1*'le %76.7 oranında nükleotit benzerliğine sahiptir (Xavier et al., 2016). *mcr-3* geni ise *mcr-1* ve *mcr-2* genleriyle sırasıyla %45 ve %47 oranında nükleotid benzerliğine sahiptir. *mcr-3* ayrıca üç *Aeromonas* türünde bulunan proteinlerle %94.1 ile %94.8 oranında aminoasit özdeşliği göstermiştir. Bu bulgular *Enterobacteriales*'teki *mcr-3* geninin *Aeromonas* türlerinden kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir (Yin et al., 2017). *mcr-4*, kendiliğinden konjuge olmayan küçük bir plazmid içine yerleştirilmekte bu plazmide yardımcı bir plazmid ilave edilmesi konjügasyonu teşvik etmektedir (Carattoli et al., 2017). *mcr-9* geni, 2010 yılında Washington Eyaletindeki bir insandan izole edilen çoklu ilaca dirençli (MDR) Typhimurium (*S.Typhimurium*) suşunda saptanmış ve *mcr-9*'un aminoasit sekansının, *mcr-3*'le %64.5 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Dokuz *mcr* homologu (*mcr-1/9*) ile ilişkili protein yapılarının ikili karşılaştırmaları sonucunda, *mcr-9*, *mcr-3*, *mcr-4* ve *mcr-7*'nin yapısal düzeyde yüksek derecede benzerlik gösterdiği ortaya konulmuştur. Yapılan çalışmalar sonucunda, *mcr-9*'un *Enterobacteriaceae*'da da kolistine fenotipik direnç sağladığı tespit edilmiş ve bunun dikkate alınması gerektiği vurgulanmıştır (Carroll et al., 2019).

Tablo 2.2. *mcr* varyantlarının ülkelere ve hayvan türlerine göre dağılımı (Dalmolin et al., 2018; Wang et al., 2020).

| Gen          | Ülke                           | Hayvan türü  | Bakteri                                                                     | Referans               | Varyant                             |
|--------------|--------------------------------|--------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|
| <i>mcr-1</i> | Çin                            | Tavuk, domuz | <i>E.coli</i> ,<br><i>K.pneumoniae</i>                                      | Liu et al., 2016       | <i>mcr-1.2</i> -<br><i>mcr-1.13</i> |
| <i>mcr-2</i> | Belçika                        | Domuz, sığır | <i>E.coli</i>                                                               | Xavier et al., 2016    | <i>mcr-2.2</i>                      |
| <i>mcr-3</i> | Çin                            | Domuz        | <i>E.coli</i>                                                               | Yin et al., 2017       | <i>mcr-3.2</i> -<br><i>mcr-3.12</i> |
| <i>mcr-4</i> | İtalya,<br>İspanya,<br>Belçika | Domuz        | <i>S. enterica</i> , <i>E.coli</i>                                          | Carattoli et al., 2017 | <i>mcr-4.2</i>                      |
| <i>mcr-5</i> | Almanya                        | Domuz        | <i>S.enterica</i> subsp.<br><i>enterica</i> serovar<br><i>Paratyphi B</i> . | Borowiak et al., 2017  | <i>mcr-5.2</i>                      |



|               |                |              |                                       |                      |              |
|---------------|----------------|--------------|---------------------------------------|----------------------|--------------|
| <i>mcr-6</i>  | Büyük Britanya | Domuz        | <i>Moraxella</i> spp.                 | Abu Oun et al., 2017 | -            |
| <i>mcr-7</i>  | Çin            | Tavuk        | <i>K.pneumoniae</i>                   | Yang et al., 2018    | -            |
| <i>mcr-8</i>  | Çin            | Domuz, Tavuk | <i>K.pneumoniae</i>                   | Wang et al., 2018    | -            |
| <i>mcr-9</i>  | USA            | İnsan        | <i>S.enterica</i> serotip typhimurium | Carrol et al., 2019  | -            |
| <i>mcr-10</i> | Çin            | İnsan        | <i>E. roggenkampii</i>                | Wang et al., 2020    | <i>mcr-9</i> |

Ayrıca, yapılan çalışmalar sonucunda, *Enterobacteriaceae* suşları arasında *mcr-1* genini taşıyan plazmidlerin transfer sıklığının çok yüksek olduğu tespit edilmiş, bu da *mcr-1* geninin hızla yayılma potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymuştur (Liu et al., 2016; Zhi et al., 2016). *mcr-1* geninin hayvanlardan orjin aldığı düşünülmektedir. Bu durumu destekleyen birkaç hipotez öne sürülmüştür. İlk olarak, veteriner hekimlerin tedavi amacıyla kolistin uygulamaları sonucu bu gen hayvanlar arasında kolay bir şekilde yayılabilmektedir. İkinci hipotez ise, *mcr-1* geninin ilk olarak domuz patojeni olan *Actinobacillus pleuropneumoniae*'dan tanımlanmış olan ISAp11 ile ilişkili olmasıdır. Ayrıca, *mcr-1* pozitif suşların genellikle sadece veteriner hekimlikte kullanılan ve florfenikol'e direnç gösteren *floR* genini taşıdığı tespit edilmiştir (Poirel and Nordman, 2016).

Tablo 2.3. Gram negatif bakterilerin kolistin direnci kazanmada kullandıkları doğal ve kazanılmış direnç stratejileri (Aghapour et al., 2019).

| Genler                   | Gen fonksiyonu                                                                                                               | <i>E. coli</i> | <i>Kpneumoniae</i> | <i>Enterobacter</i><br>spp. | <i>Salmonella</i><br>spp. | <i>C. freundii</i> | <i>P. mirabilis</i> | <i>S. marcescens</i> |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|--------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------|---------------------|----------------------|
| <i>pmrA/pmrB</i>         | <i>arnBCADTEF</i> operon <i>pmrC</i> and <i>pmrE</i> genes tarafından lipidA modifikasyonu                                   | +              | +                  | +                           | +                         | -                  | -                   | -                    |
| <i>phoP/phoQ</i>         | <i>pmrHFIJKLM</i> operonunun aktivasyonu ile/ <i>pmrD</i> tarafından <i>pmrAB</i> 'nin aktivasyonu ile lipid A modifikasyonu | +              | +                  | +                           | +                         | -                  | -                   | -                    |
| <i>arnBCADTEF</i>        | pEtN ve L-4AraN tarafından lipid A modifikasyonu                                                                             | +              | +                  | +                           | +                         | -                  | +                   | +                    |
| <i>mgrB</i> Mutasyonu    | <i>phoPQ</i> aşırı ekspresyonu ve <i>pmrHFIJKLM</i> aktivasyonu                                                              | +              | +                  | -                           | -                         | -                  | -                   | -                    |
| <i>ramA</i>              | lipid A biyosentezinin modülasyonu                                                                                           | -              | +                  | -                           | -                         | -                  | -                   | -                    |
| <i>crrB</i> mutasyonu    | <i>pmrAB</i> /aktivasyonun upregülasyonu ile lipid A modifikasyonu                                                           | -              | +                  | -                           | -                         | -                  | -                   | -                    |
| <i>mcr1</i>              | Fosfoetanolamin transferaz                                                                                                   | +              | +                  | +                           | +                         | +                  | -                   | -                    |
| <i>mcr2</i>              | Fosfoetanolamin transferaz                                                                                                   | +              | -                  | -                           | +                         | -                  | -                   | -                    |
| <i>mcr3</i>              | Fosfoetanolamin transferaz                                                                                                   | +              | -                  | -                           | +                         | -                  | -                   | -                    |
| <i>mcr4</i>              | Fosfoetanolamin transferaz                                                                                                   | +              | -                  | +                           | +                         | -                  | -                   | -                    |
| <i>mcr5</i>              | Fosfoetanolamin transferaz                                                                                                   | +              | -                  | +                           | +                         | -                  | -                   | -                    |
| <i>mcr6</i>              | Fosfoetanolamin transferaz                                                                                                   | -              | -                  | -                           | -                         | -                  | -                   | -                    |
| <i>mcr7</i>              | Fosfoetanolamin transferaz                                                                                                   | -              | +                  | -                           | -                         | -                  | -                   | -                    |
| <i>mcr8</i>              | Fosfoetanolamin transferaz                                                                                                   | +              | +                  | -                           | -                         | -                  | -                   | -                    |
| <i>acrB</i> Mutasyonu    | Efflux pompası                                                                                                               | +              | +                  | -                           | -                         | -                  | -                   | -                    |
| KpnEF Mutasyonu          | Efflux pompası                                                                                                               | -              | +                  | -                           | -                         | -                  | -                   | -                    |
| <i>sapABCD</i> Mutasyonu | Efflux pompası                                                                                                               | -              | -                  | -                           | -                         | -                  | +                   | -                    |

## 2.4. Kolistin Direncinin Fenotipik ve Genotipik İdentifikasyonu

### 2.4.1. Fenotipik İdentifikasyon

Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (EUCAST) gibi uluslararası standart belirleme kuruluşları, Mart 2016'da sadece kolistin duyarlılığının test edilmesi için Buyyon Mikrodilüsyon (BMD) yöntemini öneren ortak bir polimiksin duyarlılığı belirleme çalışma grubu oluşturmuştur. BMD, polimiksinlerin agar yüzeyine zayıf diffüzyonu vb. teknik zorluklar nedeniyle, altta yatan direnç mekanizmasını tam olarak tespit edememesine rağmen polimiksinlerin duyarlılık profilini belirlemek için referans test olarak kabul edilmektedir (Falagas et al., 2005; WHO, 2018). Bu nedenle, *Enterobacteriaceae*, *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp. türleri, katyon ayarlı Mueller-Hinton buyyonun kullanıldığı Uluslararası Standardizasyon Örgütü standart BMD yöntemine (ISO 20776-1) göre test edilmelidir. Testin hiçbir kısmına polisorbata-80 veya diğer yüzey aktif maddeleri dahil edilmez, çünkü örneğin polisorbata 80, polimiksinlerle sinerjistik bir etkiye girebilir ve minimum inhibitör konsantrasyonunu yapay olarak düşürebilir. Yüzeyler düz polistirenden yapılmalı ve polimiksinlerin sülfat tuzları kullanılmalıdır (kolistin metan sülfonat türevleri, çözeltide yavaşça parçalanan aktif olmayan bir ön ilaç olduğu için kullanılamaz) (WHO, 2018). Kolistin direncinin fenotipik tespitinde kalite kontrolü esastır. Kullanılan yöntemin güvenilir sonuçlar vermesini sağlamak için EUCAST tarafından düşük seviyeli kolistin direncine sahip bir suşun (*mcr-1*-pozitif *E. coli* NCTC 13846 gibi) dahil edilmesi önerilmektedir. Fenotipik sonuçlar ya saha suşu ya da saha suşu olmayan popülasyonları tanımlayan epidemiyolojik (EUCAST veya CLSI'ye göre) veya klinik duyarlılık ve direnci belirleme testleri olarak yorumlanabilir ve rapor edilebilir (WHO, 2018).

Yeni antitimikrobiyallerin karşılaştırıldığı klinik çalışmalar, GNB'lerin neden olduğu infeksiyonların tedavisi için kolistinin klinik etkinliği hakkında yeni veriler sunmaktadır. Klinik sonuçlara göre, kolistin özellikle diğer ilaçlar mevcut olduğunda zayıf mono-terapötik bir seçenek gibi görünmektedir (Groisman, 2001). Özellikle, farmakokinetiği hastalar arasında geniş ölçüde farklılık gösterdiğinden kolistin dozu karmaşıktır (Lippa and Goulian, 2009). Bu nedenle, hâlihazırda belirlenen sınır değerlerin ve epidemiyolojik eşik değerlerin klinik kararları doğru bir şekilde

bilgilendirip bilgilendirmediğini belirlemek için klinik sonuçların daha fazla gözden geçirilmesi gerekmektedir.

BMD ile antimikrobiyal duyarlılık testi, standart disk difüzyonu ve gradyan difüzyon yöntemleri ve diğer fenotipik yöntemlerden daha fazla laboratuvar kapasitesi gerektirir. Bununla birlikte, diğer yöntemler ya yeterince doğru değildir ya da bilinen tüm kolistin direnç mekanizmalarını ifade eden farklı türler (yani çoğu *Enterobacteriaceae* ve Gram negatif fermente edici olmayanlar) dahil olmak üzere büyük bakteri koleksiyonları ile titiz çok merkezli bir değerlendirmeye tabi tutulmamıştır. Bu nedenle, bu yöntemler henüz en iyi uygulama olarak önerilemez. Umut verici görünen ancak yine de yukarıda açıklanan titiz değerlendirmeye tabi tutulan ve kolistin direncini tespit edebilen birkaç fenotipik test daha bulunmaktadır, bunlar: Colistin MAC Testi (CMT); Birleşik Disk Testi (CDT); Kolistin MİK İndirgeme Testi (CMR); Modifiye Rapid Polymyxin NP Testi (modifiye-RPNP) ve Zeta potansiyel testlerinin değiştirilmesi gibi testlerdir (Coppi et al., 2018). Klinik mikrobiyoloji laboratuvarları hastane ortamlarındaki taşıyıcıları tanımlamak için hızlı ve güvenilir bir tarama ortamına ihtiyaç vardır. Girlich vd. (2018), hem ticari olarak temin edilebilen besiyerleri olan ChromID Colistin R ve Superpolimiksin'in kolistin taramasında yararlı araçlar olduğunu göstermişlerdir.

#### 2.4.2. Genotipik İdentifikasyon

Küresel Antimikrobiyal Direnç İzleme Sistemi (GLASS), fenotipik testlerle sadece hedef patojenlerin antimikrobiyal duyarlılığı hakkında veri toplanabileceğini fakat spesifik direnç mekanizmalarının dağılımı konusunda veri toplanamayacağını vurgulamaktadır. Genotipik sonuçlar, belirtilen kolistin direnç mekanizmasını, direnç geninin varlığı veya yokluğu olarak rapor etmelidir. Şu anda uygulanan moleküler testler kolistin direnç mekanizmalarını yeterince duyarlı veya spesifik özellikte belirleyebilme özelliğine sahip değildir. Özellikle, genotipik yöntemler fenotipik kolistin direncinin çoğundan sorumlu olduğu bilinen tüm kromozomal mutasyonları tespit edebilecek özellikte değildir, sadece kazanılmış kolistin direnç genlerini saptayabilmektedir (Olaitan et al., 2014). Kolistin direncinin belirlenmesine yönelik moleküler yöntemler aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

- Gen Mutasyonlarını Tespit Etmek İçin PCR Amplifikasyonu ve Dizileme
- *mcr* Genlerinin Varlığını Saptamak için Gerçek Zamanlı qPCR

- Plazmid üzerinde kodlanan *mcr* Genlerini Saptamak için PCR
- Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD-PCR)
- Mikroarray Teknolojisi
- Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon (LAMP)
- Doğrudan Direnç Analizi ile Yeni Yaklaşımlar

Moleküler biyoloji yöntemleri, direnç genlerinin veya direnç sağlayan mutasyonların varlığını değerlendirerek antimikrobiyal direncini belirlemede en hassas yöntemlerdir. Bu yöntemler fenotipik teknikleri tamamlayıcı niteliktedir ve bakteri izolatlarının dirençli durumunu doğrular. (Bardet and Rolain, 2018).

*mcr-1* geninin varlığını saptamak için hızlı bir kantitatif teknik olan RT-PCR yöntemi uygulanabilir. Bu tür amaçlar için, Liu vd., (2016) , orijinal çalışmanın primerlerini kullanarak veya standart PCR veya RT-PCR için SYBR Green testleriyle birlikte, TaqMan probu veya diğer FAM etiketli prob veya HEX etiketli proba dayalı yöntemlerle kendi primerlerini tasarlayarak çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir (Wright, 2010; Bontron et al., 2016; Irggang et al., 2016; Lekunberry et al., 2017; Nijhuis et al., 2016; Snesrud et al., 2017; Yang et al., 2017).

Xavier vd. (2016), 567 bp'lik bir ürün veren *mcr-2*'yi taramak için yeni primerler tasarlarken bazı araştırmacılar ise, standart PCR uygulamaları için kendi primerlerini tasarlamış ve qPCR uygulamalarında kullanmak üzere bir TaqMan testi geliştirmişlerdir (Barbieri et al., 2017; Roschanski et al., 2017; Simmen et al., 2016; Sun et al., 2017). Konvansiyonel PCR ile hem *mcr-1* hem de *mcr-2* genlerini saptamak için klasik bir primer ve bunları qPCR testi ile belirlemek için yeni bir primer ve bir prob tasarlayarak çalışmalarını daha ileri boyuta taşımışlardır (Barbieri et al., 2017; Poirel et al., 2017; Terveer et al., 2017). Böylece konvansiyonel PCR ile *mcr-3*, *mcr-4* ve *mcr-5* genlerini saptamak için primerler tasarlamışlardır (Borrowiak et al., 2017; Carattoli et al., 2017; Yin et al., 2017). Sonuç olarak, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* ve *mcr-5* genlerinin eş zamanlı saptanması amacıyla multipleks SYBR Green qPCR testini geliştirmişlerdir (Bardet and Rolain, 2018; Li et al., 2017; Rebelo et al., 2018).

