



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİK-D-2012-0002

**KÖPEKLERDE *CAPNOCYTOPHAGA CANIMORSUS* ve
CAPNOCYTOPHAGA CYNODEGMI TÜRLERİNİN KÜLTÜR
VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Vet. Hek. Volkan ÖZAVCI

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Şükrü KIRKAN**

AYDIN - 2012

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİK-D-2012-0002**

**KÖPEKLERDE *CAPNOCYTOPHAGA CANIMORSUS* ve
CAPNOCYTOPHAGA CYNODEGMI TÜRLERİNİN KÜLTÜR
VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Vet. Hek. Volkan ÖZAVCI

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Şükrü KIRKAN**

AYDIN - 2012

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Vet. Hek. Volkan ÖZAVCI tarafından hazırlanan “KÖPEKLERDE *CAPNOCYTOPHAGA CANIMORSUS* ve *CAPNOCYTOPHAGA CYNODEGMI* TÜRLERİNİN KÜLTÜR VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI” başlıklı tez, 30/11/2012 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi :

İmzası:

1– Prof. Dr. Osman KAYA

ADÜ, Veteriner Fakültesi

2– Prof. Dr. Osman ERGANİŞ

Selçuk Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi

3–Doç. Dr. Şükrü KIRKAN

ADÜ, Veteriner Fakültesi

4–Doç. Cavit KUM

ADÜ, Veteriner Fakültesi

5–Doç. Dr. Süheyla TÜRKİYILMAZ

ADÜ, Veteriner Fakültesi

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun
..... Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Sacide KARAKAŞ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Her yıl dünya çapında milyonlarca insanın hayvanlar tarafından ısırıldığı rapor edilmektedir. Isırıkların % 90'ı köpekler tarafından meydana getirilir ve bu ısırık yaralarının büyük çoğunluğuna tıbbi müdahale yapılmamaktadır. Bazen bu köpek ısırığı sistemik bir enfeksiyon oluşturabilmektedir. Köpek ısırıkları nedeniyle enfeksiyon sonucu yıllık ölüm oranının 10 kişiden % 6.7'sinin olduğu belirlenmiştir. *Capnocytophaga* genusuna ait 7 tür insan ve evcil hayvanların ağız boşluğunda bulunmaktadır. *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochraceae*, *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga granulosa* ve *Capnocytophaga haemolytica* insan oral kavitesinde bulunmakta ve periodontitis ile ilişkilendirilmektedir. *Capnocytophaga cynodegmi* ve *Capnocytophaga canimorsus* ise daha çoğunlukla köpeklerin ağız florasında bulunmaktadır. *C. canimorsus* prevalansına ilişkin ilk raporda, 50 köpeğin % 8'i pozitif sonuç vermiştir. Bir sonraki raporda ise *C. canimorsus* bakımından test edilen köpeklerin %26'sından yapılan kültür pozitif olarak belirlenmiştir.

C. canimorsus çok hafif belirtilerle seyreden yada fatal sepsis gibi ağır semptom gösteren zoonotik enfeksiyonlara yol açabilir. Köpek tarafından ısırılan veya köpekle temas eden bireylerde görülen *C. canimorsus* enfeksiyonları siroz, splenektomi, Hodgkin hastalığı, Hairy cell lösemi, pulmoner fibroz, peptik ülser, Waldenström makroglobulinemisi, sistemik ve topikal kortikosteroid kullanımı gibi durumlarda ciddi klinik tablolara yol açmaktadır. Fusiform bakterilerden olan *Capnocytophaga spp.* Gram negatif kokobasil, uzun, ince, güç üreyen ve fakültatif anaerob bakteridir. Optimal üreme için zenginleştirilmiş CO₂'li ortama ihtiyaç duyar. *Capnocytophaga spp.* genusundan iki tür *C. canimorsus* ve *C. cynodegmi* kedi köpek ağız florasının endojen üyesidir ve ağız boşluğunda konuşlanmışlardır. İnsanda *C. canimorsus* bazen kedi ve köpek ısırması sonrası yaralara ve sistemik enfeksiyonlara neden olmaktadır. *C. cynodegmi* daha çok lokal yara enfeksiyonu yaparken sistemik enfeksiyon oluşturma olasılığı düşüktür. Bu iki tür arasındaki biyokimyasal benzerlik tür tespitinde zorluk oluşturmaktadır. Hatta yüksek sensitif moleküler metotlar uygulandığında sekans analizi iki tür arasındaki ayrım için ihtiyaç duyulmaktaydı. Hazırlanan bir raporA göre, *C. canimorsus*, *C. cynodegmi*'den 16S rRNA sekans karşılaştırması ile bile zor ayırt edilmekteydi. Bu sebeple *Capnocytophaga spp.* için gelişmiş uygun ve spesifik PCR sistemi gerekmektedir. Günümüzde PCR bazlı prevalans tespit metotları geliştirilmiştir.

Ülkemizde de bu hastalık etkeni ile ilgili Veteriner alanda yapılan çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma ile köpeklerde *Capnocytophaga* türlerinin bölgesel olarak saptanması ve ileride yapılacak olan çalışmalara ışık tutulması amaçlanmaktadır.

Araştırmamız, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından VTF-12016 kodlu proje olarak desteklenmiştir. Ayrıca, ADÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 07.10.2011 tarih ve 2011-103 sayılı kararı ile araştırmada etik açıdan bir sakınca bulunmadığı bildirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
RESİMLER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tanım	1
1.2. <i>Capnocytophaga</i> Türlerinin Sınıflandırılması	1
1.2.1. Taksonomik Sınıflandırma	1
1.2.2. Biyokimyasal Özellikler	3
1.3. <i>Capnocytophaga</i> Türlerinde Patojenite ve Virulans Faktörleri	5
1.4. <i>Capnocytophaga</i> Türlerinde Genotipik Özellikler	13
1.5. <i>Capnocytophaga</i> Türlerinin Epidemiyolojisi	14
1.6. <i>Capnocytophaga</i> Türlerinde Prevalans	15
1.7. <i>Capnocytophaga</i> Enfeksiyonlarında Klinik Belirtiler	17
1.8. <i>Capnocytophaga</i> Enfeksiyonlarında Tanı	18
1.8.1. Konvansiyonel Yöntemler	18
1.8.2. Moleküler Yöntemler	20
1.9. <i>Capnocytophaga</i> Türlerinde Antibiyotiklere Duyarlılık	21
1.10. Tedavi	22
1.11. Koruma	23
1.12. <i>Capnocytophaga</i> Enfeksiyonlarında İstatistiksel Veriler	24
2. GEREÇ VE YÖNTEM	27
2.1. Gereç	27
2.1.1. İzolasyon Örnekleri	27
2.1.2. Kullanılan Besiyerleri, Solusyonlar, Ayıraçlar	27
2.1.2.1. Besiyerleri	27
2.1.2.1.1. İzolasyon Besiyeri	27
2.1.2.1.1.1. Gentamisin İlaveli Kanlı Agar (Merck 1.10886)	28
2.1.2.1.1.2. Brain-Heart Infusion Broth (Merck 1.10493)	28