Borowiak vd. (2020) yılında Almanya'da 2011-2018 yılları arasında rutin teşhislerin yanı sıra ulusal izleme ve surveyans programları çerçevesinde toplanan besi hayvanlarından, gıdalardan ve evcil hayvanlardan elde edilen toplam 407 adet

kolistine dirençli *S. enterica* izolatında 254 *mcr* taşıyan izolatı, daha önce yayınlanmış bir *mcr-1* ile *mcr-5* multipleks PCR testi (Rebelo et al., 2018), ile kombinasyon halinde *mcr-6* ile *mcr-9* genlerini tespit edebilen yeni bir multipleks PCR testi geliştirmişlerdir.

Cwiek vd. (2021) yılında yaptıkları çalışmada, farklı kanatlı hayvan türlerinden (etlik piliç, yumurta tavuğu, hindi, kaz ve ördek) izole edilen *E. coli* suşları arasında *mcr* genlerinin (*mcr-1,mcr-5*) prevalansını değerlendirmek amacıyla, *mcr*-pozitif suşların antimikrobiyal duyarlılık fenotiplerini belirleyerek gözlenen fenotiplerin AMR genlerinin varlığını PCR yöntemi ile, *mcr1*-pozitif *E.coli* suşlarının genetik ilişkisini ise multilokus dizi tiplendirme yöntemiyle (MLST) tespit etmişlerdir.

Tüm Genom Dizisi (WGS) ve PCR, kültürlenmiş bakterilerin yanı sıra klinik, fekal, çevresel ve gıda kaynaklı örneklerde de *mcr* genini tanımlamak için kullanılan referans testler olarak kabul edilirler (Rebelo et al., 2018; Sekyere and Asente, 2018). PCR, spesifik primerler ve probalar nedeniyle sadece bilinen *mcr* genlerini saptayabilirken, WGS bilinen veya bilinmeyen tüm kolistin direnç mekanizmalarını 2 gün içinde tanımlayabilir. Diğer moleküler testler ise, hem laktamazları hem de *mcr-1/-2* genlerini aynı anda tespit edebilen ticari mikrodizilerdir. Ancak bu testler yetersiz kaynaklara sahip laboratuvar şartlarında uygulanmamaktadır (Dalmolin et al., 2018; Sekyere and Asente, 2018).

Transfer edilebilir kolistin direncini saptamak için uygulanan veya ticari olarak da temin edilebilen; *mcr-1* ile *mcr-5*’e kadar kolistin direncini tespit edebilen multipleks PCR testleri bulunmaktadır. PCR moleküler testinde negatif sonuçlar kolistin duyarlılığını belirlemek için kullanılmamaktadır. Çünkü test kromozomal direnç mekanizmalarının varlığını veya teste dahil olmayan yeni *mcr* genlerinin varlığını ortadan kaldıramaz. Bu sınırlamanın kanıtı olarak, Brezilya ve İtalya’da yapılan çalışmalarda karbapenemaz üreten fakat *mcr* genleri olmayan *K.pneumoniae* suşları arasında yüksek kolistin direnç oranları bildirilmiştir (WHO, 2018).

*E. coli* izolatlarının tiplendirilmesi ve ayırt edilebilmesi için uygulanan yöntemlerden biri de Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD-PCR) metodudur. Bu metot, diğer moleküler yöntemlere göre daha hassas ve daha uygun maliyetlidir (Osek, 2000; Wang, 1993). RAPD-PCR, rastgele dizilime sahip kısa oligonükleotidlerin kullanıldığı PCR tabanlı basit bir genotipleme yöntemidir

(Williams et al., 1990). Rastgele diziler rastgele priming bölgelerine bağlanır ve değişken uzunluktaki DNA segmentlerini çoğaltır (Hadrys et al., 1992). Bu, küçük ve büyük DNA parçalarından oluşan bir modelle sonuçlanır (Williams et al., 1990). RAPD'nin gücü çoklu primer dizilerinin kullanılmasından kaynaklanmaktadır.

Moleküler yöntemler her ne kadar duyarlılıkları düşük olsa da, şu anda bilinen tüm kolistin direnç mekanizmalarını saptamanın en kapsamlı alanlarıdır. Ayrıca, yeni direnç mekanizmaları açıklandıkça, moleküler testler sekanslama verilerinin geriye dönük analizlerini de mümkün kılacaktır. Moleküler testler, kolistin direncinin belirlenmesi için fenotipik testlere bir alternatif sunabilir. Bununla birlikte, sonuçların klinik tedaviye rehberlik etmesi amaçlanıyorsa, sadece bir genotipik sonuca dayanan fenotipin çıkarılması, ancak genotipik sonuç pozitif olduğunda muhtemel olabilir. Genotipik testin sonuçları negatifse, fenotip hakkında herhangi bir çıkarım yapılmamalıdır (WHO, 2018).

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1. Örnekler**

Samsun'un 3 farklı ilçesinde kurulmuş olan 10 farklı kümesten toplam 510 adet örnek toplandı. Çalışma materyalini oluşturmak üzere Amerikan tip rastgele örnekleme metodu ile her kümesteki tavuklardan 25'er adet olmak üzere toplam 250 adet kloakal swap örneği ile 25'er adet olmak üzere toplam 250 adet yemlik/suluk materyali ve 1'er adet olmak üzere toplam 10 adet altlık materyali alındı.

#### **3.2. İzolasyon ve İdentifikasyon**

Laboratuvara getirilen örneklerden izolasyon amacıyla MacConkey, Eozin-Metilen Blue (EMB) ve Triptik Soy Agar (TSA) olmak üzere üç farklı besi yeri kullanılmıştır.

##### **3.2.1. Altlık ve Yemlik-Suluk Materyallerinden İzolasyon ve İdentifikasyon**

Altlık materyallerinden 10 örnek, yemlik ve suluk materyallerinden 250 örnek, ön zenginleştirme amacıyla 100 ml tamponlanmış peptonlu su (TPS) içerisine konularak 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonu takiben TPS içerisinden 100µl alınarak MacConkey Agar'a çizme ekim metodu kullanılarak ekimler gerçekleştirildi ve 37°C'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda laktoz pozitif olan pembe renkli kolonilerden tek koloni olacak şekilde alınarak EMB Agar'da 37°C'de 24 saat subkültüre edildi. İnkübasyon süresi sonunda metalik röfle oluşturan koloniler *E. coli* olarak identifiye edildi. Moleküler ve antimikrobiyal duyarlılık testlerinde kullanılmak üzere izolatlar TSA'da pasajlandı ve saf kolonilerden gliserinli buyyon içerisine alınarak -20°C'de saklandı.

##### **3.2.2. Kloakal Swap Materyallerinden İzolasyon ve İdentifikasyon**

Toplam 250 adet kloakal swap örneği MacConkey Agara çizme ekim metodu kullanılarak inokule edildi ve 37°C'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda laktoz pozitif olan pembe renkli kolonilerden tek koloni olacak şekilde alınarak EMB Agar'a inokule edildi ve 37°C'de 24 saat subkültüre edildi. İnkübasyon süresi sonunda metalik röfle oluşturan koloniler *E.coli* olarak identifiye edildi. Moleküler analizler ve antimikrobiyal duyarlılık testlerinde



kullanılmak üzere izolatlar TSA'da pasajlandı ve saf kolonilerden gliserinli buyyon içerisine alınarak -20°C'de saklandı.

### 3.3. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

İşletmelerden izole edilen ve *E. coli* olarak identifiye edilen izolatların eritromisin, amoksisilin+klavulanik asit, trimetoprim+sülfometaksazol, gentamisin, sefotaksim, meropenem ve oksitetrasiklin olmak üzere 5 farklı gruptan antimikrobiyale karşı duyarlılıkları Kirby-Bauer Disk Difüzyon Metodu ile gerçekleştirildi. TSA'da pasajlanan izolatların fizyolojik tuzlu su (FTS) içerisinde 0,5 MacFarland yoğunluğunda süspansiyonları hazırlandı ve bu süspansiyonlardan 100'er µl alınarak Müller-Hinton Agar (MHA) yüzeyine yayma ekimleri yapıldı. Daha sonra MHA yüzeyine antimikrobiyal diskleri yerleştirilerek 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda oluşan zon çapları ölçülerek CLSI 2020'ye göre değerlendirildi (CLSI, 2020). İzolatların çoklu ilaç direnç durumları, izolatların üç veya daha fazla antimikrobiyal grubuna birden sergiledikleri direnç dikkate alınarak değerlendirildi.

### 3.4. Kolistinin Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi

Kolistinin altlık, kloakal ve çevresel materyallerden izole ve identifiye edilen *E. coli* izolatları için minimal inhibitör konsantrasyonlarının belirlenmesinde mikrobuyyon dilüsyon tekniği kullanıldı. Bu amaçla kolistin sülfat tuzunun 128 mg/L'den 0,25 mg/L'ye kadar seri sulandırmaları katyon-ayarlı Mueller Hinton Buyyon kullanılarak yapıldı. Test edilecek tüm izolatların fizyolojik tuzlu su içerisinde 0,5 MacFarland (~1-2x10<sup>8</sup> kob/ml) yoğunluğunda bakteri süspansiyonları hazırlandı. Mikropleyttteki tüm kuyucuklara 100 µl katyon ayarlı Mueller Hinton buyyon steril koşullarda eklendi. İlk kuyucuğa hazırlanan kolistin sülfatın stok solüsyonundan 100 µl ilave edilerek kolistin sülfatın çift katlı sulandırması yapıldı. Besi yeri ve antimikrobiyal içeren kuyucukların içerisine test edilecek izolatlardan 100 µl inoküle edilerek 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda MİK, EUCAST (2021)'de belirtilen şekilde değerlendirildi. MİK'e göre değerlendirme; kolistine duyarlı ≤2 mg/L, kolistine dirençli >2 mg/L şekilde yapıldı.

### 3.5. İzolatların DNA Ekstraksiyonu

İzolatların moleküler yönden değerlendirilmesi için üreyen saf kolonilerden DNA ekstraksiyonları kaynatma metodu ile gerçekleştirildi. Bu amaçla 500 µl steril distile su içerisine birkaç koloni alınarak 100°C'de 10 dakika kaynatıldı ve homojenizat 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında supernatant DNaz/RNaz ari tüplere alınarak DNA konsantrasyonları ölçüldü. Ölçüm sonrasında her bir izolata ait DNA'lar 5 ng/ml olacak şekilde ayarlanarak -20°C'de saklandı.

### 3.6. Kolistin Direncinden Sorumlu *mcr* Genlerinin Belirlenmesi

İşletmelerden izole edilen *E. coli* suşlarında kolistin direncinden sorumlu *mcr-1*, *mcr-2* ve *mcr-3* genlerin belirlenmesi için PCR analizleri gerçekleştirildi. *mcr-1*, *mcr-2* ve *mcr-3* genlerine ait primerler Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3* genlerinin belirlenmesinde ve genotiplendirmede kullanılan primerler.

| Hedef (ler)     | Primer Adı                           | Gen Dizilimi                                   | Amplikon Büyüklüğü (bp) | Kaynak                    |
|-----------------|--------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------|
| <i>mcr-1</i>    | CLRF5<br>CRLF5                       | CGGTCAGTCCGTTTGTTCCTTG<br>GTCGGTCTGTAGGG       | 309 bp                  | Liu et al., 2016          |
| <i>mcr-2</i>    | MCR <sub>2</sub><br>MCR <sub>2</sub> | TGGTACAGCCCCTTTATT<br>GCTTGAGATTGGGTTATGA      | 567 bp                  | Xavier et al., 2016       |
| <i>mcr-3</i>    | MCR3<br>MCR3                         | TTGGCACTGTATTTTGCATTT<br>TTAACGAAATTGGCTGGAACA | 542 bp                  | Yin et al., 2017          |
| <i>Değişken</i> | ERIC2                                | AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG                         | Çoklu bant              | Versalovic et al., (1991) |

#### 3.6.1. *mcr-1* Gen Varlığının Araştırılması

PCR reaksiyonu karışımı; toplam hacim 20 µl olacak şekilde, 4 µl master miks, 13 µl DNaz/RNaz'dan ari distile su, forvard ve revers primerlerden 0,5'er µl ve 2 µl kalıp DNA kullanılarak hazırlandı.

Amplifikasyon ısı döngü cihazında; 95°C'de 12 dk başlangıç denatürasyonu, 95°C'de 30 sn denatürasyon, 50°C'de 30 sn primer bağlanması, 72°C'de 45 sn sentez döngüsünden toplam 30 döngü ve son sentez aşaması 72°C'de 7 dk olacak şekilde düzenlenen program kullanılarak yapıldı.

### 3.6.2. *mcr-2* Gen Varlığının Araştırılması

PCR reaksiyonu karışımı; toplam hacim 20 µl olacak şekilde, 12,5 µl master miks, 3,5 µl DNaz/RNaz'dan ari distile su, forward ve revers primerlerden 1'er µl ve 2 µl kalıp DNA kullanılarak hazırlandı.

Amplifikasyon ısı döngü cihazında; 94°C'de 15 dk başlangıç denatürasyonu, 94°C'de 30 sn denatürasyon, 55°C'de 90 sn primer bağlanması, 72°C'de 60 sn sentez döngüsünden toplam 30 döngü ve son sentez aşaması 72°C'de 10 dk olacak şekilde düzenlenen program kullanılarak yapıldı.

### 3.6.3. *mcr-3* Gen Varlığının Araştırılması

PCR reaksiyonu karışımı; toplam hacim 25 µl olacak şekilde, 14,2 µl DNaz/RNaz'dan ari distile su, 2,5 µl 10x PCR buffer, 1,5 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,6 µl dNTP, 0,2 µl Taq Polimeraz, forward ve revers primerlerden 0,5'er µl ve 5 µl kalıp DNA kullanılarak hazırlandı.

Amplifikasyon ısı döngü cihazında; 95°C'de 15 dk başlangıç denatürasyonu, 95°C'de 30 sn denatürasyon, 50°C'de 90 sn primer bağlanması, 72°C'de 45 sn sentez döngüsünden toplam 30 döngü ve son sentez aşaması 72°C'de 7 dk olacak şekilde düzenlenen program kullanılarak yapıldı.

## 3.7. Genotiplendirme

Kolistin direncinden sorumlu *mcr-1*, *mcr-2* ve *mcr-3* genlerine sahip olduğu belirlenen kloakal, yemlik/suluk ve altlık izolatlarının ayrı ayrı RAPD-PCR ile genotiplendirilmesi yapıldı. *ERIC-2* primerleri kullanılarak yapılan RAPD-PCR, Versalovic vd. (1991) tarafından bildirilen metod ile gerçekleştirildi. Her bir izolat için ayrı olmak üzere DEPC-treated water, 1X PCR buffer, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dNTP, 2,5 U Taq Polimeraz, 25 pmol *ERIC-2* primeri ve 5 µl hedef DNA içeren 25 µl'lik RAPD master karışımı oluşturuldu. Bu karışım 95°C'de 1 dakika denatürasyon, 40°C'de 1 dakika annealing, 72°C'de 3 dakika ekstensiyon olmak üzere 40 siklus ve 72°C'de 7 dakika son uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu. Amplikonlar etidyum bromid (2 mg/ml) içeren %1,5'lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi.

Görüntüleme sonucunda oluşan paternlerin filogenetik ağaçları UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) metodu ile görüntü analiz programı kullanılarak çizildi. İzolatlar arasındaki filogenetik ilişki %70 eşik değeri baz alınarak belirlendi.



## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon

On farklı kümeden alınan altlık numunelerinden 6 adet *E. coli* (%60) izole edildi. Aynı kümeslerden alınan kloakal svaplardan toplam 200 adet *E. coli* (%80) izole edilirken, yemlik ve suluk örneklerinden toplam 111 adet *E. coli* (%44,4) izole edildi.

Elde edilen izolatlar ve izolatların orjinleri Tablo 4.1 de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Altlık, yemlik-suluk ve kloakal svaplardan elde edilen *E.coli* izolatları.

| Örneklerin alındığı yer | Kümes sayısı | Toplam Örnek Sayısı | <i>E.coli</i> |
|-------------------------|--------------|---------------------|---------------|
| Altlık materyali        | 10           | 10                  | 6             |
| Kloakal swap            | 10           | 250                 | 200           |
| YemlikSuluk Materyali   | 10           | 250                 | 111           |

### 4.2. İzolatların Antimikrobiyal Direnç Profilinin Belirlenmesi

İşletmelerden izole edilen toplamda 317 *E.coli* izolatının eritromisin, amoksisilin+klavulanik asit, trimethoprim+sülfometaksazol, gentamisin, sefotaksim, meropenem ve oksitetrasikline karşı duyarlılıkları her bir numune tipine göre tablolar halinde verilmiştir.

Altlık numunelerinden izole edilen *E.coli* izolatlarının tamamının amoksisilin+klavulanik asit, eritromisin ve trimethoprim+sülfometaksazole, %83,3'ünün sefotaksim ve oksitetrasikline, %66,7'sinin gentamisine dirençli olduğu belirlendi. İzolatların tamamının meropeneme duyarlı olduğu ortaya konuldu. Ayrıca izolatların tamamının çoklu antimikrobiyal dirence sahip olduğu belirlendi (Tablo 4.2 ve Tablo 4.5).

Tablo 4.2. Altılık numunelerinden izole edilen *E. coli* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık sonuçları.

| Antimikrobiyaller |        |                  |                  |                  |                 |                |                  |                 |
|-------------------|--------|------------------|------------------|------------------|-----------------|----------------|------------------|-----------------|
|                   |        | Beta-laktam      |                  |                  | Aminoglikozit   | Makrolit       | Sülfanomid       | Tetrasiklin     |
|                   |        | AMC <sup>1</sup> | MEM <sup>2</sup> | CTX <sup>3</sup> | CN <sup>4</sup> | E <sup>5</sup> | SXT <sup>6</sup> | TE <sup>7</sup> |
| <b>R</b>          | n<br>% | 6<br>100         | 0<br>0           | 5<br>83,3        | 4<br>66,7       | 6<br>100       | 6<br>100         | 5<br>83,3       |
| <b>I</b>          | n<br>% | 0<br>0           | 0<br>0           | 0<br>0           | 0<br>0          | 0<br>0         | 0<br>0           | 0<br>0          |
| <b>S</b>          | n<br>% | 0<br>0           | 6<br>100         | 1<br>16,7        | 2<br>33,3       | 0<br>0         | 0<br>0           | 1<br>16,7       |
| <b>MDR</b>        | n<br>% | 6<br>100         |                  |                  |                 |                |                  |                 |

1: Amoksisilin+klavulanik asit, 2: Meropenem, 3: Sefotaksim, 4: Gentamisin, 5: Eritromisin, 6: Trimethoprim+sülfometaksazol, 7: Oksitetrasiklin, R: Dirençli, I: Orta derecede duyarlı, S: Duyarlı, n: İzolat sayısı, MDR: Çoklu Antimikrobiyal Direnci.

Yemlik ve suluklardan izole edilen *E. coli* izolatlarının amoksisilin+klavulanik asite %93,7, meropeneme %2,7, sefotaksime %48,6, gentamisine %24,3, eritromisine %97,2, trimethoprim+sülfometoksazole %86,4 ve oksitetrasikline karşı ise %87,3 oranında dirençli olduğu tespit edildi. Ayrıca izolatların %91,8'inin çoklu antimikrobiyal dirence sahip olduğu belirlendi (Tablo 4.3 ve Tablo 4.5).

Tablo 4.3. Yemlik-suluklardan izole edilen *E. coli* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık sonuçları.

| Antimikrobiyaller |        |                  |                  |                  |                 |                |                  |                 |
|-------------------|--------|------------------|------------------|------------------|-----------------|----------------|------------------|-----------------|
|                   |        | Beta-laktam      |                  |                  | Aminoglikozit   | Makrolit       | Sülfanomid       | Tetrasiklin     |
|                   |        | AMC <sup>1</sup> | MEM <sup>2</sup> | CTX <sup>3</sup> | CN <sup>4</sup> | E <sup>5</sup> | SXT <sup>6</sup> | TE <sup>7</sup> |
| <b>R</b>          | n<br>% | 104<br>93,7      | 3<br>2,7         | 54<br>48,6       | 27<br>24,3      | 108<br>97,2    | 96<br>86,4       | 97<br>87,3      |
| <b>I</b>          | n<br>% | 0<br>0           | 1<br>0,9         | 0<br>0           | 3<br>2,7        | 3<br>2,8       | 0<br>0           | 4<br>3,7        |
| <b>S</b>          | n<br>% | 7<br>6,3         | 107<br>96,4      | 57<br>51,4       | 81<br>73        | 0<br>0         | 15<br>13,6       | 10<br>9,0       |
| <b>MDR</b>        | n<br>% | 102<br>91,8      |                  |                  |                 |                |                  |                 |

1: Amoksisilin+klavulanik asit, 2: Meropenem, 3: Sefotaksim, 4: Gentamisin, 5: Eritromisin, 6: Trimethoprim+sülfometoksazol, 7: Oksitetrasiklin, R: Dirençli, I: Orta derecede duyarlı, S: Duyarlı, n: İzolat sayısı, MDR: Çoklu Antimikrobiyal Direnci.

Kloakal svaplardan izole edilen *E. coli* izolatlarının amoksisilin+klavulanik asite %78, sefotaksime %63, gentamisine %31,5, eritromisine %92, trimethoprim+sülfometoksazole %74,5 ve oksitetrasikline karşı ise %78,5 oranında dirençli olduğu tespit edildi. İzolatların tamamının meropeneme duyarlı olduğu ortaya konuldu. Ayrıca izolatların %78,5'inin çoklu antimikrobiyal dirence sahip olduğu belirlendi. (Tablo 4.4 ve Tablo 4.5).

Tablo 4.4. Kloakal svaplardan izole edilen *E. coli* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık sonuçları.

| Antimikrobiyaller |        |                  |                  |                  |                 |                |                  |                 |
|-------------------|--------|------------------|------------------|------------------|-----------------|----------------|------------------|-----------------|
|                   |        | Beta-laktam      |                  |                  | Aminoglikozit   | Makrolit       | Sülfanomid       | Tetrasiklin     |
|                   |        | AMC <sup>1</sup> | MEM <sup>2</sup> | CTX <sup>3</sup> | CN <sup>4</sup> | E <sup>5</sup> | SXT <sup>6</sup> | TE <sup>7</sup> |
| R                 | n<br>% | 156<br>78,0      | 0<br>0           | 126<br>63        | 63<br>31,5      | 184<br>92      | 149<br>74,5      | 157<br>78,5     |
| I                 | n<br>% | 0<br>0           | 1<br>0,5         | 0<br>0           | 10<br>5         | 7<br>3,5       | 0<br>0           | 0<br>0          |
| S                 | n<br>% | 44<br>22         | 199<br>99,5      | 74<br>37         | 127<br>63,5     | 9<br>4,5       | 51<br>25,5       | 43<br>21,5      |
| MDR               | n<br>% | 157<br>78,5      |                  |                  |                 |                |                  |                 |

1: Amoksisilin+klavulanik asit, 2: Meropenem, 3: Sefotaksim, 4: Gentamisin, 5: Eritromisin, 6: Trimethoprim+sülfometoksazol, 7: Oksitetrasiklin, R: Dirençli, I: orta derecede duyarlı, S: duyarlı, n: İzolat sayısı, MDR: Çoklu Antimikrobiyal Direnci.

Tablo 4.5. Kloakal, Altılık ve Yemlik-suluk numunelerinden izole edilen *E. coli* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık sonuçları.

| Antimikrobiyaller |        |                  |                  |                  |                 |                |                  |                 |
|-------------------|--------|------------------|------------------|------------------|-----------------|----------------|------------------|-----------------|
|                   |        | Beta-laktam      |                  |                  | Aminoglikozit   | Makrolit       | Sülfanomid       | Tetrasiklin     |
|                   |        | AMC <sup>1</sup> | MEM <sup>2</sup> | CTX <sup>3</sup> | CN <sup>4</sup> | E <sup>5</sup> | SXT <sup>6</sup> | TE <sup>7</sup> |
| R                 | n<br>% | 266<br>83,9      | 3<br>0,9         | 185<br>58,3      | 94<br>29,6      | 298<br>94      | 251<br>79,1      | 259<br>81,7     |
| I                 | n<br>% | 0<br>0           | 2<br>0,6         | 0<br>0           | 13<br>4,1       | 10<br>3,1      | 0<br>0           | 4<br>1,2        |
| S                 | n<br>% | 51<br>16         | 312<br>98,4      | 132<br>41,6      | 210<br>66,2     | 9<br>2,8       | 66<br>20,8       | 54<br>17        |
| MDR               | n<br>% | 265<br>83,5      |                  |                  |                 |                |                  |                 |

1: Amoksisilin+klavulanik asit, 2: Meropenem, 3: Sefotaksim, 4: Gentamisin, 5: Eritromisin, 6: Trimethoprim+sülfometoksazol, 7: Oksitetrasiklin, R: Dirençli, I: orta derecede duyarlı, S: duyarlı, n: İzolat sayısı, MDR: Çoklu Antimikrobiyal Direnci.

*E.coli* izolatlarının çoklu antimikrobiyal direnci, fenotipik ve genotipik ortak özelliklerini gösteren izolat sayıları Tablo 4.5'te belirtilmiştir.

Tablo 4.6. *E. coli* izolatlarının çoklu antimikrobiyal, fenotipik (MİK) ve genotipik ortak özellikleri.

| Çoklu Antimikrobiyal, Fenotipik ve Genotipik Ortak Özellikler |         |              |         |
|---------------------------------------------------------------|---------|--------------|---------|
| Ortak Özellikler                                              | Kloakal | Yemlik/Suluk | Altılık |
| MDR+ Fenotipik (MİK)+Genotipik ( <i>mcr-1</i> )               | 3       | 0            | 1       |
| MDR+Fenotipik (MİK)+Genotipik ( <i>mcr-2</i> )                | 26      | 7            | 3       |
| MDR+ Fenotipik (MİK)+Genotipik ( <i>mcr-3</i> )               | 28      | 0            | 0       |

MDR: Çoklu Antimikrobiyal Direnci, MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu.

Timmermans vd. (2021), yılında yaptıkları bir çalışmada 2012-2016 yılları arasında Belçika'da sağlıklı kümes hayvanlarından izole ettikleri 40 adet kolistin dirençli kommensal *E. coli* koleksiyonundaki izolatların tümünü çoklu antimikrobiyale dirençli suşlar olarak tespit etmişlerdir. Bu izolatlarda antimikrobiyallere karşı direnç sırasıyla: ampisilin (%100); tetrasiklin (%97,5); sülfametoksazol (%97,5); trimetoprim (%87,5); siprofloksasin (%77,5); nalidiksik asit (%72,5); kloramfenikol (%62,5); gentamisin (%47,5); sefotaksim (%32,5); seftazidim (%30); azitromisin (%12,5); ve tigesiklin (%5) oranında belirlenmiştir. Hiç bir izolatta meropeneme karşı direnç gözlenmemiştir. Bu çalışmada, kloakal, altılık ve yemlik-suluk izolatlarından elde edilen *mcr-1*, *mcr-2* ve *mcr-3* genlerini taşıyan 103 *E.coli* izolatının amoksisilin+klavulanik asite (%83,4), meropeneme (%0,9), sefotaksime (%43,6), gentamisine (%38,8) eritromisine (94,1), trimetoprim+sülfometoksazola (%83,4), oksitetrasikline (%81,5) oranında dirençlilik gösterdiği belirlenmiştir. İzolatların büyük çoğunluğunda çoklu antimikrobiyal direncinin görülmesi bu çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Khong vd. (2023), broyler tavuk kümeslerinden toplanan altılıktan izole edilen *E. coli* suşlarının antimikrobiyal direnç profilini araştırmışlardır. Disk difüzyon ile 10 antimikrobiyale karşı direnç gözlenmiştir. *E. coli* izolatları en yüksek direnci sefalotine (%54,4) karşı gösterirken bunu, tetrasiklin (%27,9), streptomisin (%29,4), ampisilin (%20,6), kolistin (%13,2), sülfonamidler (%8,8) ve imipeneme (%1,5) karşı direnç oranları izlemiştir. Ayrıca izolatların %22,1'inde en az 3 grup



antimikrobiyale karşı direnç (MDR) gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda altlıklardan elde edilen izolatlarda çoklu antimikrobiyal direncinin görülmesi (amoksisilin+klavulanik asit, eritromisin ve trimethoprim+sülfometaksazole (%100), sefotaksim ve oksitetrasikline (%83,3), gentamisine (%66,7), *mcr-1* ve *mcr-2* genleri taşıyan *E.coli* izolatlarının kolistine (%66,6) bu çalışma ile benzer özellik taşımaktadır.

#### 4.3. *E.coli* İzolatları için Kolistin Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Bulguları

Farklı işletmelere ait altlık numunelerinden izole edilen toplam 6 izolatın, 2 (%33,3) tanesinin kolistine duyarlı olduğu, diğer 4 (%66,6) izolatın ise minimal inhibitör konsantrasyonunun 128 mg/L'den daha yüksek olduğu tespit edildi.

Yemlik ve suluk materyallerinden izole edilen toplam 111 izolatın, 56 (%50,4) tanesinin kolistine duyarlı olduğu, 55 (%49,5) izolatın ise dirençli olduğu belirlendi.

Kloakal svaplardan izole edilen toplam 200 izolatın, 104 (%52) tanesinin kolistine duyarlı olduğu, 96 (%48) izolatın ise dirençli olduğu tespit edildi.

Tüm izolatlara ait belirlenmiş olan kolistin MİK değerleri Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.7. *E. coli* izolatlarının kolistin MİK değerleri.

| MİK Değerleri (mg/l) |     |    |    |    |    |    |   |   |     |      |
|----------------------|-----|----|----|----|----|----|---|---|-----|------|
|                      | 128 | 64 | 32 | 16 | 8  | 4  | 2 | 1 | 0,5 | 0,25 |
| İzolat Sayısı        |     |    |    |    |    |    |   |   |     |      |
| Altlık               | 4   | -  | -  | -  | -  | -  | - | - | -   | 1    |
| Yemlik-Suluk         | 32  | 2  | 5  | 2  | 6  | 8  | 9 | 4 | 3   | 7    |
| Kloakal              | 19  | 5  | 15 | 27 | 20 | 10 | 9 | 5 | 5   | 8    |

Cwiek vd. (2021), çeşitli kanatlı türlerinden (broyler, hindi, ördek, kaz vb.) topladıkları lezyonlu organlar ve kloakal sürüntülerden izole ettikleri *mcr-1* genini taşıyan *E.coli* suşlarının antimikrobiyal duyarlılık profilini araştırmışlardır. Tüm *mcr-1* pozitif *E. coli* suşlarının meropeneme duyarlı (%100) (MİK değeri 0,03 µg/ml) olduğunu, suşların çoğunun ise azitromisine (%94,12, MİK aralığı 2-8 µg/ml), seftazidime (%82,35, MİK aralığı 0,5-1 µg/ml), sefotaksime (%82,35, MİK

aralığı 0,25-1 µg/ml) ve tigesikline (%76,47, MİK aralığı 0,25-0,5 µg/ml) duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer şekilde gentamisine duyarlı suşların yüzdesini de nispeten daha yüksek (%76,47; MİK aralığı 0,5-1 µg/ml) bulmuşlardır. Diğer taraftan tüm suşların (%100) ampisiline dirençli olduğunu (MİK>64 µg/ml), tetrasiklin (%88,24), kloramfenikol (%82,35), nalidiksik asit (%76,47) ve siprofloksasine (%64,71), dirençli izolatların varlığının da yüksek oranda olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar 318 adet *E. coli* suşunun 17 (% 5,34) tanesini *mcr-1* pozitif olarak tespit etmişler ve bu 17 suşun 9 (%52,94) tanesini fenotipik olarak kolistine dirençli bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda 200 adet kloakal *E. coli* suşunun 12 tanesi *mcr-1* pozitif olarak bulunmuştur. Bu 12 suşun 5 (%41,6) tanesinin fenotipik olarak kolistine dirençli bulunması bu çalışma ile benzerlik göstermektedir. Ayrıca *mcr-1* pozitif 12 *E. coli* izolatının amoksisilin+klavulanik asite (%58,3), sefotaksime (%8,3), gentamisine (%16,6) eritromisine (91,6), trimetoprim+sülfometoksazola (%66,6), oksitetrasikline (%66,6) oranında dirençlilik gösterdiği belirlenmiştir.

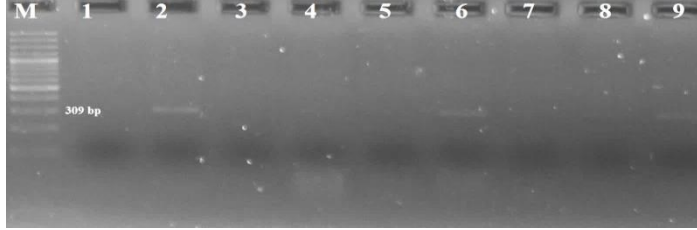
Dawadi vd. (2021), gelişmekte olan Güney Asya ülkelerindeki kümes hayvanlarında *E. coli*'nin yüzde prevalansı hakkında tek tip nicel tahmin sağlamanın yanı sıra kolistin direncini analiz etmeyi amaçlamışlardır. Araştırmacılar *E.coli* prevalansı ve kolistin direncine ilişkin birleştirilmiş verileri analiz etmişler ve Güney Asya bölgesinde (Nepal, Bangladeş, Pakistan ve Hindistan) yapılan 9 çalışmanın meta-analizinde, *E. coli*'nin birleştirilmiş prevalansını %73, kümes hayvanlarından elde edilen *E. coli*'ye karşı kolistin direncinin birleştirilmiş prevalansını ise %28 bulmuşlardır. Bu oranların yüksek olduğunu bildiren araştırmacılar, çiftlik hayvanlarının yetiştirilmesinde antimikrobiyallerin denetlenmesi gerekliliği üzerinde durmuşlardır. Bu çalışmada, altlık, yemlik/suluk ve kloakal sıvaplardan elde edilen izolatların kolistine daha yüksek oranda (%48,9, MİK≥4 mg/l) dirençli bulunması da antimikrobiyal direnç sorununun açıkça ortada olduğunu ve acil olarak kontrol altına alınması gerektiğini göstermektedir.