2.1.2.1.1.3. Lassen'in 3'lü Tüp Besiyerleri	28
2.1.2.2. Solusyonlar	29
2.1.2.2.1. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH:8.0) Buffer	29
2.1.2.2.2. Gel Loading Buffer (6X)	30
2.1.2.2.3. Tris (1M)	30
2.1.2.2.4. NaCl (1M)	30
2.1.2.2.5. TE Buffer (10mM tris+ 1mM EDTA)	30
2.1.2.3. Ayıraçlar	31
2.1.2.3.1. İndol ayırıcı	31
2.1.3. PCR	31
2.1.3.1. Kullanılan Cihazlar	31
2.1.3.2. MgCl ₂ , pfu DNA Polimeraz, 10X Vi Buffer A, dNTP Set	31
2.1.3.3. Primerler	31
2.1.4. Elektroforez Cihazı	32
2.1.4.1. Agarose Jel Hazırlanışı	32
2.1.4.2. Marker	32
2.1.4.3. Etidiyum Bromür	32
2.1.4.4. Pozitif Kontrol	32
2. 1.5. DNA Ekstraksiyon Kiti	33
2. 2. Yöntem	33
2. 2.1. Örneklerin Alınması	33
2.2.2. <i>Capnocytophaga spp.</i> İzolasyonu	33
2.2.3. DNA İzolasyonu	34
2.2.2.1. PCR	35
2.2.2.2. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi	38
2.2.2.3. Jelde Yürütme	38
2.2.2.4. Görüntüleme ve Değerlendirme	38
3. BULGULAR	40
3.1. İzolasyon Bulguları	40
3.2. PCR Bulguları	40
4. TARTIŞMA	45
5. SONUÇ	50
ÖZET	52

SUMMARY	53
KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	61
TEŞEKKÜR	62

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1.	Alınan svap örneklerinin yaş ve cinsiyete göre dağılımı	27
Çizelge 2.2.	PCR’da kullanılan oligonükleotid primer dizileri	31
Çizelge 2.3.	<i>Capnocytophaga spp.</i> identifikasyonu için kullanılan kriterler	34
Çizelge 2.4.	<i>Capnocytophaga spp.</i> için mastermiks hazırlanma oranları	36
Çizelge 2.5.	<i>Capnocytophaga canimorsus</i> için mastermiks hazırlanma oranları	37
Çizelge 2.6.	<i>Capnocytophaga cynodegmi</i> için mastermiks hazırlanma oranları	37
Çizelge 2.7.	PCR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı	38
Çizelge 3.1.	<i>Capnocytophaga spp.</i> pozitiflik oranlarının cinsiyete göre dağılımı	43
Çizelge 3.2.	<i>Capnocytophaga canimorsus</i> ve <i>Capnocytophaga cynodegmi</i> pozitiflik oranlarının cinsiyete göre dağılımı	43
Çizelge 3.3.	<i>Capnocytophaga spp.</i> pozitiflik oranlarının yaşa göre dağılımı	43
Çizelge 3.4.	<i>Capnocytophaga canimorsus</i> ve <i>Capnocytophaga cynodegmi</i> pozitiflik oranlarının yaşa göre dağılımı	44

ŞEKİLLER

Şekil 1.1	<i>Capnocytophaga</i> türlerinin mikroskopik görünümü	3
Şekil 1.2.	<i>Capnocytophaga</i> türlerinin kanlı agarda görünümü	3
Şekil 3.1.	<i>Capnocytophaga</i> spp. PCR pozitif örneklerin (<i>CaL2-AS1</i>) elektroforez görüntüsü	41
Şekil 3.2.	<i>Capnocytophaga canimorsus</i> ve <i>Capnocytophaga cynodegmi</i> PCR pozitif örneklerin elektroforez görüntüsü	42
Şekil 3.3.	Elde edilen örneklerden <i>Capnocytophaga</i> spp. prevalansı	42

1. GİRİŞ

1.1. Tanım

Dünya’da her yıl milyonlarca insanın hayvanlar tarafından ısırıldığı rapor edilmektedir. Bu ısırıklar hafif yaralanmalardan ciddi infeksiyonlara kadar değişik komplikasyonlara neden olmaktadır. İnfeksiyonlar ısırılan canlının ağız florasından ya da ısırılan canlının cilt florasındaki mevcut patojenlerden de kaynaklanmaktadır. Hayvan ısırığı ile insanlara geçtiği bilinen bakteri zoonozlarına göz atıldığında sıklıkla *Pasteurella multocida*, *Bartonella henselae*, *Spirillum minus*, *Streptobacillus moniliformis*, *Francisella tularensis* ve *Capnocytophaga canimorsus* türleri karşımıza çıkmaktadır. Bu türler arasında bulunan *Capnocytophaga canimorsus* DF-2 (disgonik fermentör) suşu ise köpek ve kedilerin ağız florasında bulunabilen gram negatif bir çomak olup insanda cerrahi sonrası sepsis ile ilişkili olarak görülebilen klasik bir zoonoz etkindir (Hinrichs ve ark. 1980, Spelman 1996).

Gelişen yara infeksiyonlarının hemen hemen çoğu polimikrobiktir. *Capnocytophaga spp.* türleri de sık izole edilen patojenlerdendir (Dendle ve ark. 2009, Talan ve ark. 1999). Isırıkların % 90’ı köpek ve kediler tarafından meydana getirilmekte ve bu ısırık yaralarının büyük çoğunluğuna tıbbi müdahale gereksiz görülmektedir. Bazen bu ısırıklar sistemik bir infeksiyon oluşturabilmektedir ve bu infeksiyonlar sonucu yıllık ölüm % 6.7 oranına ulaşabilmektedir (Griego ve ark. 1995).