#### **4.4. Kolistin Direncinden Sorumlu *mcr* Genlerinin Belirlenmesi**

##### **4.4.1. *mcr-1* Gen Varlığının Belirlenmesi**

*mcr-1* genine yönelik yapılan PCR sonuçlarına göre; altlıklardan elde edilen *E. coli* izolatlarından 1 tanesinde (%16,6) gözlenen 309 bp'lik bant, bu izolatın *mcr-1*

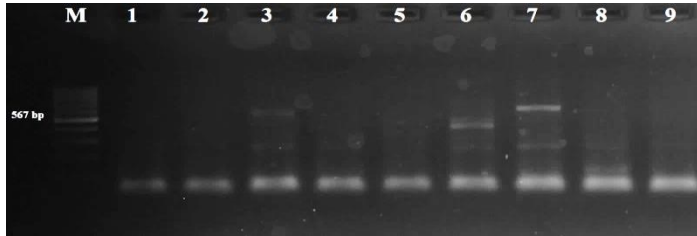
pozitif olduğunu ortaya koydu. Aynı şekilde, yemlik ve suluklardan izolatlarından 2 tanesi (%1,8) de *mcr-1* pozitif olarak değerlendirilirken kloakal izolatlardan 12 tanesi (%6) *mcr-1* yönünden pozitif bulundu. Sonuçlar Şekil 4.1 ve Tablo 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. *mcr-1* genine spesifik PCR görüntülenmesi M: Marker (100-1000 bp); Pozitif izolatlar: 2,6,9; Negatif izolatlar: 1,3,4,5,7,8.

#### 4.4.2. *mcr-2* Gen Varlığının Belirlenmesi

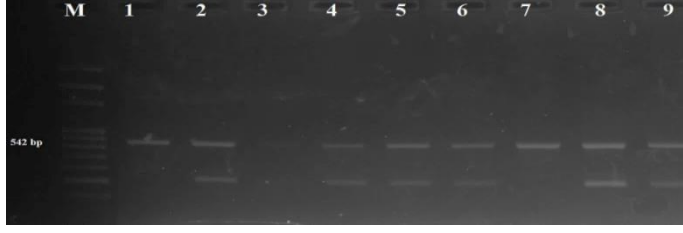
*mcr-2* genine yönelik yapılan PCR sonuçlarına göre; altlıklardan elde edilen *E. coli* izolatlarından 4 tanesi (%66,6) 567 bp’de bant oluşturmak suretiyle *mcr-2* pozitif olarak belirlenirken, yemlik ve suluklardan elde edilen izolatlardan 21 tanesi (%18,9) ve kloakal izolatlardan 52 tanesi (%26) de *mcr-2* pozitif olarak değerlendirildi. Sonuçlar Şekil 4.2 ve Tablo 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. *mcr-2* genine spesifik PCR görüntülenmesi M: Marker (100-1000 bp); Pozitif izolatlar: 3,7; Negatif izolatlar: 1,2,4,5,6,8,9.

#### 4.4.3. *mcr-3* Gen Varlığının Belirlenmesi

*mcr-3* genine yönelik yapılan PCR sonuçlarına göre; altlıklardan, yemlik ve suluklardan izole edilen *E.coli* izolatlarından hiçbirinde *mcr-3* geni tespit edilemedi. Bununla birlikte kloakal *E.coli* izolatlarından 32 tanesinin (%16) 542 bp’lik bant oluşturduğu görüldü ve bu izolatlar *mcr-3* pozitif olarak değerlendirildi. Sonuçlar Tablo Şekil 4.2 ve 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. *mcr-3* genine spesifik PCR görüntülenmesi M: Marker (100-1000 bp); Pozitif izolatlar 1,2,4,5,6,7,8,9; Negatif izolatlar:3.

Tablo 4.8. *E. coli* izolatlarının kolistin direncinden sorumlu *mcr-1*, *mcr-2* ve *mcr-3* gen varlıkları.

| <i>mcr-1</i> , <i>mcr-2</i> ve <i>mcr-3</i> Gen Varlıkları |                   |     |           |                   |     |           |                   |     |           |
|------------------------------------------------------------|-------------------|-----|-----------|-------------------|-----|-----------|-------------------|-----|-----------|
|                                                            | <i>mcr-1</i> geni |     | Pozitif % | <i>mcr-2</i> geni |     | Pozitif % | <i>mcr-3</i> geni |     | Pozitif % |
| Altılık                                                    | Pozitif           | 1   | 16,6      | Pozitif           | 4   | 66,6      | Pozitif           | 0   | 0         |
|                                                            | Negatif           | 5   |           | Negatif           | 2   |           | Negatif           | 6   |           |
| Yemlik-Suluk                                               | Pozitif           | 2   | 1,8       | Pozitif           | 21  | 18,9      | Pozitif           | 0   | 0         |
|                                                            | Negatif           | 109 |           | Negatif           | 90  |           | Negatif           | 111 |           |
| Kloakal                                                    | Pozitif           | 12  | 6         | Pozitif           | 52  | 26        | Pozitif           | 32  | 16        |
|                                                            | Negatif           | 188 |           | Negatif           | 148 |           | Negatif           | 168 |           |
| Toplam                                                     | Pozitif           | 15  | 4,7       | Pozitif           | 77  | 24,3      | Pozitif           | 32  | 10,1      |
|                                                            | Negatif           | 302 |           | Negatif           | 240 |           | Negatif           | 285 |           |

*mcr-1* geninin aracılık ettiği kolistin direnci, hayvan kaynaklı *E. coli* suşları arasında en yaygın olanı ve *mcr-1* taşıyan *E. coli*, orta-doğu Çin'de sıklıkla tespit edilmiştir. Qinghai Eyaletinde yapılan bir çalışmada (Tang et al., 2022), 13 kümes hayvanı çiftliğinden 375 dışkı örneği toplanmış ve sekizi *mcr-1* taşıyan 346 *E.coli* suşu izole edilmiştir. *E.coli* suşlarının ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit ve tetrasikline karşı direnç oranları %90'ın üzerinde, siprofloksasin, sefotaksim, seftiofur ve florfenikole karşı direnç oranları ise %70'in üzerinde bulunmuştur. Çoklu ilaca dirençli suşlar toplam izolatların %95,66'sını oluşturmuştur. On iki *E.coli* suşu kolistin direnci göstermiş, bunlardan toplam 46 antimikrobiyal direnç geni ve 36 virülans faktörü tüm genom dizilimi yoluyla tanımlanmıştır.

Kolistin direnç (*mcr*) geninin birden fazla ilaç direnç geniyle bir arada bulunması, tedaviyi zorlaştıracak ilaca dirençli bakterilerin gelişmesi olasılığına ilişkin endişeleri artırmıştır. Karim vd. (2023), kümes hayvanları ve kümes hayvanı etlerinden elde edilen kolistin dirençli *Enterobacteriaceae* izolatlarının

antimikrobiyal direnç profillerini ve antimikrobiyal direnç genlerinin bir arada bulunma durumunu araştırmışlardır. İzolatların çoğunda yedi sınıfa kadar antimikrobiyal karşı antimikrobiyal direnci olan çoklu ilaç direnç (MDR) profili görülmüştür. Tüm *mcr* barındıran, kolistin dirençli *Enterobacteriaceae* izolatları bu MDR fenotipini göstermiştir. *mcr-1* barındıran *E.coli* izolatları birden fazla antimikrobiyal direnç genini birlikte barındırmaktaydı. Bu tez çalışmasında, *mcr-1* genini barındıran *E.coli* (%4,7) suşlarının aynı zamanda en az 3 grup antimikrobiyal sınıfına (%83,6) birden dirençli olduğu yani çoklu ilaç direnci sergilediği belirlendi. Bu sınıf antimikrobiyallere karşı direnç genlerinin varlığı bu tez çalışmasında araştırılmamış olup yapılacak diğer çalışmalarda değerlendirilmesi gereken bir husus olarak düşünülmüştür.

Perrin-Guyomard vd. (2023), 2020 yılında Fransa'da, kanatlı üretiminde kolistine direnç prevalansının piliçlerde %1 olduğunu ve 2014'ten bu yana kanatlıların kolistine maruz kalmasında %68'lik bir azalma ile önemli ölçüde pozitif bir korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, kolistine dirençli *E. coli* suşlarında sadece *mcr-1* geni tespit etmişler ve izolatların %80'inden fazlasının çoklu ilaca dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, fenotipik antimikrobiyal direnç paternini hindi izolatlarında kolistin, ampisilin, siprofloksasin/nalidiksik asit, sülfametoksazol, tetrasiklin ve trimetoprim karşı (%16,7), broyler izolatlarında ise kolistin, ampisilin, sülfametoksazol ve trimetoprim karşı (%16,7) olarak belirlemişlerdir. Fransa'da kümes hayvanları arasında kolistin direncinin azalmasının, kolistin kullanımının azaltılmasına yönelik ulusal eylem planlarının olumlu bir sonucu olarak değerlendirilebileceğini ifade etmişlerdir. Zhang vd. (2018), Çin'de yaptıkları bir çalışmada, kanatlı işletmelerinden 1.696 adet kloakal sürüntü toplayarak elde ettikleri *E.coli* izolatlarında kolistin direncini araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre; *mcr-1* prevalansını kazlarda (%71,7), tavuklarda (%31,8), ördeklerde (%34,6) ve güvercinlerde (%13,1) olarak tespit etmişlerdir. *mcr-2* prevalansını tavuklarda (%5,5), ördeklerde (%2,3), kazlarda (%5,5) ve güvercinlerde (%0) oranında bulmuşlardır. *mcr-3* prevalansını ise, tavuklarda (%5,2), ördeklerde (%13,8), kazlarda (%11,9) ve güvercinlerde (%5,1) olarak belirlemişlerdir. Bu çalışma ile Çin'de kümes hayvanlarında yüksek oranda *mcr* prevalansının var olduğunu göstermişler ve kolistin direncini önlemek için daha kapsamlı süveyans ve kontrol programlarına ihtiyaç olduğu kanısına varmışlardır.

Amin vd. (2020), kanatlı kümeslerinden aldıkları çevresel örneklerden elde ettikleri 104 izolattan 98'inin (%94) MİK'ini 4 µg/mL bulmuşlar ve izolatlardan 14'ünü (%13,5) *mcr-1* yönünden pozitif olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca 14 adet *mcr-1* pozitif *E. coli* izolatlarının tümünü üçüncü kuşak sefalosporin ve tetrasikline karşı dirençli, 12'sini florokinolon ve sülfametoksazole, 10'unu aminoglikozitlere ve 3'ünü nitrofurantoina karşı dirençli olarak bulmuşlardır.

Anyanwu vd. (2021), tavukların dışkılarından ve kloakal sürüntülerinden topladıkları 785 adet örnekten kolistine dirençli Enterobakterileri izole etmişlerdir. Bu izolatların kolistine karşı direnç durumları ile birlikte diğer bazı antimikrobiyallere duyarlılık testleri, *mcr-1* ile *mcr-10* genlerinin moleküler tespiti, multilokus sekans tiplemesi ile suş tiplemesi (MLST) ve rastgele amplifiye edilmiş polimorfik DNA (RAPD) uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Son olarak, test edilen 32 *E.coli* suşunun hiçbirisi karbapenemlere karşı dirençli bulunmamıştır. Tüm izolatlar; aminopenisilinlere (32 suştan 30'u), gentamisin ve tobramisine (26/32), florokinolonlara (24/32), ve kotrimoksazola (24/32) karşı direnç özellikleri göstermiştir. Analiz edilen 48 kolisine dirençli *Enterobacterales*'in 23'ünde (%47,9) *mcr-1* geni tespit edilmiş; bunlar arasında 32 *E.coli* suşunun 22'si (%68,8) ve 12 *K. pneumoniae* suşunun 1'i (%8,3) yer almıştır. *mcr-1* pozitif *E.coli* 'lerin %90,9'u *mcr-1.1* varyantı olarak tanımlanırken, ikisinde (%8,7) yeni bir *mcr-1* varyantı (*mcr-1.22*) tespit edilmiştir. Değerlendirdikleri 785 numuneden 45'inin (%5,7) kolistine dirençli olduğu bulunmuş ve bunların arasından 23'ünün *mcr-1* genini barındırdığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada *mcr* genlerinin mevcut varyantlarına dair bir araştırma yapılamamış olup daha kapsamlı çalışmalarda mutlaka değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

National Database of Antibiotic Resistance Organisms (NDARO) verilerine göre, *mcr*-pozitif izolatların çoğu çeşitli *Enterobacteriaceae* türlerini, özellikle de *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Enterobacter spp.*'yi kapsamaktadır. Bununla birlikte, *mcr-3*'ün *Aeromonas* türleri arasında yaygın olduğu ve bu türlerin rezervuar olabileceği belirtilmiştir. Aynı zamanda, *mcr-3* ve *mcr-7* arasındaki genetik mesafenin küçük olduğu kanıtlanmış ve *mcr-7*'nin kaynağının da *Aeromonas spp.* olduğuna kanaat getirilmiştir (Ling et al., 2020). Kolistin, çoklu ilaca dirençli Gram negatif basillerin Multi Drug Resistance-Gram Negative bacteria (MDR-GNB) neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan son çare bir

antimikrobiyaldır. Özellikle *mcr* genleri dahil olmak üzere mobil genetik elementlerle bağlantılı olan kolistin direncinin ortaya çıkışı, MDR-GNB enfeksiyonlarının yönetimi için büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Timmermans vd. (2021), kolistin dirençli kommensal *E.coli* koleksiyonundaki *mcr-1* ile *mcr-5* arasındaki genlerin varlığını araştırdıkları çalışmada, tüm izolatların en az bir *mcr* geni taşıdığını tespit etmişlerdir. Belçika'da yapılan bu çalışmada, domuzların, sığırların ve kümes hayvanlarının kommensal bağırsak florasında en az 5 yıl boyunca (2012–2016) gözlenen bir mobil kolistin direnç genleri rezervuarının (*mcr-1* ile *mcr-5*) varlığını ortaya koymuşlardır. Yapılan bu çalışma ile plazmid kaynaklı kolistin direnç genlerinin varlığını ve potansiyel yayılımını izlemek için antimikrobiyal direncin izlenmesine *mcr* genleri ve diğer antimikrobiyal direnç genlerinin eklemesinin önemini ortaya çıkarmışlardır. Birden fazla gen kolistine direnç kazandırır, bunlar arasında en son tanımlananlar mobil *mcr* genleridir. Şimdiye kadar bilinen 10 *mcr* geni varyantı vardır (Hussein et al., 2021). Bu tez çalışmasında, broyler kümeslerindeki tavuklardan ve çevresel materyallerinden izole edilen *E. coli* suşlarında, kolistin direncinde sorumlu *mcr* genlerinden sadece *mcr1*, *mcr 2* ve *mcr 3*'ün varlığı araştırılmış olup diğer varyantların var olup olmadığı ve prevalansları hakkında da araştırma yapılması hem diğer epidemiyolojik çalışmalara hem de kolistin direnç sorununun kontrol altına alınması için geliştirilecek stratejilere ışık tutması yönünden önemlidir.

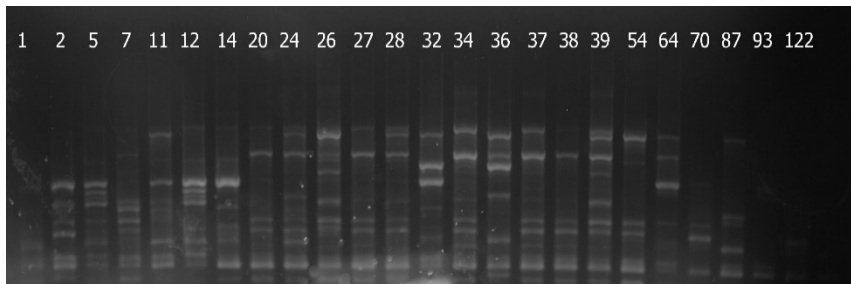
Badr vd. (2022), yaptıkları çalışmada, Mısır'ın üç vilayetindeki tavuk çiftlikleri arasında çoklu ilaca dirençli kanatlı patojeni *E.coli* prevalansını araştırmışlardır. Hastalıklı piliçlerden (%46,7) alınan 120 birleştirilmiş örnekten toplam 56 *E. coli* izole etmişlerdir. *E. coli* izolatları, başta klindamisin, tetrasiklin, streptomisin ve ampisilin olmak üzere 10 antimikrobiyale karşı sırasıyla %100, %100, %96.4 ve %92.9 oranında çoklu ilaca dirençli paternler göstermiştir. Öte yandan kolistin direncini Antimikrobiyal Duyarlılık Testi (AST) ile %41.1 olarak tespit etmişlerdir. Tüm *E. coli* izolatları, kromojenik besiyerinde pozitif kolistin direnci varlığını gösterse de, MİK sonuçları bu durumu %25'lik oranda teyit edebilmiştir. PCR sonuçları, tüm izolatların *mcr-1*'i barındırdığını, ancak hiçbir izolatın diğer *mcr* (2-5) genlerini barındırmadığını ortaya çıkarmıştır. Sonuç olarak, piliç sürülerinde çoklu ilaca dirençli, özellikle kolistine dirençli *E. coli*'nin varlığını ortaya koymuşlar ve kolistin direncine sebep olan ana genin *mcr-1* olduğunu göstermişlerdir. Bu

çalışmada, farklı olarak, incelenen tüm farklı tip materyallerden izole edilen *E. coli* suşlarında *mcr-2* geninin direnç oranı diğer genlere (*mcr-1* ve 3) göre daha yaygındı. Gen prevalanslarının ve mevcudiyetinin kanatlı çiftliklerine, bölgelere ve ülkelere göre değiştiği görülmektedir. Dolayısıyla özellikle ulusal sürveyans sistemleri ile söz konusu risk oluşturan genleri barındıran izolatların ve bunların hem hayvanlar arasında, hem de hayvanlardan insanlara geçiş potansiyellerinin değerlendirilmesi gerekmektedir.

#### 4.5. Genotiplendirme

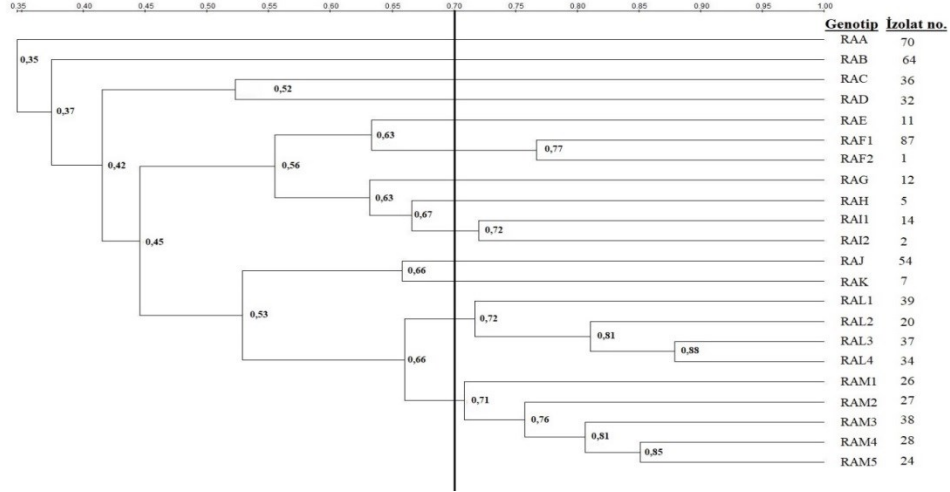
Kloakal, altlık ve yemlik-suluk örneklerden elde edilen fenotipik olarak kolistin dirençli (MİK) ve *mcr-1*, *mcr-2* ve/veya *mcr-3* genlerine sahip izolatların filogenetik yakınlıklarının belirlenmesi için ERIC-2 primerinin kullanıldığı RAPD-PCR gerçekleştirildi.

Kloakal izolatlara yapılan RAPD-PCR analizi sonucunda çizilen dendogramda %70 eşiği baz alındığında RAF, RAI, RAL, RAM olmak üzere ayırt edilebilen 4 adet küme ve RAA, RAB, RAC, RAD, RAE, RAG, RAH, RAJ, RAK olmak üzere 9 adet benzersiz tip bulundu. Kloakal örneklerinden izole edilen suşların RAPD-PCR sonucunda suşlar arasında %35'den %88'e kadar benzerlik tespit edildi. 2'şer izolattan oluşan 2 farklı küme, 4 izolattan ve 5 izolattan oluşan 1'er farklı küme oluşturduğu belirlendi. İki izolattan oluşan 2 farklı kümenin sırasıyla %77, %72 oranında, 4 izolattan oluşan küme %72-%88 oranında, 5 izolattan oluşan küme %71-%85 oranında benzelik gösterdiği çizilen dendogram sonucunda ortaya konuldu. Kloakal izolatların nispeten ağırlıklı olarak bulunduğu RAL ve RAM kümelerinde yer alan izolatların tamamı hem *mcr-2* hem de *mcr-3* genlerini birlikte içermekteydi. Kloakal izolatlara ait RAPD-PCR görüntüsü Şekil 4.4'te dendogramı Şekil 4.5'de gösterilmiştir.



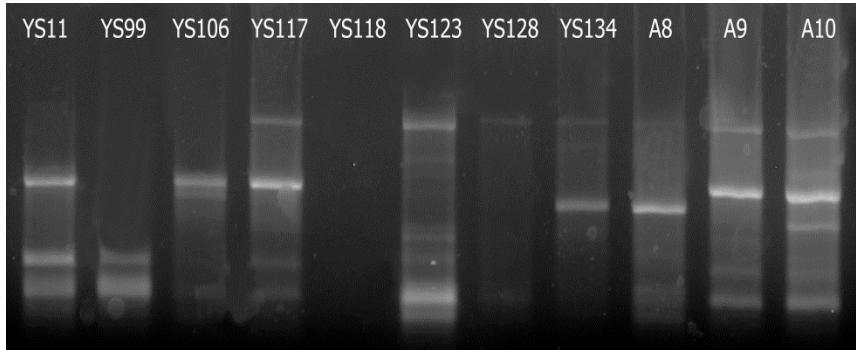
Şekil 4.4. Kloakal numunelerden izole edilen fenotipik olarak kolistin dirençli *mcr-1*, *mcr-2* ve/veya *mcr-3* genlerine sahip izolatların RAPD-PCR jel görüntüsü.



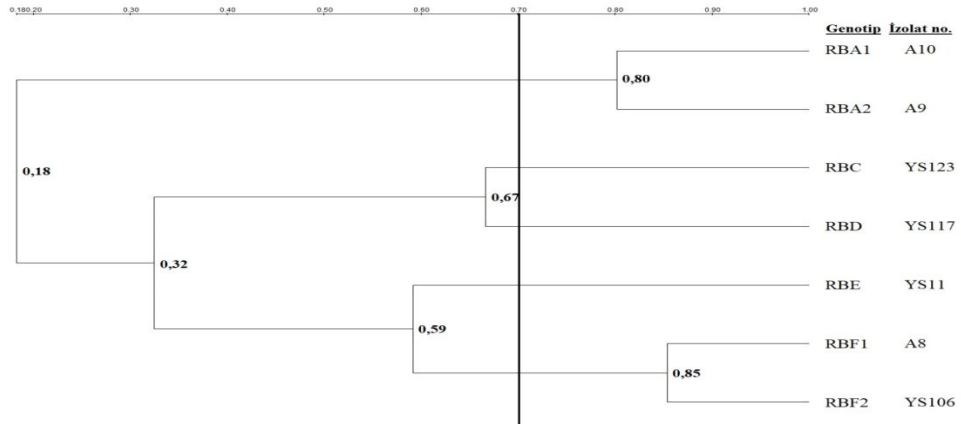


Şekil 4.5. Kloakal numunelerden izole edilen fenotipik olarak kolistin dirençli *mcr-1*, *mcr-2* ve/veya *mcr-3* genlerinden biri veya birkaçına sahip izolatlara ait dendogramı.

Altlık ve yemlik-suluk izolatlara yapılan RAPD-PCR analizi sonucunda çizilen dendogramda %70 eşiği baz alındığında RBA ve RBF olmak üzere ayırt edilebilen 2 adet küme ve RBC, RBD ve RBE olmak üzere 3 adet benzersiz tip bulundu. Altlık ve yemlik-suluk örneklerinden izole edilen suşların RAPD-PCR sonucunda suşlar arasında %18'den %85'e kadar benzerlik tespit edildi. 2'şer izolattan oluşan 2 farklı küme oluşturduğu belirlendi. İki izolattan oluşan 2 farklı kümenin sırasıyla %80, %85 oranında benzelik gösterdiği çizilen dendogramda görülmektedir. Sadece RAB kümesindeki 1 izolattın *mcr1* ve *mcr-2*'yi birlikte taşıdığı belirlendi. Diğer kümedeki (RAF) 2 izolat da sadece *mcr-2* geni taşımaktaydı. Altlık ve yemlik-suluk izolatlara ait RAPD-PCR görüntüsü Şekil 4.6'da dendogramı ise Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



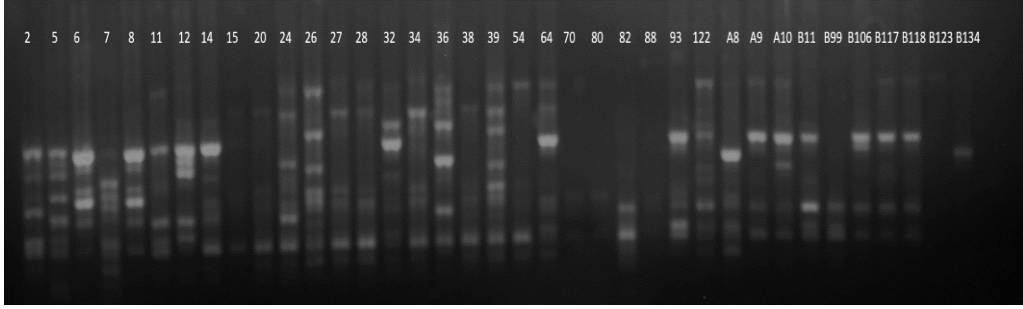
Şekil 4.6. Altlık ve yemlik-suluk numunelerden izole edilen fenotipik olarak kolistin dirençli *mcr-1* ve/veya *mcr-2* genlerine sahip izolatların RAPD-PCR jel görüntüsü.



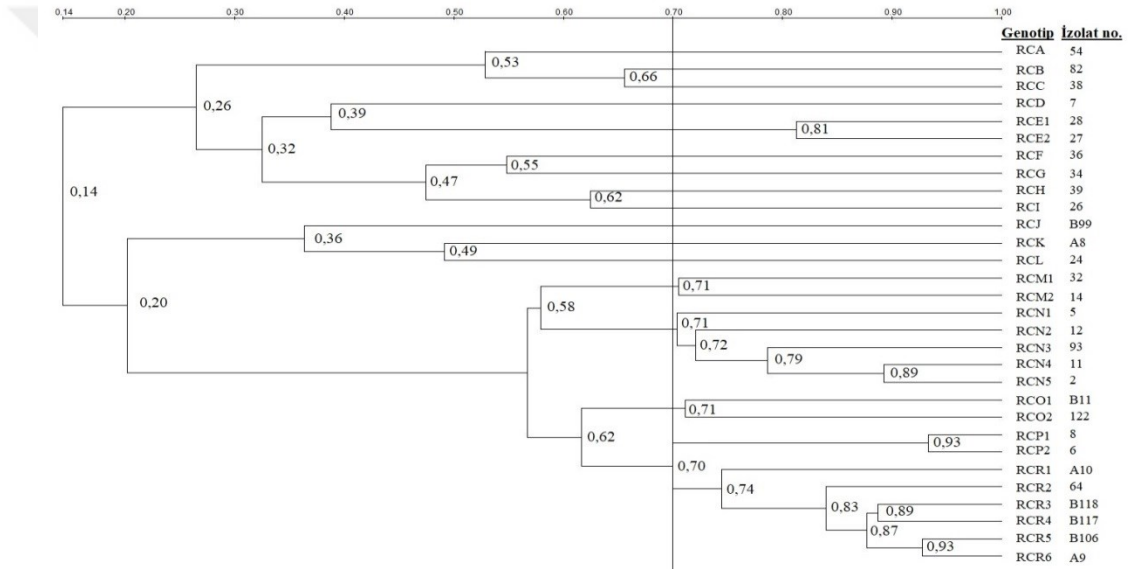
Şekil 4.7. Altlık ve yemlik-suluk numunelerden izole edilen fenotipik olarak kolistin dirençli *mcr-1* ve/veya *mcr-2* genlerine sahip izolatlara ait dendogramı.

Çoklu ilaç direncinin olduğu, fenotipik ve genotipik olarak kolistin direncinin belirlendiği izolatlara yapılan RAPD-PCR işlem sonucunda çizilen dendogramda %70 eşiği baz alındığında RCE, RCM, RCN, RCO, RCP ve RCR olmak üzere ayırt edilebilen 6 adet küme ve RCA, RCB, RCC, RCD, RCF, RCG, RCH, RCI, RCJ, RCK ve RCL olmak üzere 11 adet benzersiz tip bulundu. MDR, fenotipik (MİK) ve genotipik olarak pozitif kloakal, altlık ve yemlik-suluk örneklerinden izole edilen suşların RAPD-PCR sonucunda suşlar arasında %14'den %93'e kadar benzerlik tespit edildi. 2'şer izolattan oluşan 4 farklı küme, 5 izolattan ve 6 izolattan oluşan 1'er farklı küme oluşturduğu belirlendi. İki izolattan oluşan 4 farklı kümenin sırasıyla %81, %71, %71, %93 oranında, 5 izolattan oluşan küme %71-%89 oranında, 6 izolattan oluşan küme %74-%93 oranında benzerlik gösterdiği çizilen dendogram sonucunda ortaya konuldu. Kloakal, altlık ve yemlik-suluk izolatlarında antimikrobiyal dirençlilik genine sahip olma oranlarında RAPD-PCR ile belirlenen hiçbir genotip kümesinin ağırlığı olmadığı tespit edildi. Kümeler içinde nispeten daha fazla izolatin yer aldığı (dominant) kümelerden RCN kümesindeki izolatların tamamının hem *mcr-2* hem de *mcr-3*'ü barındırdığı fark edilirken yine baskın kümelerden biri olan RCR içindeki izolatların *mcr-1* veya *mcr-2* genlerinden sadece birini taşıdıkları görüldü. On bir adet benzersiz tip izolatin hiçbirinin *mcr-1* barındırmadığı, diğer (*mcr-2* ve/veya *mcr-3*) genleri taşıdığı görüldü. Söz konusu kolistin direnç genlerinin genotiplerdeki dağılımı rastgele gibi görünse de, kloakal ve çevresel örneklerden izole edilen *E. coli*'lerde baskın olarak *mcr-2* ve *mcr-3* genlerinin birlikte bulunduğu fark edildi. Kloakal, altlık ve yemlik-suluk izolatlarına

ait RAPD-PCR görüntüsü Şekil 4.8’de dendogram görüntüsü Şekil 4.9’da gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Kloakal, altlık ve yemlik-suluk numunelerden izole edilen MDR ve fenotipik olarak kolistin dirençli *mcr-1*, *mcr-2* ve/veya *mcr-3* genlerine sahip izolatların RAPD-PCR jel görüntüsü.



Şekil 4.9. Kloakal, altlık ve yemlik-suluk numunelerden izole edilen MDR ve fenotipik olarak kolistin dirençli *mcr-1*, *mcr-2* ve/veya *mcr-3* genlerine sahip izolatlara ait dendogramı.

Salehi vd. (2008), yaptıkları çalışmada 33 adet kanatlı *E.coli* izolatında RAPD-PCR yöntemini uygulamışlar ve 31 adetinin (%93,6) ve 28 adetinin (%84,8) sırasıyla 700bp ve 900bp’de DNA parçaları ürettiğini tespit etmişlerdir. Sonuç olarak kullandıkları Oligonükleotid primer 1247, kanatlı *E. coli* izolatları için ayırt edici olmuştur.

## 5. SONUÇ

Günümüzde, kanatlıların en önemli patojenlerinden biri olan *E. coli* (APEC), patojenitesi ve kanatlı ölümlerindeki etkisi nedeniyle önemli bir sorundur. Öte yandan *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal direncin gelişmesi ve bu direncin dünya çapında hızla yayılması sonucu halk sağlığı da önemli oranda etkilenmektedir. APEC ile enfekte olan kanatlılar (piliçler, yumurtacılar, ördekler ve kazlar) genellikle selülitis, omfalitis, perikarditis, perihepatitis, şişmiş kafa sendromu ve diğer kolibasilloz belirtileri gibi kolibasilloz ve koliseptisemi belirtileri göstermektedirler (Badr et al., 2022; Nolan et al., 2013). Kanatlı *E. coli* izolatları arasındaki AMR, son yıllarda global bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Kanatlı üretiminde antimikrobiyal kullanımının, AMR bakterilerinin doğrudan transferi veya antimikrobiyal dirençten sorumlu genlerin insan patojenlerine yatay transferi sonucunda, insanlarda da olası bir AMR nedeni olduğu bildirilmiştir (Badr et al., 2022; Hoelzer et al., 2017). Kolistin, özellikle Mısır gibi aşırı antimikrobiyal kullanımının yaygın olduğu az gelişmiş ülkelerde veteriner hekimlik pratiğinde en sık kullanılan antimikrobiyallerden biridir (Badr et al., 2022; Moawad et al., 2018).

Yakın zamana kadar, kolistin direncinin çoğunlukla kromozomal olarak kodlandığı ve mutasyonla kazanıldığı, yalnızca horizontal bulaşmaya izin verdiği ve dolayısıyla doğası gereği nadir ve kendi kendini sınırlayıcı olduğu düşünülüyordu (Landman et al., 2008). Ancak daha sonra bir fosfoetanolamin transferazı kodlayan plazmid aracılı *mcr-1* geni tanımlanmış (Liu et al., 2016) ve bu direnç mekanizmasının varlığı dünya çapında hızla yayılmıştır (Schwarz and Johnson, 2016). Son yıllarda, giderek artan sayıda *mcr* geninin varlığı (yani, *mcr-2*'den *mcr-10*'a) tespit edilmiş ve bu durum, küresel sağlık endişelerini de artıran *mcr* ailesinin hızlı bir şekilde evrimleştiğini göstermiştir (Li et al., 2020; Wang et al., 2020).