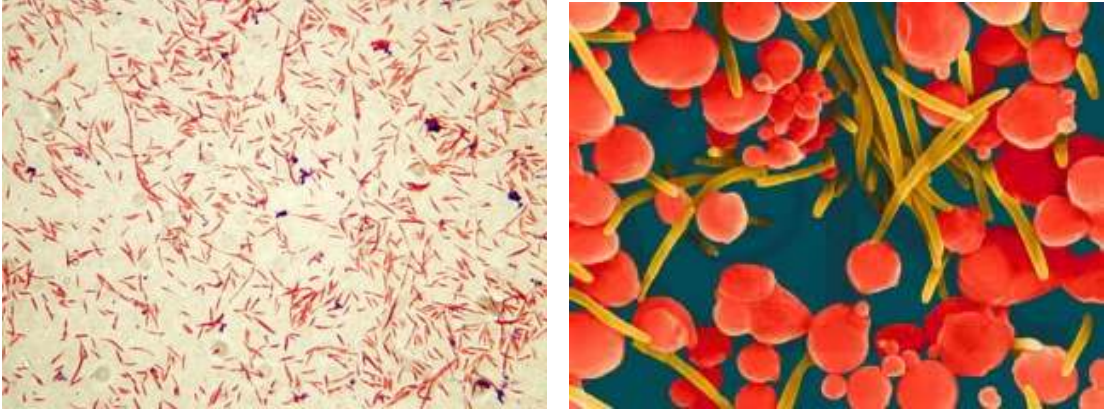
1.2. *Capnocytophaga* Türlerinin Sınıflandırılması

1.2.1. Taksonomik Sınıflandırma

Capnocytophaga spp., *Flavobacteriaceae* ailesi ve *Bacteroidetes* şubesinde bulunmaktadır. Fusiform bakterilerden olan *Capnocytophaga* genusu, Cytophagaceae familyasından 0.42-0,6 x 2.5-5.7 µm büyüklüğünde, uzun, ince, güç üreyen, gram negatif mikroaerofilik veya fakültatif anaerob, sporsuz, kapsülsüz, kapnofilik, kokobasil bir bakteridir. Agar besiyerlerinde parmaklı çıkıntıları sayesinde kayan koloniler (gliding motility) oluştururlar.

Capnocytophaga spp. türlerinin primer izolasyonu için anaerob şartlara gereksinim vardır. % 5 karbondioksit en ideal ortamı sağlamaktadır (Hawkey ve ark. 1984). Bu amaçla CO₂ inkübatörü veya mumlu kavanoz kullanılabilir. Karbondioksitli ortamda üreyebilen kapnofilik bakteriler oldukları için sürekli pasajlanırsa oksijeni tolere edebilir ve normal atmosfer koşullarında bile üremeye alışabilirler. *Capnocytophaga spp.* türlerinin üretilmesi için önerilen besiyerleri içerisinde en uygun olanı CAP besiyeridir. Ayrıca diğerlerine göre güvenilir ve avantajlıdır (Rummens ve ark. 1985, Mashimo ve ark. 1983). Buna ek olarak *Capnocytophaga canimorsus* büyüme için dışarıdan büyük miktarlarda demire de gereksinim duymaktadır. % 5 koyun kanlı Columbia agar veya % 10 CO₂'li ortamda çikolata agarda bakteri yavaş yavaş üreme gösterir (Brenner ve ark. 1989). Vankomisin, kolistin ve trimethoprima dirençli olduğu için modifiye Thayer-Martin agarda iyi ürerler, fakat MacConkey agarda üreme göstermezler. Agar'ın 5 gün süreyle en az 37 °C'de inkübasyonu gerekmektedir. Kolonileri kanlı agar'da 2-7 gün boyunca görünmeyebilir. Tavşan kanlı agarda ise koloniler 37°C'de 24 saatte ancak görülebilecek kadar gelişim göstermekte, 3-4 günde ise 2-3 mm çapında ortaları kabarık, yanları basık ve saçaklı bir hal almaktadır. Ek olarak at kanı içeren agar plaklarının kullanılabilirliğinin koyun kanı içerenlere oranla daha yüksek olduğu da tespit edilmiştir.

Capnocytophaga spp. türleri agar besiyeri yüzeyinde sarı-turuncu renkli koloniler ve beyaz yada sarı pigment oluşturabilirler. Ayrıca agar plakadan kazınan kolonilerin rengi pembe sarı arası bir formdadır. İnsan *Capnocytophaga* türlerinden farklı olarak, pozitif olan suşlar katalaz pozitifler ve petride beyaz renkli, düzgün şekilde üremiş, sivri uçlu, sulu (kalın, ıslak görünüm), yuvarlak çıkıntılı bir hücre kolonisi olarak görülürler ve fermentasyon reaksiyonlarını serum eklenmiş besiyerinde gerçekleştirirler (Winn ve ark. 2006).



Şekil 1.1. *Capnocytophaga* türlerinin mikroskopik görünümü



Şekil 1.2. *Capnocytophaga* türlerinin kanlı agarda görünümü

1.2.2. Biyokimyasal Özellikler

Biyokimyasal testlerin gerçekleştirilmesi organizmanın yavaş büyümesi nedeniyle zor olabilmektedir. Kayma hareketi yapan bir bakteri olan *Capnocytophaga spp.* kapnoid olarak isimlendirilen sülfonolipidleri (kapnin, 2-amino-3-hidroksi-15-metilhekzadesan-1-sülfonik asit) içerir ve bu maddeler bakteri hücrelerini saran major bileşenlerdir (Godchaux III ve Leadbetter 1980, Godchaux III ve Leadbetter 1983).

Capnocytophaga spp. üyeleri dekstran, glikojen, glikoz gibi çeşitli karbonhidratları, inulin veya nişastayı fermente substratlar ve enerji kaynağı olarak kullanabilirler. Ekstrasellüler dekstran sentez edebilirler (Hicklin ve ark. 1987, Brenner 1989).

Bakterinin bu ekstrasellüler ekstratları içerisinde CO₂ tutmasını sağlayan fosfoenolpiruvat karboksikinaz, alkalın fofataz, fosfatidiletanolamin gibi bileşenler de bulunur. Örneğin fosfoenolpiruvat karboksikinaz hem kendisinin hem de diğer kapnofilik bakterilerin CO₂ tutmasını sağlar. Ayrıca *Bacteroides spp.*, *Peptostreptococcus spp.* gibi bakteri türleri de *Capnocytophaga spp.* türlerine CO₂ temininde yardımcı olabilmektedirler. Biyokimyasal özelliklerine göre ayırt edilen diğer 3 tür ise *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga gingivalis* ve *Capnocytophaga ochraceus*'dur. *Capnocytophaga ochraceus* önceleri *Bacteriodes spp.* türlerinden sayılmakta iken sonradan *Capnocytophaga spp.* cinsi içine aktarılmıştır.

Sefalin ise başlıca fosfatidil etanolamindir. Bunlar saflaştırılıp deney hayvanlarına enjekte edildiğinde enjeksiyon bölgesinde kemik erimesine neden olurlar.

Diğer hemolizinlerin arasında hyaluronidaz, koagülaz, kollagenaz ve diğer proteazlar, fosfataz, amilaz, N-asetil-glukozaminidaz, esteraz, mukopeptitler, bakteri DNAsı, gliserol teikoik asitler, fosfolipitler sitoplazmik membran komponentleri, bakteriyel ribozomal proteinlerin pek çok fraksiyonu ve onların prekürsörleri, dış duvarı oluşturan peptidoglikanın kendisi ve peptit köprülerinin her birisi, nörominidaz ve kondritin sülfataz sayılabilir. Bakteri oksidaz, ONPG (O-nitrofenil-D galactoside), katalaz ve arginin dihidrolase açısından pozitif ve üreaz, nitrat, indol, DNaz, jelatin, lizin ve ornitin bakımından negatiftir.