Bu çalışmada, altlık, yemlik/suluklardan ve kloakal svaplardan elde edilen toplam 317 adet *E.coli* izolatının %4.7'sinin *mcr-1* geni, %24.3'ünün *mcr-2* geni, sadece kloakal svaplardan elde edilen *E.coli* izolatının ise %10,1'inin *mcr-3* geni yönünden pozitif olduğu tespit edildi. Sonuçlar, *mcr-1*, *mcr-2* ve *mcr-3* geninin yüksek yaygınlıkta bulunduğunu ve kümes hayvanlarının, *mcr-1-2-3* taşıyan *E. coli* suşları için önemli bir rezervuar olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte bu çalışmada elde edilen önemli bulgulardan biri, *mcr-2* ve *mcr-3* genlerinin de *E.coli*

izolatlarında yüksek oranda, hatta *mcr-1*'den de daha yüksek oranda bulunmasıdır. Özellikle *mcr-2* geni bulunan izolatların çoğunlukla yemlik/suluk, altlık ve kloakal svap olmak üzere tüm materyallerden izole edilmiş olması, bu geni barındıran izolatların kanatlı çiftliklerinde önemli bulaşma kaynağı teşkil edebileceğini göstermektedir. Çalışmada sadece kloakal svaplardan izole edilen suşlarda bulunan *mcr-2* geni için de diğer tüm *mcr* genleri ile birlikte izleme çalışmalarının devam ettirilmesi gerekmektedir. Kaldı ki, kolistin direncinden sorumlu genlerin sadece bu çalışmada araştırılmış 3 *mcr* geni ile sınırlı olmadığı da bir gerçektir. RAPD-PCR analizlerinde genel olarak *E. coli* izolatlarının, özellikle de kloakal izolatların nispeten sayıca daha ağırlıklı olarak yer aldıkları kümelerde, *mcr-2* ve *mcr-3* genlerinin birlikte bulunması dikkat çeken bir nokta olarak değerlendirilebilir. Bununla birlikte benzersiz tip olarak ayırt edilen genotiplerin söz konusu genleri bulundurma ve dağılımları oldukça farklı bulundu. Dolayısıyla farklı orijinli suşlar arasında genlerin bulunma ve dağılımları arasında bir korelasyon saptanmadı. Bununla beraber genel olarak suşlar arasında genotipik çeşitlilik olduğu da fark edildi.

Bu çalışmada suşlar arasında gerek fenotipik gerekse genotipik olarak tespit edilen kolistin direnci ile birlikte özellikle yüksek oranda olduğu belirlenen çoklu antimikrobiyal direnci, hem hayvan hem de insan sağlığı açısından büyük endişe uyandırmaktadır. Özellikle transfer edilebilme potansiyeli olan kolistin direnci ile ilişkili *mcr* genlerinin yüksek oranları, potansiyel halk sağlığı riskini işaret etmektedir. İnsanlarda, hayvanlarda ve çevrede ortaya çıkan kolistin direncinin azaltılmasını destekleyen evrensel bir strateji geliştirmek için ilgili tüm uzmanlar arasında disiplinler arası bir işbirliği ve iletişim gereklidir. Bilim camiası, uzmanlar ve devlet yetkilileri, kolistin kullanımının azaltılması için ısrar etmekte ve kolistin katı koşullar altında son çare olarak yalnızca enfeksiyonların tedavisi için reçete edilmesini önermektedir. Kolistin kullanımı, diğer ilaçların etkinliğinin bilimsel bir değerlendirmesini içermeli ve mümkün olduğunda Enterobakterlerin neden olduğu enfeksiyonlara karşı alternatif stratejiler uygulamalı ve özellikle önleyici stratejilerde antimikrobiyallerden kaçınılmalıdır. *mcr-1* geni birçok ülkede izole edilmiş olmasının yanısıra en endişe verici olanı, insan ve hayvan izolatlarında ve çevresel izolatlarda da belirlenmiş olmasıdır. Ayrıca, *mcr-10*'a kadar bilinen plazmid üzerinde kodlu *mcr* genlerini barındıran bazı *E.coli* izolatları, aynı zamanda antimikrobiyal

direnci oluşturan ESBL veya karbapenemaz enzimi üreticileridir. Tüm bu gerçekler, insanlarda çoklu ilaca dirençli Gram negatif basillerin tedavisine ilişkin kolistin etkinliğinin azalması veya tamamen kaybolması konusunda büyük endişelere neden olmaktadır. Pan-dirençli suşların gelişmesini önlemek için kolistin akılcı kullanımını ön plana çıkarmak amacıyla hızlı ve doğru Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri (AST)'lere acilen ihtiyaç vardır. Aynı zamanda yeni *mcr* genlerinin tanımlanması, plazmid kaynaklı kolistin direncinin izlenmesini iyileştirmek için kullanılabilir ve bu durum da etkili kontrol önlemlerinin geliştirilmesine yardımcı olabilir.

Kolistine dirençli bakterilerin ve kolistin dirençli genlerin ortaya çıkması ve hızlı bir şekilde coğrafi olarak yayılması önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Bu nedenle, kolistin direnciyle mücadele etmek için entegre ve bütünsel çok sektörlü bir yaklaşıma, özellikle de insan sağlığı, veterinerlik ve çevrenin daha iyi entegrasyonuna acil ihtiyaç vardır (Andersson and Hughes, 2014; Larsson, 2014). Birçok ülke ve uluslararası kuruluş, antimikrobiyal direnci ele almaya yönelik eylem planlarına Tek Sağlık perspektifini dahil etmiştir. Gerekli eylemler arasında antimikrobiyal kullanım düzenlemesi ve politikası, sürveyans, idare, enfeksiyon kontrolü, sanitasyon, hayvancılık ve antimikrobiyallere alternatiflerdeki iyileştirmeler yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) yakın zamanda tıbbi açıdan önemli antimikrobiyallerin gıda üreten hayvanlarda kullanımına ilişkin yeni kılavuzlar yayınlarak çiftçilerin ve gıda endüstrisinin sağlıklı hayvanlarda büyümeyi teşvik etmek ve hastalıkları önlemek için rutin olarak antimikrobiyal kullanmayı bırakmasını tavsiye ediyor. Bu kılavuzlar, insan tıbbı için önemli olan antimikrobiyallerin hayvanlarda kullanımını azaltarak etkinliğini korumayı amaçlamaktadır (Hoelzer et al., 2017; Scott et al., 2018). Kolistin tüketimini ve direncin ortaya çıkışını kontrol etmek amacıyla sürveyans için Avrupa ülkelerinde farklı izleme sistemleri kurulmuştur. AMR'nin aciliyetine yönelik son çok uluslu stratejiler arasında antimikrobiyale dirençli bakterilerle mücadele için ABD Ulusal Eylem Planı ve DSÖ Antimikrobiyal Direnç Küresel Eylem Planı yer almaktadır (WHO, 2015). DSÖ'nün GLASS'ı (Küresel Antimikrobiyal Direnç Gözetim Sistemi), ülkelerin ulusal sürveyans sistemlerini güçlendirmelerine yardımcı olmakta ve daha kapsamlı standartlaştırılmış AMR sürveyans verileri sağlamaktadır (Tornimbene et al., 2018). AMR çabalarının ön saflarında yer alan ülkeler ve ağlar, bu acil sorunun

insan ve hayvan sağlığı, evre, küresel ekonomi ile ulusal ve küresel güvenlik üzerindeki etkisini en aza indirmede geniş kapsamlı faydalar sağlayacak etkili bir strateji geliştirmek için ek paydaşları dahil etmelidir.

Sonuç olarak; çalışmada gerek kloakal gerekse çevresel materyallerden izole edilen *E. coli* suşlarındaki fenotipik ve genotipik olarak belirlenen kolistin direnci, kanatlıların ve çevrenin antimikrobiyal direncin kazanılmasında, yayılmasında ve sürdürülmesinde önemli birer rezervuar olduğunu işaret etmektedir. Suşlar arasında fark edilen çoklu direnç direnci de ayrıca bir endişe yaratmaktadır. Tüm bunlar dikkate alındığında, işaret edilen sorunun çözümüne yönelik “Tek Sağlık Konsepti’nde” araştırmaların yoğunlaştırılması, etkili sürveyans sistemleri ile elde edilen anlamlı bilgiler doğrultusunda, ulusal ve uluslararası boyutlarda stratejilerin oluşturulması gerektiği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Aghapour, Z., Gholizadeh, P., Ganbarov, K., Bialvaei, A.Z., Mahmood, S.S., Tanomand, A., Yousefi, M., Asgharzadeh, M., Yousefi, B. and Kafil, H.S. (2019). Molecular mechanisms related to colistin resistance in Enterobacteriaceae. *Infection and Drug Resistance*. (12), 965-975.
- Abavisani, M., Bostanghadiri, N., Ghahramanpour, H., Kodori, M., Akrami, F., Fathizadeh, H., Hashemi, A. and Rastegari-Pouyani, M. (2023). Colistin resistance mechanisms in Gram-negative bacteria: a Focus on Escherichia coli. *Letters in Applied Microbiology*. (76), 1–13.
- AbuOun, M., Stubberfield, E.J., Duggett, N.A., Kirchner, M., Dormer, L., Nunez-Garcia, J., Randall, L.P., Lemma, F., Crook, D.W., Teale, C., Smith, R.P. and Anjum, M.F. (2017). *mcr-1* and *mcr-2* variant genes identified in Moraxella species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. (72), 2745–2749.
- Ahmed, S.S., Alp, E., Hopman, J. and Voss, A. (2016). Global epidemiology on colistin resistant Acinetobacter baumannii. *Journal of Infectious Diseases and Therapy*. 4(4), 287.
- Al Azad, M.A.R., Rahman, M.M., Amin, R. Begum, I.A., Fries, R., Husna, A., Khairalla, A.S., Badruzzaman, A.T.M., El Zowalaty, M.E., Lampang, K.N., Ashour, A.M., and Hafez, H.M. (2019). Susceptibility and multidrug resistance patterns of Escherichia coli isolated from cloacal swabs of live broiler chickens in Bangladesh. *Pathogens*. 8 (3), 118.
- Amina, M.B., Srabonia, A.S., Hossaina, M.I., Roya, S., Mozmadera, A.U., Unicombb, L., Roushamc, E.K. and Islama, M.A. (2020). Occurrence and genetic characteristics of *mcr-1*-positive colistin-resistant E. coli from poultry environments in Bangladesh. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. (22), 546–552.
- Andersson, D.I. and Hughes, D. (2014). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*. (12), 465–78.
- Anyanwu, M.U., Marrollo, R., Paolucci, M., Brovarone, F., Nardini, P., Chah, K.F., Shoyinka, S.V.O. and Carretto, E. (2021). Isolation and characterization of colistin-resistant Enterobacterales from chickens in Southeast Nigeria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. (26), 93-100.
- Aquilini, E., Merino, S., Knirel, Y.A., Regué, M. and Tomás, J.M. (2014). Functional identification of *Proteus mirabilis* eptC gene encoding a core lipopolysaccharide phosphoethanolamine transferase. *International Journal of Molecular Sciences*. 15(4), 6689–6702.
- Badr, H., Samir, A., Ismail El-Tokhi, E., A. Shahein, M., Rady, F.M., Hakim, A.S., Fouad, E.A., El-Sady, E.F. and Ali, S.F. (2022). Phenotypic and Genotypic Screening of Colistin Resistance Associated with Emerging Pathogenic Escherichia coli Isolated from Poultry. *Veterinary Science*. (9), 282.
- Baeuerlein, A., Ackermann, S. and Parlesak, A. (2009). Transepithelial activation of human leukocytes by probiotics and commensal bacteria: role of Enterobacteriaceae-type endotoxin. *Microbiology and Immunology*. (53), 241–250.



- Bakthavatchalam, Y.D., Pragasam, A.K., Biswas, I. and Veeraraghavan, B. (2017). Polymyxin susceptibility testing, interpretative breakpoints and resistance mechanism: an update. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 26:e09.011.
- Barbieri, L.N., Nielsen, D.W., Wannemuehler, Y., Cavender, T., Hussein, A., Yan, S., Nolan, L.K. and Logue, C.M. (2017). “*mcr-1* identified in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC),” *PLoS One*. 12(3), e0172997.
- Bardet, L. and Rolain, J.M. (2018). Development of New Tools to Detect Colistin-Resistance among Enterobacteriaceae Strains. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. (5),3095249. doi: 10.1155/2018/3095249.
- Baron, S., Hadjadj, L., Rolain, J.M. and Olaitan, A.O. (2016). Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 48(6), 583–591.
- Barrow, K. and Kwon, D.H. (2009). Alterations in two-component regulatory systems of *phoPQ* and *pmrAB* are associated with polymyxin B resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents in Chemotherapy*. (53), 5150–4.
- Bengoechea, J.A. and Skurnik, M. (2000). Temperature-regulated efflux pump/ potassium antiporter system mediates resistance to cationic antimicrobial peptides in *Yersinia*. *Molecular Microbiology*. 37(1), 67–80.
- Biswas, S., Brunel, J.M., Dubus, J.C., Reynaud-Gaubert, M. and Rolain, J.M. (2012). Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Review Anti Infective Therapy*. (10), 917–934.
- Blair, J.M., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O. and Piddock, L.J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 13(1),42.
- Boll, M., Radziejewska-Lebrecht, J., Warth, C., Krajewska-Pietrasik, D. and Mayer, H. (1994). 4-Amino-4-deoxy-L-arabinose in LPS of enterobacterial R-mutants and its possible role for their polymyxin reactivity. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. (8), 329–342.
- Bolla, J.M., Alibert-Franco, S., Handzlik, J., Chevalier, J., Mahamoud, A. and Boyer, G. (2011). Strategies for bypassing the membrane barrier in multidrug resistant Gram-negative bacteria. *FEBS Letters*. (585), 1682–1690.
- Bontron, S., Poiriel, L. and Nordmann, P. (2016). “Real-time PCR for detection of plasmid-mediated polymyxin resistance (*mcr-1*) from cultured bacteria and stools,” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 71 (8), 2318–2320.
- Borowiak, M., Fischer, J., Hammerl, J.A., Hendricksen, R.S., Szabo, I. and Malorny, B. (2017). Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. (72), 3317–24.
- Borowiak, M., Baumann, B., Fischer, J., Thomas, K., Deneke, C., Hammer, J.A., Szabo, I. and 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. *Frontiers in Microbiology*. 11(80), doi: 10.3389/fmicb.2020.00080.
- Boyen, F., Vangroenweghe, F., Butaye, P., De Graef, E., Castryck, F., Heylen, P., Vanrobaeys, M. and Haesebrouck, F. (2010). Disk prediffusion is a reliable method

- for testing colistin susceptibility in porcine *E. coli* strains. *Veterinary Microbiology*. 144 (3–4), 359–362.
- Brownlee, G. and Jones, T. (1948). The polymyxins; A related series of antibiotics derived from *B. polymyxa*. *Biochemical Journal*. (43), Xxv
- Butaye, P. And Wang, C. (2018). Colistin resistance, beyond the current knowledge. *EBioMedicine* (34), 16–17.
- Campos, M.A., Vargas, M.A., Regueiro, V., Llompart, C.M., Albertí, S. and Bengoechea, J.A. (2004). Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infectious Immunology*. 72 (12), 7107–7114.
- Cannatelli, A., D'Andrea, M.M., Giani, T., Pilato, V.D., Arena, F., Ambretti, S., Gaibani, P. and Rossolini, G.M. (2013). In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemase mediated by insertional inactivation of the PhoQ/ PhoP mgrB regulator. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*. 57(11), 5521–5526.
- Cannatelli, A., Giani, T.D., Andrea, M.M., Di Plato, V., Arena, F., Conte, V. and Tryfinopoulou, K. (2014). MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*. 58(10), 5696–5703.
- Capone, A., Giannella, M., Fortini, D., Giordano, A., Meledandri, M., Ballardini, M., Venditti, M., Bordi, E., Capozzi, D., Balice, M.P., Tarasi, A., Parisi, G., Lappa, A., Carattoli, A. and Petrosillo, N. (2013). High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. *Clin Microbiol Infect*. (19), 23–30.
- Carattoli, A., Villa, L., Feudi, C., Curcio, L., Orsini, S., Luppi, A., Pezzotti, G. and Magistrali, C.F. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro Surveillance* 22 (31), 30589.
- Carroll, L.M., Gaballa, A., Guldimann, C., Sullivan, G., Henderson, L.O. and Wiedmann, M. (2019). Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene *mcr-9* in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolate. *Clinical Science Epidemiology*. 10(3), 1-6.
- Cassir, N., Rolain, J.M. and Brouqui, P. (2013). A new strategy to fight antimicrobial resistance: the revival of old antibiotics. *Frontiers in Microbiology*. (5), 551.
- Chen, L., Zhang, J., Wang, J., Butaye, P., Kelly, P., Li, M., Yang, F., Gong, J., Yassin, A.K., Guo, W., Li, J., Song, C. and Wang, C. (2018). Newly identified colistin resistance genes, *mcr-4* and *mcr-5*, from upper and lower alimentary tract of pigs and poultry in China. *PLoS One* 13 (3), 1-10.
- Cheng, H.Y., Chen, Y.F., Peng, H.L. (2010). Molecular characterization of the PhoPQ-PmrD-PmrAB mediated pathway regulating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Journal of Biomedical Science*. (17), 60.
- Cheng, Y-H., Lin, T-L., Pan, Y-J., Wang, Y-P., Lin, Y-T. and Wang, J-T. (2015). Colistin-resistant mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*. 59(5), 2909–2913.
- Cheng, Y.H., Lin, T.L., Lin, Y.T. and Wang, J.T. (2016). Amino acid substitutions of CrrB responsible for resistance to colistin through CrrC in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*. 60(6), 3709–3716.

- Choi, M-J. and Ko, K.S. (2013). Mutant prevention concentrations of colistin for *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 69(1), 275–277.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2020). M100-S23—Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; twenty-third informational supplement. CLSI, Wayne, Pennsylvania.
- Coppi, M., Cannatelli, A., Antonelli, A., Baccani, I., Di Plato, V., Sennati, S., Giani, T. and Rossolini, G.M. (2018). A simple phenotypic method for screening of *MCR-1*-mediated colistin resistance. *Clinical Microbiology Infections*. 24 (2), 201.
- Ćwiek, K., WoźniakBiel, A., Karwańska, M., Siedlecka, M., Lammens, C., Rebelo, A.R., Hendriksen, R.S., Kuczkowski, M., Władyka, M.C. and Wieliczko, A. (2021). Phenotypic and genotypic characterization of *mcr-1*-positive multidrug-resistant *Escherichia coli* ST93, ST117, ST156, ST10, and ST744 isolated from poultry in Poland. *Brazilian Journal of Microbiology*. (52), 1597–1609.
- Dalmolin, T.V., Morales, D.L. and Barth, A.L. (2018). Plasmid-mediated Colistin Resistance: What Do We Know? *Infectiology*. 1(2). 16-22.
- Dawadi, P., Bista, S. and Bista, S. (2021). Prevalence of Colistin-Resistant *Escherichia coli* from Poultry in South Asian Developing Countries. *Veterinary Medicine International*. (11), 6398838. doi: 10.1155/2021/6398838. PMID: 34671452; PMCID: PMC8523263.
- Deris, Z.Z., Akter, J., Sivanesan, S, Roberts, K.D., Thompson, P.E., Nation, R.L., Li, J. and Velkov, T. (2014). A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*. 67 (2), 147–151.
- Doern, G.V. and Morse, S.A. (1980). *Branhamella* (Neisseria) catarrhalis: criteria for laboratory identification. *Journal of Clinical Microbiology*. 11(2), 193–195.
- EMA/AMEG (European Medicines Agency - Antimicrobial Advice Ad Hoc Expert Group). Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health (EMA/CVMP/CHMP/231573/2016).  
[https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/updated-advice-use-colistin-products-animals-within-european-union-development-resistance-possible\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/updated-advice-use-colistin-products-animals-within-european-union-development-resistance-possible_en.pdf)
- Ezadi, F., Ardebili, A. and Mirnejad, R. (2019). Antimicrobial Susceptibility Testing for Polymyxins: Challenges, Issues, and Recommendations. *Journal of Clinical Microbiology*. 57 (4), e01390-18.
- Falagas, M.E. and Kasiakou, S.K. (2005). Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases*. (40), 1333–41.
- Falagas, M.E., Rafailidis, P.I. and Matthaiou, D.K. (2010). Resistance to polymyxins: mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resistance Updates*. 13(4–5), 132–138.

- Feng, Y. (2018). Transferability of MCR-1/2 polymyxin resistance: complex dissemination and genetic mechanism. *ACS Infectious Diseases*. 4 (3), 291–300.
- Fosse, .T, Giraud-Morin, C. and Madinier, I. (2003). Induced colistin resistance as an identifying marker for *Aeromonas* phenospecies groups. *Letters in Applied Microbiology*. (2003) (36), 25–9.
- Gales, A.C., Jones, R.N. and Sader, H.S. (2006). Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001–2004). *Clinical Microbiology Infection*. 12(4), 315–321.
- Gallardo-Godoy, A., Muldoon, C., Becker, B., Elliott, A.G., Lash, L.H., Huang, J.X., Butler, M.S., Pelingon, R., Kavanagh, A.M., Ramu, S., Phetsang, W., Blaskovich, M.A.T. and Cooper, M.A. (2016). Activity and predicted nephrotoxicity of synthetic antibiotics based on polymyxin B. *Journal of Medical Chemistry*. (59), 1068–1077.
- García, V., García-Meniño, I., Mora, A., Flament-Simon, S.C., Diaz-Jimenez, D., Blanco, J.E., Alonso, M.P. and Blanco, J. (2018). Co-occurrence of *mcr-1*, *mcr-4* and *mcr-5* genes in multidrug-resistant ST10 Enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Spain (2006-2017). *International Journal Antimicrobial Agents*. (7), e2018.03.022.
- Gatzeva-Topalova, P.Z., May, A.P. and Sousa, M.C. (2005). Structure and mechanism of ArnA: conformational change implies ordered dehydrogenase mechanism in key enzyme for polymyxin resistance. *Structure*. 13(6), 929–942.
- Girlich, D., Naas, T. and Dortet, L. (2018). Comparison of the Superpolymyxin™ and CHROMID® Colistin R screening media for the detection of colistin-resistant Enterobacteriaceae from spiked rectal swabs. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*. doi:10.1128/AAC.01618-18.
- Gogry, F.A., Siddiqui, M.T., Sultan, I. and Haq, Q.M.R. (2021). Current Update on Intrinsic and Acquired Colistin Resistance Mechanisms in Bacteria. *Frontiers in Medicine*. (8), 677720.
- Groisman, E.A., Kayser, J. and Soncini, F.C. (1997). Regulation of polymyxin resistance and adaptation to low-Mg<sup>2</sup> environments. *Journal of Bacteriology*. (179), 7040–7045.
- Groisman, E.A. (2001). Minireview: The Pleiotropic Two-Component Regulatory System PhoP-PhoQ. *Journal of Bacteriology*. (183), 1835–1842.
- Guabiraba, R. and Schouler, C. (2015). Avian colibacillosis: Still many black holes. *FEMS Microbiol. Lett.* (362), fnv118.
- Gunn, J.S. and Miller, SI. (1996). PhoP-PhoQ activates transcription of *pmrAB*, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *Journal of Bacteriology*. 178(23), 6857–6864.
- Gunn, J.S. (2008). The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends in Microbiology*. 16(6). 284–290.
- Hadrys, H., Balick, M. and Schierwater, B. (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) molecular ecology. *Molecular Ecology*. (1), 55-63.
- Hancock, R.E. (1997). Peptide antibiotics. *Lancet*. (349), 418–422.

- Hancock, R.E. and Scott, M.G. (2000). The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the National Academic Sciences USA*. (97), 8856–8861.
- Helander, I.M., Kilpeläinen, I. and Vaara, M. (1994). Increased substitution of phosphate groups in lipopolysaccharides and lipid A of the polymyxin-resistant pmrA mutants of *Salmonella typhimurium*: a <sup>31</sup>P-NMR study. *Molecular Microbiology*. 11(3), 481–487.
- Helander, I.M., Yato, Y., Kilpelainen, I., Kostiainen, R., Lindner, B., Nummila, K., Sugiyama, T. and Yokochi, T. (1996). Characterization of lipopolysaccharides of polymyxin-resistant and polymyxin-sensitive *Klebsiella pneumoniae* 03. *European Journal of Biochemistry*. (237), 272–278.
- Hoelzer, K., Wong, N., Thomas, J., Talkington, K., Jungman, E. and Coukell, A. (2017). Antimicrobial drug use in food-producing animals and associated human health risks: What, and how strong, is the evidence? *BMC Veterinary Rescue*. (13), 211.
- Hussein, N.H., Al-Kadmy, I.M.S., Taha, B.M. and Hussein, J.D. (2021). Mobilized colistin resistance (*mcr*) genes from 1 to 10: a comprehensive review. *Molecular Biology Reports*.(48), 2897–907.
- Irrgang, A., Roschanski, N., Tenhagen, B.A., Ziemer, T.S., Grobbel, M., Thomas, K., Rösler, U. and Kasbohrer, A. (2016). “Prevalence of *mcr-1* in *E. coli* from livestock and food in Germany, 2010–2015,” *PLoS One*. 11(7), Article ID e0159863.
- Ito-Kagawa, M. and Koyama, Y. (1980). Selective cleavage of a peptide antibiotic, colistin by colistinase. *The Journal of Antibiotics*. 33(12), 1551–1555.
- Jayol, A., Nordmann, P., Brink, A. and Poirel, L. (2015). Heteroresistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* associated with alterations in the PhoPQ regulatory system. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*. 59(5), 2780–2784.
- Jiang, S.S., Liu, M.C., Teng, L.J., Wang, W.B., Hsueh, P.R. and Liaw, S.J. (2010). *Proteus mirabilis* pmrI, an RppA-regulated gene necessary for polymyxin B resistance, biofilm formation, and urothelial cell invasion. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*. 54(4), 1564-1571.
- Karim, M.R., Zakaria, Z., Hassan, L., Mohd Faiz, N., Ahmad, N.I. (2023). Antimicrobial Resistance Profiles and Co-Existence of Multiple Antimicrobial Resistance Genes in *mcr*-Harboring Colistin-Resistant Enterobacteriaceae Isolates Recovered from Poultry and Poultry Meats in Malaysia. *Antibiotics*. (12), 1060. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12061060>
- Khong, M., Snyder, A., Magnaterra, A., Young, M., Barbieri, N., Weimer, S. (2023). 413 Antimicrobial Resistance Profile of *Escherichia Coli* Isolated from Poultry Litter. *Poultry 414 Science*. (102), 102305.
- Kizil, S. (2020). Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESβL), AmpC and carbapenemase activities and colistin resistance of *Salmonella* spp. isolated from food poisoning cases in Turkey. *Turkish Journal Of Veterinary And Animal Sciences*. (44), 821-9.
- Kim, Y., Bae, I.K., Lee, H., Jeong, S.H., Yong, D. and Lee, K. (2014). In vivo emergence of colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates of sequence type 357 during colistin treatment. *Diagnostic Microbiology of Infectious Diseases*. 79(3), 362-366.

- Koyama, Y., Kurosasa, A., Tsuchiya, A. and Takakuta, K. (1950). A new antibiotic 'colistin' produced by spore-forming soil bacteria. *Journal of Antibiotics*. (3), 457–458.
- Landman, D., Georgescu, C., Martin, D.A. and Quale, J. (2008). Polymyxins revisited. *Clinical Microbiology Reviews* (21), 449–465.
- Larsson, D.G.J. (2014). Pollution from drug manufacturing: review and perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences*. (369), 20130571.
- Larsson, D.G.J. and Flach, C.F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*. (20), 257–269.
- Laxminarayan, R., Matsoso, P., Pant, S., Brower, C., Rottingen, J.A., Klugman, K. and Davies, S. (2016). Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. *Lancet (London, England)* 387(10014), 168–175.
- Li, J., Nation, R.L., Milne, R.W., Turnidge, J.D. and Coulthard, K. (2005). Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 25(1), 11–25.
- Li, J., Nation, R.L., Turnidge, J.D., Milne, R.W., Coulthard, K., Rayner, C.R. and Paterson, D.L. (2006). Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug – resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infectious Disease*. (6), 589–601.
- Li, J., Shi, X., Yin, W., Wang, Y., Shen, Z., Ding, S. and Wang, S. (2017). “A multiplex SYBR Green real-time PCR assay for the detection of three colistin resistance genes from cultured bacteria, feces, and environment samples,” *Frontiers in Microbiology*. (8), 1–5.
- Li, Z., Cao, Y., Yi, L., Liu, J.H., Yang, Q. (2019). Emergent Polymyxin Resistance: End of an Era? *Open Forum Infectious Diseases*.
- Li, Y., Dai, X., Zeng, J., Gao, Y., Zhang, Z. and Zhang, L. (2020). Characterization of the global distribution and diversified plasmid reservoirs of the colistin resistance gene *mcr-9*. *Science Report*. (10), 8113.
- Lim, L.M., Ly, N., Anderson, D., Yang, J.C., Macander, L., Jarkowski, A., et al. (2010). Resurgence of colistin: a review of resistance, toxicity, pharmacodynamics, and dosing. *Pharmacotherapy*. (30), 1279–91.
- Ling, Z., Yin, W., Shen, Z., Wang, Y., Shen, J. and Walsh, T.R. (2020). Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. (75), 3087-3095.
- Lippa, A.M. and Goulian, M. (2009). Feedback inhibition in the PhoQ/PhoP signaling system by a membrane peptide. *PLoS Genetics*. (5), e1000788.
- Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.H. and Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infectious Disease*. 16(2), 161–168.
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T. and Monnet, D.L.

- (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. 18(3), 268–81.
- Maneigeiro, V., Clemente, L., Graca, R., Correia, L., Albuquerque, T., Ferreira, E. and Caniça, E. (2017). New insights into resistance to colistin and third-generation cephalosporins of *Escherichia coli* in poultry, Portugal: novel blaCTX-M-166 and blaESAC genes. *International Journal of Food Microbiology*. (263), 67–73.
- Maron, D.F., Smith, T.J. and Nachman, K.E. (2013). Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. *Global Health* (9), 48.
- Marston, H.D., Dixon, D.M., Knisely, J.M., Palmore, T.N., Fauci, A.S. (2016). Antimicrobial resistance. *JAMA*. (316), 1193–204.
- McCoy, A.J., Liu, H., Falla, T.J. and Gunn, J.S. (2001). Identification of *Proteus mirabilis* Mutants with increased sensitivity to antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 45(7), 2030–2037.
- McLeod, M.I. and Spector, M.P. (1996). Starvation- and stationary-phase-induced resistance to the antimicrobial peptide polymyxin B in *Salmonella typhimurium* in RpoS (S) independent and occurs through both *phoP*-dependent and -independent pathways. *Journal of Bacteriology*. (178), 3683–3688.
- McPhee, J.B., Lewenza, S. and Hancock, R.E. (2003). Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*. 50(1), 205–17.
- Mead, A., Billon-Lotz, C., Olsen, R., Swift, B., Richez, P., Stabler, R. and Pelligand, L. (2022). Epidemiological Prevalence of Phenotypical Resistances and Mobilised Colistin Resistance in Avian Commensal and Pathogenic *E. coli* from Denmark, France, The Netherlands, and the UK. *Antibiotics*. (11), 631.
- Mendes, C.A. and Burdmann, E.A. (1992). Polymyxins - review with emphasis on nephrotoxicity. *Revista de Associacao Medica Brasileira*. (55), 752–9.
- Moawad, A.A., Hotzel, H., Neubauer, H., Ehricht, R., Monecke, S., Tomaso, H., Hafez, H.M., Roesler, U. and El-Adawy, H. (2018). Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae from healthy broilers in Egypt: Emergence of colistin-resistant and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Gut Pathogens*. (10), 39.
- Moskowitz, S.M., Ernst, R.K. and Miller, S.I. (2004). PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *Journal of Bacteriology*. 186(2), 575–579.
- Munoz-Price, L.S., Poirel, L., Bonomo, R.A., Schwaber, M.J., Daikos, G.L., Cormican, M., Cornaglia, G., Garau, J., Gniadkowski, M., Hayden, M.K., Kumarasamy, K., Livermore, D.M., Maya, J.J., Nordmann, P., Patel, J.B., Paterson, D.L., Pitout, J., Villegas, M.V., Wang, H., Woodford, N. and Quinn, J.P. (2013). Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *The Lancet Infectious Diseases*. 13(9), 785–796.
- Nation, R.L. and Li, J. (2009). Colistin in the 21st century. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 22(6), 535.

- Nation, R.L., Velkov, T. and Li, J. (2014). Colistin and polymyxin B: peas in a pod, or chalk and cheese? *Clinical Infectious Diseases*. (59), 88–94.
- Nijhuis, R.H.T., Veldman, K.T., Schelfaut, J., Zandbergen, A.V.G., Wessels, E., Claas, E.C.J., Gooskens, J. (2016). “Detection of the plasmid-mediated colistin-resistance gene *mcr-1* in clinical isolates and stool specimens obtained from hospitalized patients using a newly developed real-time PCR assay,” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 71(8), 2344–2346.
- Nolan, L.K., Barnes, H.J., Vaillancourt, J.P., Abdul-Aziz, T. and Logue, C.M. (2013). *Colibacillosis*. 13th ed.; Wiley-Blackwell: Hoboken, NJ, USA.
- Nolan, L.K., Vaillancourt, J.P., Barbieri, N.L. and Logue, C.M. (2020). *Colibacillosis. Diseases Poultry*.
- Nordmann, P., Jayol, A. and Poirel, L. (2016). Rapid Detection of polymyxin resistance in Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*. 22 (6), 1038–43.
- Novovic, K. and Jovcic, B. (2023). Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii*: Molecular Mechanisms and Epidemiology. *Antibiotics*. (12), 516.
- Nummila, K., Kilpelainen, I., Zahringer, U., Vaara, M. and Helander, I.M. (1995). Lipopolysaccharides of polymyxin B-resistant mutants of *Escherichia coli* are extensively substituted by 2-aminoethyl pyrophosphate and contain aminoarabinose in lipid A. *Molecular Microbiology*. (16), 217–278.
- Olaitan, A.O., Morand, S. and Rolain, J.M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in Microbiology*. (5), 1–18.
- Olaitan AO, Dia NM, Gautret P, Benkouiten, S., Belhouchat, K., Drali, T., Parola, P., Brouqui, P., Memish, Z., Raoult, D., Rolain, J.M. (2015). Acquisition of extended-spectrum cephalosporin-and colistin-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype newport by pilgrims during Hajj. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 45(6), 600–604.
- Oostdijk, E.A.N., Smits, L., deSmet, A.M.G.A., Leverstein-vanHall, M.A., Kesecioglu, J., Bonten, M.J.M. (2013). Colistin resistance in gram-negative bacteria during prophylactic topical colistin use in intensive care units. *Intensive Care Medicine*. (39), 653–660.
- Osek, J. (2000). Virulence factors and genetic relatedness of *Escherichia coli* m strains isolated from pigs with post-weaning diarrhea. *Veterinary Microbiology*. (71), 211–222.
- Park, S.Y. and Groisman, E.A. (2014). Signal-specific temporal response by the *Salmonella* PhoP/PhoQ regulatory system. *Molecular Microbiology*. 91(1), 135–144.
- Park, Y.K., Lee, J-Y. and Ko, K.S. (2015). Transcriptomic analysis of colistin-susceptible and colistin-resistant isolates identifies genes associated with colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Microbiology Infections*. 21(8), 761–765.
- Perrin-Guyomard, A., Houée, P, Lucas, P., Felten, A., Le Devendec, L., Chauvin, C. and Kempf, I. (2023). Prevalence and molecular epidemiology of *mcr*-mediated colistin-resistance *Escherichia coli* from healthy poultry in France after national plan to reduce exposure to colistin in farm. *Frontiers Microbiology*. (14), 1254122. doi: 10.3389/fmicb.2023.1254122.