Capnocytophaga spp. türlerinin fermentasyon reaksiyonları serum eklenmiş besiyerlerinde pozitif olmaktadır. Lizin ve ornitin dekarboksilaz ile arginin dihidrolaz reaksiyonları negatif olan bu bakterilerin türler arası ayırımında nitrat ve nitrit redüksiyonu, nişasta ve dekstran hidrolizi gibi biyokimyasal özellikler kullanılmaktadır (Winn ve ark. 2006).

1.3. *Capnocytophaga* Türlerinde Patojenite ve Virulans Faktörleri

Capnocytophaga canimorsus enfeksiyonu patogenezi hakkında az bilgi mevcuttur. Bakterinin yapılan laboratuvar deneylerinde fare makrofajlarında çoğaldığı gözlemlenmiş, ürettiği toksin sonucu sitotoksik bir hal aldığı ve patojenlerin bu şekilde fagositik hücrelerden beslenebildiği anlaşılmıştır (Fischer ve ark. 1995). Sitokin üretiminin in vitro ortamda başka bir menenjitis etkeni olan *N. meningitidis* ile karşılaştırıldığında çok düşük bir seviyede olduğu gözlenmiştir (Frieling ve ark. 1997).

Sepsiste, gram negatif bakterilerden LPS kan dolaşımına karışmakta ve lipopolisakkarit bağlayan protein (LBP), çözünebilir CD14 (sCD14), membran CD14 (mCD14), CD11/CD18 kompleks ve TLR'ler aracılığıyla doğal immun yanıtı başlatmaktadır (Medzhitov ve ark. 2000). TLR'ler immünitede kendine özgü ve esansiyel fonksiyonlara sahip, kalıp tanıma reseptörleridirler (PRR). Monosit ve makrofajlardaki yüzey proteini olan CD14'ün transmembran bölgeye sahip olmayışından dolayı sinyal iletiyi intrasellüler olarak iletemediği anlaşılmış ve TLRs transmembran bölgeye sahip gerçek iletilici yüzey molekülü olarak belirlenmiştir (Poltorak ve ark. 1998). CD14'ün aksine TLRs bakteri ve ürünlerinin tipini tanımda çok spesifiktir. Gram negatif bakteriyel LPS'yi TLR4'ün tanıdığı saptanmıştır (Opal ve ark. 2002). Pro-inflamatorik yanıtın yokluğunda *Capnocytophaga canimorsus* insan Toll-benzeri reseptör 4 (TLR4) ile etkileşim hali göstermemektedir (Shin ve ark. 2007). TLR4 için efektör LPS'nin lipid A kısmı *Capnocytophaga canimorsus*'u diğer patojenlerden farklı kılmaktadır. Bakteri sadece fagositoz ve öldürmeye karşı dayanıklı değil, aynı zamanda Cc5 gibi bazı suşları *E. coli* gibi ilgisi olmayan bakterilerinde makrofajlar tarafından öldürülmesini de engellemektedir (Meyer ve ark. 2008).

Nötrofillerin mikro organizmaları ve ürünleri tanımlarında TLR'ler aracılık etmekte ve doğal immun yanıtı başlatmaktadır (Aderem ve ark. 2001). Sepsiste TLR4 genindeki mutasyonlar sonucu endotoksine karşı direnç geliştiği de saptanmıştır (Modlin ve ark. 1999). İnsanlarda TLR4 mutasyonları ile endotoksine yanıtta azalma gözlemlenmiş fakat istenmeyen bir şekilde enfeksiyonlara karşı duyarlılığın arttığı gözlemlenmiştir (Arbour ve ark. 2000).

Capnocytophaga canimorsus'un beslenmek için hücrelerle direkt temas kurması gerekmektedir ve diğer bakterilerle yarışma faktörü olarak ayrıca kendisine maksimum fayda sağlamak amacıyla sialidaz enzimini ortama serbest bırakmamaktadır. Bir hipotez olarakta wt (saha suşu) ve *siaC Cc5* bakteri makrofaj bulunan ortamda beraber inoküle edildiği zaman çapraz beslenme olmamaktadır. Bu duruma göre wt *Capnocytophaga canimorsus*'un hücre yüzeyinden çıkan aminoşekerlerin yakalamasında etkili olduğu ve dış membranında bu fonksiyon için yüksek afiniteli transporterler bulunduğu düşünülmektedir. Fare doku kafes modeli kullanılarak in vivo ortamda *Capnocytophaga canimorsus*'un fagositlerden de beslendiği, saha suşu ve sialidaz bağımlı *Capnocytophaga canimorsus* arasında inatçı bakteri olma bakımından farklılık olduğu, Neu5Ac2en tarafından makrofaj varlığında *Capnocytophaga canimorsus* gelişiminde inhibisyon meydana geldiği tespit edilmiştir. Mikrobial sialidaz, bakteriyel yayılımı önlemeye karşı hedef etkili bir ilaç görevi göstermektedir (Von Itzstein 2007).

Sialik asit (N-asetil nöraminik asit, Neu5Ac) 9 karbonlu asit şekerler arasında bulunan, mannozamin ve pirüvattan türeyen bir amino şeker olup, polisakkaridlerin, glikoproteinlerin ve mukoproteinlerin yapısında yer alır. Ayrıca bakterilerde de yaygın olarak bulunmaktadır (Rosenberg ve ark. 1976). Hücre yüzeyinin terminal pozisyonunda bulunan ökaryotik glikan yapıları sekrete eden, doğal bağışıklığın düzenlenmesi, mikroplara bağlanma, hücresel iletimin düzenlenmesi, membranların reseptör fonksiyonlarının yerine getirilmesi ve konak-patojen etkileşimlerinde tanınmayı belirleyici gibi farklı biyolojik ve fizyolojik özellikleri vardır (Schauer 1982, Schauer 2000, Varki ve ark. 2007). Glikoprotein yapısındaki çoğu akut faz proteininin terminal ucunda bulunmasından dolayı sialik asit düzeyi akut-faz reaksiyonunun bir göstergesidir (Rosenberg ve ark. 1976).

Sialidaz, virulansa (en azından fare modelinde) katkıda bulunan bir faktördür. Ayrıca çalışmalarda metabolizma ve virulans arasında bir bağlılık olduğu da tespit edilmiştir. Daha öncede belirtildiği gibi sialidazın *Capnocytophaga canimorsus*'un glikoproteinlerde bulunan glikan zincirlerinden beslenmesine imkan sağlaması ve *Capnocytophaga canimorsus*'un da HeLa hücreleri ile beslenebilme yeteneğine bakıldığında, bu özelliğin bukkal epitelyum hücreleri ile beslenme adaptasyonu arasında

etkili olduğu anlaşılmaktadır. Sialidaz, bu beslenme sürecinde yüzeyi sınırlar ve bu yüzey lokalizasyonu glikan yapıların açığa çıkarılması için zorunludur. Ekstrasellüler *Capnocytophaga canimorsus* sadece HeLa hücreleriyle direkt temas yoluyla değil, makrofaj doku kültür hücreleri olan J774.1 makrofajlarıyla da etkin bir şekilde çoğalmaktadır. Bu durum, *Capnocytophaga canimorsus*'un sadece kültüre edilmiş makrofajlarca yapılan fagositozise dirençli olmak dışında normal fonksiyonu mikropları içine çekmek, yutmak ve öldürmek olan makrofajlara karşı da avantaj sağlamaktadır (Shin ve ark. 2007, Meyer ve ark. 2008). Sialidaz bağımlı mutant gelişimi GalNAc, GlcNAc ve LacNAc gibi aminoşekerlerce sağlanabilirken, glikoz, galaktoz, mannoz yada sialil–laktoz gibi şekerler bu görevde yer almamaktadır. Bakteri metabolizması için deglikozilasyon işlemini başlatmakta da yine sialidazın önemi vardır. Fakat yapılan çalışmalarda agara sialik asit eklenerek sialidaz-bağımlı mutant üretilmemesi sialik asitin sialidaz üzerinde etkisi olmadığını düşündürmektedir. Bakteri yüzeyinde yerleşik bulunan sialidaz konak hücre glikoproteinlerin glukon zincirlerinden internal aminoşekerleri kullanması için organizmaya imkan sağlar (Mally ve ark. 2008).

Vücut sıvılarında ve birçok dokuda negatif yüklü olan sialik asit hem serbest hem de glikolipid ve glikoproteinlerin karbonhidrat bölümlerine bağlı olarak bulunur. Sialik asidin en önemli özelliklerinden biri tanınmayı engelleyici fonksiyonudur. Birçok patojen bulundukları ortama kendini benzeterek (mimikri) komplement tarafından öldürülmemek ve opsonizasyondan kaçmak için yüzeylerine sialik asidi maruz bırakmak amacıyla çeşitli yollar geliştirmiştir (Burnaugh ve ark. 2007).

Capnocytophaga spp. bakterisinin etkili olduğu bir diğer durum da periapikal dokuya çıkıp, orada gruplar ve kümeler halinde bir araya toplanabilmeleri sonucu konak savunma hücrelerinin bu kümeyi fagosit etmesini zorlaştırması ve periapikal dokuda tip-II aşırı duyarlılığa sebep olmasıdır. *Capnocytophaga spp.* immunoglobulin, komplement faktör ve laktoferrin gibi insan proteinlerini ayrıştırabilen ekstrasellüler enzim üretebilir ve bu özelliği potansiyel virülens faktör olarak düşünülmektedir (Alugupalli ve ark. 1996). Gıda içinde *Capnocytophaga gingivalis* kaynaklı aminopeptidaz bulunması insan oral kavitesinde patogeneze bakımından önemli olabilmektedir. *Capnocytophaga sputigena* suşu kaynaklı lipopolisakkaritler insan periferik monositlerce üretilen poliklonal B-hücre ve

interlökin-1 aktivasyonunu sağlamaktadır (Kim ve ark. 1994). Serum direnci muhtemelen lipopolisakkarit yapı tarafından etkilenmekte ve *Capnocytophaga* türlerine potansiyel patojenik katkıda bulunan önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir. (Wilson ve ark. 1987). *Capnocytophaga spp.* türleri ile enfekte hastalarda, bu bakteri nedeni ile nötrofillerin morfolojik ve fonksiyonel olarak anormal hale geldiği bildirilmektedir. Ayrılabilir bir madde ürettikleri ve bunun nötrofil kemotaksisini bozduğu belirtilmiş ve fibroblast proliferasyon inhibitör faktör ile endotoksin salgıladıkları da saptanmıştır (Hawkey ve ark. 1984, Shurin ve ark. 1985). *Capnocytophaga spp.* türlerinin ESR (eritrosit sedimentasyon hızı) artışına, anemiye ve bunun yanında serum immun globulin konsantrasyonunda da artışa neden olduğu bildirilmiştir. Hasta serum immun globulin değerleri, normal değerlerin 2-3 hatta 4 katına kadar bir artış göstermiştir (Shurin ve ark. 1985).

Capnocytophaga spp. türlerinin G ve T olmak üzere iki farklı antijenleri bulunmaktadır. G antijenleri gruba özel, T antijeni tipe özel antijenlerdir. Ayrıca sadece bu organizmalara ait olan bir sulfonolipidleri vardır. Buna kapnin adı verilmektedir (Hawkey ve ark. 1984). *Capnocytophaga spp.* bakterisinin kollajen üretimine engel olan ve fibroblastların proliferasyonunu yavaşlatan bir özelliği bulunmaktadır (Ponte ve ark. 2001). Gram negatif bakterilerde enzimlerin dış membran içine saplanmış halde bulunması pek rastlanan durum değildir fakat, *Klebsiella oxytoca*'da pullulanaz'a karşı 116-kDa izoamilaz'ın bulunması buna aksi bir örnektir (Pugsley ve ark. 1990). Sialidaz ise pullulanaz benzeri bir lipoproteindir ve buna ek olarak *Y. enterocolitica*'da bulunan YadA gibi yüzeye gömülmüş ototranspottan sorumlu bir protein görevi de üstlenebilmektedir. *SiaC* kritik hedef belirlemede hazır bulunmak için doğal N-terminal sinyal dizisine sahiptir. Sialidaz, böylece *Sec* yolu ile sitoplamik membranı geçer fakat nasıl geçtiği ve gömülü olarak kaldığı halen izah edilememiştir. *Capnocytophaga ochracea* gibi oral patojenler ortama *P. gingivalis* vezikülleri ilave edildiğinde veziküllere tutunarak çökelirler ve böylece fagositozdan korunmaları daha mümkün olur. *Capnocytophaga spp.* ve *Cytophaga spp.* türlerinin fosfataz aktivitesi bulunan ekstraselüler vezikülleri vardır (Koretke ve ark. 2006).

Capnocytophaga canimorsus, fagositler başta olmak üzere memeli hücreleri ile direkt temasta olmaları halinde dahi güçlü ve dirençli bir büyüme göstermektedir. Bu özellik sialidase içeren yüzeye bağlıdır ve *Capnocytophaga canimorsus*'un konak hücre glikoproteinlerinden glikan zincirli internal aminoşekerlerden faydalanmasına imkan sağlar. Ayrıca sialidase, mukozal yüzeylerden karbonhidrat salınımı ile kommensal yaşamın idamesini sağlamakta, sıçangillerdeki infeksiyon modelinde bakteriyel kalıcılığa destek sağladığı görülmektedir. Hatta *Capnocytophaga canimorsus* konakçı glikan deglikozilasyonu vasıtasıyla polimorfnükleer lökositleri ile de beslenebilmektedir (Mally ve ark. 2008).