- Peterson, A.A., Fesik, S.W. and McGroarty, E.J. (1987). Decreased binding of antibiotics to lipopolysaccharides from polymyxin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*. (31), 230–237.
- Poirel L, Jayol A, Bontron S, Villegas, M.V., Ozdamar, M., Türkoğlu, S. and Nordmann, P. (2014). The *mcrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 70(1), 75–80.
- Poirel, L. and Nordmann, P. (2016). Emerging plasmid-encoded colistin resistance: the animal world as the culprit? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 71(8), 2326–2327.
- Poirel, L., Jayol, A. and Nordmann, P. (2017). Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clinical Microbiology of Review*. 30(2), 557–596.
- Powers, J.P. and Hancock, R.E. (2003). The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*. (24), 1681–1691.
- Rebelo, A.R., Bortolaia, V., Kjeldgaard, J.S., Pedersen, S.K., Leekitcharoenphon, P., Hansen, I.M., Guerra, B., Malorny, B., Borowiak, M., Hammerl, J.A., Battisti, A., Franco, A., Alba, P., Perrin-Guyomard, A., Granier, S.A., De Frutos Escobar, C., Malhotra-Kumar, S., Villa, L., Carattoli, A. and Hendriksen, R.S. (2018). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Euro Surveillance*. 23(6).
- Roschanski, N., Falgenhauer, L., Grobbel, M., Guenther, S., Kreienbrock, L., İmirzalıoğlu, C. and Roesler, U. (2017). “Retrospective survey of *mcr-1* and *mcr-2* in German pig-fattening farms, 2011-2012,” *International Journal of Antimicrobial Agents*. 50(2), 266–271.
- Salehi, T.Z., Madani, S.A., Karimi, V. and Khazaeli, F.A. (2008). Molecular Genetic Differentiation Of Avian *Escherichia coli* By RAPD-PCR. *Brazilian Journal of Microbiology*. (39), 494-497.
- Schwarz, S. and Johnson, A.P. (2016). Transferable resistance to colistin: a new but old threat. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. (71), 2066-70.
- Scott, A.M., Beller, E., Glasziou, P., Clark, J., Ranakusuma, R.W., Byambasuren, O., Bakhit, M., Page, S.W., Trott, D., Del Mar, C. (2018). Is antimicrobial administration to food animals a direct threat to human health? A rapid systematic review. *International Journal of Antimicrobial Agents*. (52), 316–23.
- Sekyere, J.A. and Asante, J. (2018). Emerging mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria and fungi: advances in the era of genomics. *Future Microbiology*. (13), 241-62.
- Shen, Z., Wang, Y., Shen, Y., Shen, J. and Wu, C. (2016). Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals. *Lancet Infectious Diseases*. 16(3), 293.
- Sherry, N. and Howden, B. (2018). Emerging Gram negative resistance to last-line antimicrobial agents fosfomycin, colistin and ceftazidime-avibactam - epidemiology, laboratory detection and treatment implications. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. (16), 289-306.

- Sidorezyk, Z., Zähringer, U. and Rietschel, E.T. (1983). Chemical structure of the lipid A component of the lipopolysaccharide from a *Proteus mirabilis* Re-mutant. *European Journal of Biochemistry*. 137(1-2), 15–22.
- Simmen, S., Zurfluh, K., Nüesch-Inderbilen, M. and chmitt, S. (2016). “Investigation for the colistin resistance genes *mcr-1* and *mcr-2* in clinical Enterobacteriaceae isolates from cats and dogs in Switzerland,” *ARC Journal of Animal and Veterinary Sciences*. 2(4), 26–29.
- Sipahi, N. (2023). Tavuk Kloakasında Laktozu Fermente Edemeyen Gram Negatif Bakteri Türlerinin ve Çoklu Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi. *Van Veterinary Journal*. 34 (1), 7-13.
- Snesrud, E., Ong, A.C. and Corey, B. (2017). “Analysis of serial isolates of *mcr-1*-positive *Escherichia coli* reveals a highly active IS *Apl1* transposon,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 61(5), 17.
- Sonola, V.S., Katakweba, A.S, Misinzo, G. and Matee, M.I.N. (2021). Occurrence of Multi-Drug-Resistant *Escherichia coli* in Chickens, Humans, Rodents and Household Soil in Karatu, Northern Tanzania. *Antibiotics*. (10), 1137.
- Srinivas, P. and Rivard, K. (2017). Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens. *Current Infectious Disease Report*. (19), 38.
- Stansly, P.G., Shepherd, R.G. and White, H.J. (1947). Polymyxin: a new chemotherapeutic agent. *Johns Hopkins Hospital Bull.* (81), 43–54.
- Straus, S.K. and Hancock, R.E. (2006). Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial Peptides and lipopeptides. *Biochimica Biophysica Acta*. (1758), 1215–1223.
- Sultan, I., Ali, A., Gogry, F.A., Rather, I.A., Sabir, J.S.M. and Haq, Q.M.R. (2020). Bacterial isolates harboring antibiotics and heavy-metal resistance genes co-existing with mobile genetic elements in natural aquatic water bodies. *Saudi Journal of Biological Sciences*. (27), 2660–8.
- Sun, J., Xu, Y., Gao, R., Lin, J., Wei, W., Srinivas, S., Li, D., Yang, R.S., Li, X.P., Liao, X.P., Liu, H.Y., Feng, Y. (2017). “Deciphering MCR-2 colistin resistance,” *mBio*, 8(3), e00625-17.
- Şahan, Ö., Aral, E.M., Aden, M., Aksoy, A., Yılmaz, Ö., Jahed, R., Akan, M. (2016). Türkiye'deki broyler tavuk işletmelerinden izole edilen *Salmonella* serovarlarının antimikrobiyel direnç durumu. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 63(1), 1-6.
- Şentürk, S. (2005). Evaluation of the anti-endotoxic effects of polymyxin-E (colistin) in dogs with naturally occurred endotoxic shock. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. (28), 57–63.
- Talbot, G.H., Bradley, J., Edwards, J.E., Jr., Gilbert, D., Scheld. M. and Bartlett, J.G. (2006). Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the antimicrobial availability task force of the infectious diseases society of America. *Clinical Infectious Diseases*. (42), 657–68.
- Terveer, E.M., Nijhuis, R.H.T., Crobach, M.J.T., Knetsch, C.W., Veldkamp, K.E., Gooskens, J., Kuijper, E.J. and Claas, E.C.J. (2017). “Prevalence of colistin resistance gene (*mcr-1*) containing Enterobacteriaceae in feces of patients attending a tertiary

- care hospital and detection of a *mcr-1* containing, colistin susceptible *E. coli*,” *PLoS One*. 12(6), Article ID e0178598.
- Tang, B., Wang, J., Zheng, X., Chang, J., Ma, J., Wang, J., Ji, X., Yang, H. and Ding, B. (2022). Antimicrobial resistance surveillance of *Escherichia coli* from chickens in the Qinghai Plateau of China. *Frontiers Microbiology*. (13), 885132. doi: 10.3389/fmicb.2022.885132.
- Timmermans, M., Wattiaua, P., Denis, O. and Bolanda, C. (2021). Colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-5*, including a case of triple occurrence (*mcr-1*, -3 and -5), in *Escherichia coli* isolates from faeces of healthy pigs, cattle and poultry in Belgium, 2012–2016. *International Journal of Antimicrobial Agents*. (57), 106350.
- Tornimbene, B., Eremin, S., Escher, M., Griskeviciene, J., Manglani, S., Pessoa-Silva, C.L. (2018). WHO global antimicrobial resistance surveillance system early implementation 2016-17. *The Lancet Infectious Diseases*. (18), 241–2.
- Velkov, T., Thompson, P.E., Nation, R.L. and Li, J. (2009). Structure-activity relationships of polymyxin antibiotics. *Journal of Medical Chemistry*. (53), 1898–1916.
- Velkov, T., Roberts, K.D., Nation, R.L., Thompson, P.E. and Li, J. (2013). Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. *Future Microbiology*. (8), 711-24.
- Versalovic, J., Thearith, K. and Lupski, R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*. 19 (24), 6823-6831.
- Vidaillac, C., Benichou, L. and Duval RE. (2012). In vitro synergy of colistin combinations against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. (56), 4856–61. doi: 10.1128/AAC.05996-11.
- Walsh, T.R. and Wu, Y. (2016). China bans colistin as a feed additive for animals. *Lancet Infectious Diseases*. 16(10), 1102–1103.
- Wang, G., Whittam, T.S., Berg, C.M. and Berg, D.E. (1993). RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. *Nucleic Acids Research*. (21), 5930–5933.
- Wang, X., Wang, Y., Zhou, Y, Li, J., Yin, W., Wang, S., Zhang, S., Shen, J., Shen, Z. and Wang, Y. (2018). Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerging Microbes and Infections*. 7(1), 122.
- Wang, R., van Dorp, L., Shaw, L.P., Bradley, P., Wang, Q., Wang, X., Jin, L., Zhang, Q., Liu, Y., Rieux, A., Schneiders, T.D., Weinert, L.A., Iqbal, Z., Didelot, X., Wang, H. and Balloux, F. (2018). The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. *Nature Communications*. (9), 1179.
- Wang, C., Feng, Y., Liu, L., Wei, L., Kang, M. and Zhiyong Zong, Z. (2020). Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerging Microbes & Infections*. (9), 509-516.

- Wang, W., Weng, Y., Luo, T., Wang, Q., Yang, G. and Jin, Y. (2023). Antimicrobial and the Resistances in the Environment: Ecological and Health Risks, Influencing Factors, and Mitigation Strategies. *Toxics*. (11), 185.
- WHO. (2015). Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. World Health Organization. Available online at: <http://www.who.int/iris/handle/10665/193736> (accessed June 20, 2021).
- WHO. (2018). The detection and reporting of colistin resistance <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/277175/WHO-WSI-AMR-2018.4-eng.pdf> Erişim tarihi: 08.01.2020.
- WHO. (2022). Strategic Priorities on Antimicrobial Resistance Preserving Antimicrobials for Today and Tomorrow May 2022; ISBN: 9789240041387. Antimicrobial Resistance (who.int). Available online: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240041387> (accessed on 10 May 2023).
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. (18), 6531-6535.
- Winfield, M.D. and Groisman, E.A. (2004). Phenotypic differences between *Salmonella* and *Escherichia coli* resulting from the disparate regulation of homologous genes. 725333.
- Wright, G.D. (2010). “Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic?,” *Current Opinion in Microbiology*. 13(5), 589–594.
- Wright, M.S., Suzuki, Y., Jones, M.B., Marshall, S.H., Rudin, S.D., van Duin, D., Kaye, K., Jacobs, M.R., Bonomo, R.A. and Adams, M.D. (2015). Genomic and transcriptomic analyses of colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* reveal multiple pathways of resistance. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*. 59(1), 536–543.
- Wu, R., Yi, L.X., Yu, L.F., Wang, J., Liu, Y., Chen, X., Lv, L., Yang, J., Liu, J.H. (2018). Fitness advantage of *mcr-1*-bearing IncI2 and IncX4 plasmids in vitro. *Frontiers Microbiology*. (29), 331.
- Xavier, B.B., Lammens, C., Ruhel, R., Kumar Singh, S., Butaye, P., Goossens, H., Malhotra-Kumar, S. (2016). Identification of a novel plasmid-mediated colistin resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveillance*. 21 (27), 30280.
- Yahav, D., Farbman, L., Leibovici, L. and Paul, M. (2012). Colistin: new lessons on an old antibiotic. *Clinical Microbiology of Infectious*. (18), 18–29.
- Yan, A., Guan, Z. and Raetz, C.R. (2007). An undecaprenyl phosphate-aminoarabinose flippase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. (282), 36077–36089.
- Yang, H., Chen, S., White, D.G., Zhao, S., McDermott, P., Walker, R. and Meng, J. (2004). Characterization of multiple antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(8), 3483-9.
- Yang, D., Qiu, Z., Shen, Z., Zhao, H., Jin, M., Li, H., Liu, W. And Wen-Li, J. (2017). “The occurrence of the colistin resistance gene *mcr-1* in the Haihe River (China),” *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 14(6), 576.
- Yang, Y.Q., Li, Y.X., Song, T., Yang, Y.X., Jiang, W., Zhang, A.Y., Guo, X.Y., Liu, B.H., Wang, Y.X., Lei, C.W., Xiang, R. and Wang, H.N. (2017). “Colistin resistance gene

- mcr-1* and its variant in *Escherichia coli* isolates from chickens in China,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 61(5), e01204–e01216.
- Yin, W., Li, H., Shen, Y., Liu, Z., Wang, S., Shen, Z., Zhang, R., Walsh, T.R., Shen, J. and Wang, Y. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *MBio*. 8 (3), e00543-17.
- Zgurskaya, H.I., López, C.A. and Gnanakaran, S. (2015). Permeability barrier of gramnegative cell envelopes and approaches to bypass it. *ACS Infectious Diseases*. (1), 512–22.
- Zhang, J., Wang, J., Chen, L., Yassin, A.K., Kelly, P., Butaye, P., Li, J., Gong, J., Cattley, R., Qi, K. And Wang, C. (2017). Housefly (*Musca domestica*) and blow fly (*Protophormia terraenovae*) as vectors of bacteria carrying colistin resistance genes. *Appl Environ Microbiol*. 84 (1).
- Zhang, J., Chen, L., Wang, J., Yassin, A.K., Butaye, P., Kelly, P., Gong, J., Guo, W., Li, J., Li, M., Yang, F., Feng, Z., Jiang, P., Song, C., Wang, Y., You, J., Yang, Y., Price, S., Qi, K., Kang, Y. and Wang, C. (2018). Molecular detection of colistin resistance genes (*mcr-1*, *mcr-2* and *mcr-3*) in nasal/oropharyngeal and anal/cloacal swabs from pigs and poultry. *Scientific Reports*. (8), 3705.
- Zhao, S., Maurer, J.J., Hubert, S., De Villena, J.F., McDermott, P.F., Meng, J., Ayers, S., English, L. and White, D.G. (2005). Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Veterinary Microbiology*. 107(3-4), 215-24.
- Zhi, C., Lv, L., Yu, L.F., Doi, Y. and Liu, J.H. (2016). Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infectious Diseases*. 16(3), 292–293.
- Zhou, Z., Ribeiro, A.A., Lin, S., Cotter, R.J., Miller, S.I. and Raetz, C.R. (2001). Lipid modifications in polymyxin resistant *Salmonella typhimurium*: PmrA dependent 4-amino-4-deoxy-L-arabinose and phosphoethanolamine incorporation. *Journal of Biological Chemistry*. 276(46), 43111–43121.

## ÖZ GEÇMİŞ

Ali SERDAR, Akçaabat Lisesi'ni bitirdikten sonra Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2010 yılında mezun oldu. 2015-2018 yılları arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisansını tamamladı. 2018 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı'nda Doktora programına başladı. Samsun İl Tarım ve Orman Müdürlüğü'nde görev yapan Ali SERDAR, iyi derecede İngilizce bilmektedir.

Temel ilgi alanları: Bilişim Teknolojileri, Yüzme, Futbol.

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0002-2457-3714

Yayınlar:

1. Serdar, A., Kiraz K., Yaman, Ş., Sezener, M.G., Fındık, A. (2022). Sağlıklı Tavuk Kümeslerinden İzole Edilen Çevresel Orjinli Enterobacteriaceae'nın GSBL ve Ampc Betalactamaz Üretimi Yönünden Fenotipik Karakterizasyonu. XV. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (vetmik 2022). 26-28 Ekim 2022, pp.: 124.
2. Serdar, A., Yaman, Ş., Kiraz K., Yamanoğlu, B., Fındık, A. (2022). Sağlıklı Tavuk Dışkılarından ve Çevresel Materyallerden İzole Edilen Escherichia coli Suşlarının Kolistin ve Çoklu Antibiyotik Dirençliliklerinin Araştırılması. XV. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (vetmik 2022). 26-28 Ekim 2022, pp.: 156.