Capnocytophaga canimorsus bakterisi bu şekilde vücut savunmasının birincil aşamasından kaçabilmekte ve mevcut doğal bağışıklık sistemi tarafından tespit edilememektedir. Ölümcül sepsisemi ile gelen bir hastadan izole edilen *Capnocytophaga canimorsus* Cc5 hücrelerinin canlı veya yüksek ısı ile öldürülmüş (HK-heat inactivated) şekliyle makrofajların enfekte edilmesi ile tümör nekrozis faktör (TNF), interlökin -1 (IL-1), IL-6, IL-8, gama interferon, makrofaj inflamatorik protein 1b ve nitrik oksit salınımı gözlemlenmemiştir. Bu proinflamatorik yanıt yetersizliği ile karakterize durum, Toll benzeri reseptör 4'ün Cc5 hücreleri için zayıf kalması ile alakalı olmaktadır. HK olmayan canlı Cc5 hücreleri, HK *Yersinia enterocolitica* hücreleri tarafından indüklenen nitrik oksit ve tümör nekrozis faktör (TNF) salınımını da bloklamaktadır. Ayrıca defosforile p38 mitojen-aktive edilmiş protein kinaz ve Toll benzeri reseptör 4 yanıtında yetersizliğe neden olmaktadır (Shin ve ark. 2007).

Capnocytophaga canimorsus hücreleri sıçangillere ait makrofaj hücrelerine karşı da direnç göstermektedir. PMN-odaklı fagositosis ve yok etme olarak bilinen komplement sistemi tarafından öldürülmeye de direnç göstermektedirler. Yüksek duyarlıklılı mutant karakterizasyonu ve izolasyonu ile tüm bu özelliklerin lipopolisakkarit (LPS) benzeri polisakkaritik bir yapıya bağlı gerçekleştiği anlaşılmaktadır. Komplement tarafından öldürülmeye dirençli olmasına yönelik olarak bir çalışmada *Capnocytophaga canimorsus*'un öldürülme duyarlılığı test edilmiş, karşılaştırma için serum sensitif bakteri yerine *E. coli* Top10 hücreleri ve serum rezistant bakteri yerine *S. enterica* serovar typhimurium SL1344 hücreleri kullanılmıştır. Cc5 hücreleri değişik periyotlarla %10 NHS

(normal human serum) ile inkübe edilip, kültüre edildiğinde ve vital sayım ile canlı kalanların tespiti yapıldığında %10 NHS 30 dakika içinde canlı *E. coli* hücrelerini 5 log₁₀ birim azaltırken canlı Cc5 hücrelerini sadece 0.1 log₁₀ birim, *S. enterica serovar typhimurium* hücrelerini de 0.5 log₁₀ birim azaldığı tespit edilmiştir. 3 saat inkubasyondan sonra Cc5 hücre sayısı inoküle edilenden daha fazla iken *E. coli* sayısının 6 log₁₀ birim ve *S. enterica serovar typhimurium* sayısının 0.7 log₁₀ birim azaldığı gözlemlenmiştir. HI NHS ile inkübe edilen *E. coli* hücrelerinin canlı kalmasıyla öldürülmenin gerçekten komplement yoluyla gerçekleştiği anlaşılmıştır.

Serum sensitif Y1C12 mutant bakterisi de PMN fagositozuna karşı artmış sensitiviteye sahiptir. Opsonizasyon yokluğunda ve “konak/hedef ünite” başına enfeksiyöz birim sayısı anlamına gelen MOI-1’de PMN aracılı fagositozis ve opsonizasyonsuz öldürme seviyesi sırasıyla Y1C12 bakterisinde % 50 ve % 40 iken bu oran wt Cc5 bakterisi için % 30 ve % 20 olmaktadır. C7’den yoksun NHS ile preopsonize olan Y1C12 mutant bakterisinde fagositozis ve PMN aracılı öldürülme seviyesi % 40 olarak gözlenmektedir. Y1C12 mutant bakterisi HI NHS (heat-inactivated normal human serum-ısı ile inaktive edilmiş normal insan serumu) ile preopsonize edildiği zaman, fagositozis oranı % 10 artmaktadır. NHS içine Abs sunumu Y1C12 öldürme ve fagositoz seviyesinde küçük bir artıştan dolayı meydana gelmektedir. Sonuç olarak, Y1C12 Cc5 bakterisi mutant bakterisi de saha suşu gibi PMN tarafından öldürülme ve fagositoza yaklaşık olarak iki kat duyarlıdır. Ek olarak insanda görülen infeksiyonlardan izole edilen diğer iki *Capnocytophaga canimorsus* suşu Cc11 ve Cc12’in de Cc5 suşu kadar dirençli olduğu tespit edildi. Bu durumdan komplemente dirençli olmanın *Capnocytophaga canimorsus* suşlarının genel bir özelliği olduğu anlaşılmaktadır (Mally ve ark. 2008).

Köpek komensali olan *Capnocytophaga canimorsus*’un köpeklerde ve farelerde yapılan deneysel infeksiyonlara karşı oldukça dirençli olduğu tespit edildikten sonra Cc5 duyarlılığı normal köpek ve fare serumunda test edilmiştir (Mally ve ark. 2008). Öncelikle HI NHS ile inkübe edilen bakterilerde deneysel serum absorpsiyonu yapılmış, bunu takiben düşük pH’ta serum bağlı proteinlerin elüsyonu ve bu yıkantının immunoblot ile analizi yapılmıştır. Bu metot ile Cc5 suşu ve *E. coli* yüzeyinde yüzeyinde C4b-Bağlayıcı Protein (C4BP) bulunmamış fakat Cc5 suşu yüzeyinde insan faktörü H bulunmuştur. Daha

sonra bu gözlem florosein izotiyosiyanat (FITC)-konjuge sekonder Ab ile anti-fH ya da anti-C4BP Abs'e karşı Direk Akım Sitometri ile analiz edilmiş, fakat ne fH ne de C4BP bakteri yüzeyinde tespit edilememiştir. Bu durum göstermektedir ki ilk aşamada fH birikmesi gözlenebilmekte, fakat bu aşama C3b birikimini ispatlayacak yeterlikte olmamaktadır. Sonraki analizde komplement C3b birikiminin olup olmadığı test edilmiştir. Bakteri 30 dakika NHS'den yoksun C7 ile inkube edilmiş ve FITC-konjuge anti-C3c ile komplement C3b birikimi Akım Sitometrisi metodu ile tespit edilmiştir. Gerçekten de hem Cc5 bakterisinde hem de *E. coli* bakterisinde belirgin bir komplement C3b birikimi olmaktadır. Bu nedenle *Capnocytophaga canimorsus*'un komplement ile öldürülmeye direnci komplement C3b birikimi olmaksızın MAC ilavesiz durum ile benzer sonuçlanmaktadır. Ayrıca akım sitometri metodu ile Cc5 bakteri yüzeyinde C5B-9 tespit edilmiş fakat arka saha floresans ile karşılaştırıldığında 1.3 kat floresans yoğunluğunda artışa neden olduğu tespit edilmiştir.

Daha sonra Cc5 bakterisinin PMN tarafından fagositoza ve öldürülmeye dirençli olmasına yönelik insan ile *Capnocytophaga canimorsus* arasındaki PMN etkileşimi test edilmiştir. "Kontrol Rezistant Bakteri-Fagositozis" arasında kontrol amacıyla wt (saha suşu) *Y. enterocolitica* kullanılmıştır (Grosdent ve ark. 2002, Woestyn ve ark. 1994). MOI-1'de Cc5 hücreleri ve *Y. enterocolitica* fagositozis seviyesi sırasıyla % 30 ve % 40 olarak artmış ortalama % 20 Cc5 hücreleri ve % 30 oranında *Y. enterocolitica* bakterisi PMN tarafından öldürülmüştür. MOI-50 'de, Cc5 hücreleri fagositozise tamamen direnç göstermiştir ve PMN tarafından % 5'i öldürülmüştür. Bu duruma karşı % 28 saha suşu *Y. enterocolitica* hücresi fagosit edilmemiş ve % 17'si öldürülmüştür. NHS'den yoksun C7 ile preopsonizasyon, fagositoz seviyesini yükseltmekte ve iki kat MOI-1 tarafından Cc5 ve wt (saha suşu) *Y. enterocolitica* hücresinin öldürülmesine imkan sağlamaktadır (Grosdent ve ark. 2002, Woestyn ve ark. 1994).

C3b'den bağımsız opsonizasyon etkinliği test edildiğinde HI-NHS (Abs ve kendiliğinden şekillenmiş C3b) ve NHS'den yoksun C7 (C3b Abs ve aktive edilmiş C3b) arasında karşılaştırma yapılmıştır. HI-NHS fagositozisi artırmıştır ve Cc5 ölümü % 5 oranında gerçekleştirmiştir. Bu durum NHS havuzunda anti-*Capnocytophaga canimorsus* Abs olabileceğini göstermektedir. FACS analiz ile Abs sunumu anti-insan IgG-FITC

kullanılarak monitörize edildiğinde gerçekten HI-NHS ile Cc5 opsonizasyonu ortalama floresans yoğunluğunu 6 kat artırmıştır. Karşılaştırıldığında, C7'den yoksun insan serumu ile *Y. enterocolitica* preopsonizasyonu % 60 fagositozise neden olmakta ve MOI-1'de % 50 bakteri hücresi ölmüştür. MOI-50 'de ise, C7'den yoksun NHS ile Cc5 preopsonizasyonunda fagositozis oranı % 20 oldu. Sonuç olarak, Cc5 bakterisinin insan PMN'si tarafından öldürülmeye ve fagosite edilmeye, fagositik tip III sekresyon sistemine sahip olan ve bu şekilde aktin filamentlerini depolimerize ederek fagositozdan kurtulan *Y. enterocolitica*'dan bile daha dirençli olduğu görülmektedir (Grosdent ve ark. 2002, Woestyn ve ark. 1994).

Serum sensitif Y1C12 mutant öldürülmesi Ab bağımsız klasik yolu kapsamaktadır. Cc5 tanımlı ve fagositozise eğilimli Abs içeren NHS havuzunda bulunan bu Abs'nin komplement tarafından Y1C12 mutant bakterinin öldürülmesinde rolü olduğu düşünülmektedir. % 10 NHS, HI NHS, Ab'den yoksun NHS ve Ab'den yoksun HI NHS (Abs kaynağı olarak) katkılı NHS içinde wt bakterisinin canlı kalma oranlarında belirgin bir farklılık yoktur. Buna karşı Y1C12 mutant bakterisi HI NHS ve Ab'den yoksun NHS içinde canlı kalmış fakat HI NHS katkılı NHS ve Ab'den yoksun NHS'de kolayca ölmüştür. Bu şekilde sonuçlar *Capnocytophaga canimorsus* tanımlı spesifik Abs varlığına bağımlı komplement tarafından Y1C12 bakterisinin öldürüldüğünü göstermiş olmaktadır (Kadam ve ark. 1985).

Y1C12 mutant bakterisini hangi komplement yolu öldürmek için daha güvenilir olduğu hakkında detaylı bir değerlendirme yapıldığında Mg-EGTA ile muamele edilmiş NHS'nin klasik yolu ve lektin yolunu bloke ettiği görülmüştür (Fine ve ark. 1972). 180 dakika inkubasyondan sonra % 10 Mg-EGTA ile muamele edilmiş NHS'deki canlı bakteri sayısında $0.5 \log_{10}$ birimden daha az azalma oldu ki bu oran NHS ile muamele edilmeyen'de $6 \log_{10}$ birim olmaktadır. Öncelikli olarak görülmektedir ki Y1C12 bakterisi Ab bağımlı klasik yol ile öldürülmektedir. C3b birikiminde Y1C12 mutant bakterisi üzerinde insan serum Abs birikimi ise 1.5 kat artmaktadır. Bu duyarlılık artışının esaslı olarak MAC birikim duyarlılığındaki farklılıklardan dolayı olmakta olduğu düşünülmektedir (Kadam ve ark. 1985).

Komplement ve PMNs tarafından öldürülmeye duyarlı Cc5 suşunun izolasyonu ile ilgili yapılan çalışmada da NHS, canlı Y1C12 sayısını azaltmakta ve 3 saat inkubasyondan sonra 30 dakika içinde 5 log₁₀ birim'den 2 log₁₀ birime gerilemesine neden olmaktadır. HI-NHS ile inkübasyonda Y1C12 mutant bakterisinin canlı kalması göstermektedir ki komplement bağımlı ölüm gerçekleşmesi serum sensitivitesini kapsamaktadır. Hatta Y1C12 mutant bakterisi, komplement yoluyla öldürülmeye LPS'in O zincir formasyon bağımlı, rfaG mutant *S. enterica serovar typhimurium*'dan daha sensitiftir (Kadam ve ark. 1985).

Y1C12 mutant bakterisinde C3b birikimi saha suşu ile karşılaştırıldığında çok belirgin bir özellik göstermemektedir. Ayrıca saha suşunun komplement direnci C3b birikim eksikliğine bağlı olmamaktadır. Buna rağmen Y1C12 bakteri yüzeyinde belirgin MAC şekillenmesi gözlenmekte ve NHS ile 15 dakika inkubasyondan sonra wt Cc5'e göre mutant bakteri üzerine 2 kat daha fazla MAC yerleşimi tespit edilmektedir. Ama lize edilen bakterinin FACS analiz ile tespiti yapılamadığından dolayı bu farklılık herhangi bir önem kazanmamaktadır. Sonuç olarak mutant Y1C12 bakteri yüzeyde çok fazla MAC birikimine izin verdiği için komplement tarafından öldürülmektedir (Deshmukh ve ark. 2004).

1.4. *Capnocytophaga* Türlerinde Genotipik Özellikler

Capnocytophaga spp. kayma hareketi yapan (gliding) gram negatif basillerin yeni tanımlanmış bir genusudur. DNA'daki G+C oranı 33-41 mol'dür (Hawkey ve ark. 1984 , Rummens ve ark. 1985, Wilson ve ark. 1987). *Capnocytophaga canimorsus*'un DNA G+C içeriği % 35'tir (Speck ve ark. 1987, Brenner ve ark. 1989). Bu organizmalar normal oral flora üyesidir ve ilk *Bacteroides ochraceus* ve CDC grup DF-1 olarak tanımlanmışlardır. Genus başlarda morfolojik, fizyolojik ve DNA data bazlı olmak üzere *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena* ve *Capnocytophaga gingivalis* olarak adlandırılan üç türü barındırmıştır. *Fusobacterium spp.* ve *Bacteroides spp.* türleri yakından ilişkilidir (Andersen ve Pedersen 1992, Deshmukh ve ark. 2004). Ancak, hareketlilik motilitesi her zaman belirgin değildir.

Köpeklerin ağız boşluklarından sadece *Capnocytophaga cynodegmi* ve *Capnocytophaga canimorsus* düzenli bir şekilde izole edilmiştir ve bu iki tür görünüş şekli ve altbirim rRNA gen (16S rRNA) sırası ve % 97 sıra benzerliği bakımından birbirine çok

benzer tablo çizmektedir (Van Dam ve ark. 2009). Diğer genetik veriler ise bu iki organizmanın ciddi bir şekilde ayrımı için daha kullanışlı olabilir. Yağ asidi metil ester analizi, protein profilleri, multilokus enzim elektroforezisi ve immunglobulin A proteaz serotiplendirme gibi biyokimyasal testler (Janda ve ark. 2006), bu iki organizmanın olduğu kadar DNA araştırmalarının, PCR-RFLP'nin ve 16S rRNA sıra analizinin de ayırt edilmesinde kullanılmaktadır (Cianter ve ark. 2005). Sadece 16S rRNA geni ve RNA polimerazın beta altbirimi kodları olan *rpoB* geni türlerin arasında kesin bir ayrım yapmak için sıklıkla kullanılmaktadır (Janda ve ark. 2006).

Capnocytophaga haemolytica ve *Capnocytophaga granulosa* supragingival dental plaktan izole edilmektedir ve diğer *Capnocytophaga spp.* türleriyle benzer sellüler yağ asiti ve menakuinon içeriğine sahip olduğu anlaşılmıştır, fakat DNA-DNA düzeyleri % 20'den düşüktür (Yamamoto ve ark. 1994).

1.5. *Capnocytophaga* Türlerinin Epidemiyolojisi

Bu organizmalar bağışık yetmezliği olan hastalardaki sepsis ile ilişkilidirler. Özellikle akut miyelojenik lösemi veya akut lenfojenik lösemide oral ülserasyon ve granülositopeni ile karakterize sistemik infeksiyonlara neden olmaktadır (Campbell ve ark. 1991). Hayvan sahipleri, yetiştiricileri ve Veteriner Hekimler önemli risk grubunu oluşturmaktadır. ABD'de yapılan bir araştırma da Veteriner Hekimlerin % 65'inin hayvan ısırıklarına bağlı yaralanmalara, % 38'inin ise büyük hayvan travmalarına maruz kaldığı tespit edilmiştir (MacBean ve ark. 2007). Bir diğer çalışmada Veteriner Hekimlerin kariyerleri boyunca en az bir köpek tarafından ısırılma oranı % 92 olarak rapor edilmiştir (Landercasper ve ark. 1988). Bir vaka da ise Veteriner Hekimin diş ekstraksiyonu sırasında kırılan bir parçanın göze gelmesi ile infeksiyon etkenine maruz kaldığı rapor edilmiştir (De Smet ve ark. 1990, Chodosh 2001).

Capnocytophaga canimorsus infeksiyonlarının daha çok köpek ısırıkları (vakaların % 54'ü), köpek tırmık yaraları (vakaların % 8.5'i) ve yakın hayvan temasları (vakaların % 27'si) ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Lion ve ark. 1996). Köpek ısırığı yaralanmaları % 10- % 24 arası bir orana sahiptir (Landercasper ve ark. 1988). *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea* ve *Capnocytophaga sputigena* türleri bağışıklığı kuvvetli

konakta olası lokalize juvenil periodontitis meydana getirmekle birlikte polimikrobiyel enfeksiyonun bir parçası olarak da diğer bölgelerden izole edilebilmektedir.

İnsanların hastalık risk faktörlerine karşı korunması ve yeni doğanların enfeksiyon ya da travmaya bağlı zedelenmelerden etkilenmesini en aza indirmek amacıyla ailelerin pet hayvanları ile birlikte yaşamaya teşvik edilmesi denenebilir bir yol olarak değerlendirilmiştir (Rosenman ve ark. 2003).

Capnocytophaga canimorsus enfeksiyonları dünya üzerinde de görülmektedir ve Amerika Birleşik Devletleri, Kanada, Avrupa, Avustralya ve Güney Afrika'da enfeksiyon varlığı bildirilmiştir. Özellikle Avustalya 3.75 - 4 milyon kanin popülasyonuna sahiptir. Tahmini olarak % 63 oranında bir kesim bazı tür pet hayvanına sahip iken, % 53'lük bir kesim ise kedi ya da köpek beslemektedir. Bu da göstermektedir ki, her yıl 100.000'den fazla Avustralyalı köpek saldırısına maruz kalmakta ve bu saldırılar insanlarda farklı derecelerde yaralara neden olmaktadır. Avustalya halk hastanesi acil servislerine köpek ısırığı sebebiyle getirilen ve tedavi edilen 12.000 ile 14.000 insan arasından 1400'ü ciddi olarak yaralanmakta ve yoğun tedavi görmektedir. Isırık yaralarının % 4 ile % 25'i bakteri ile enfekte olmakta ve ilk semptomlar 24 saat içinde görülmeye başlanmaktadır (Dendle ve ark. 2008). Bakteri ayrıca selülit, ölümcül sepsis, organ yetmezliği, menenjit, endokardit hastalıklarına da neden olmaktadır.

1.6. *Capnocytophaga* Türlerinde Prevalans

Capnocytophaga canimorsus enfeksiyonları günümüzde gözden kaçmaktadır. Çünkü enfeksiyon şüphesi olan hastalar sıklıkla neden olan bakterilere karşı çoğu antibiyotik ile tedavi edilebilmekte ve *Capnocytophaga canimorsus*'un tipik bir antibiyotik tedavi sonrası primer kültürde üremesi de zorlaşmaktadır (Janda ve ark. 2006).

Köpek veya kedi ısırıkları ya da bu hayvanlar ile temas sonrası bakterinin kuluçka dönemi birkaç hafta kadar uzama gösterebilir ve klinik semptomlar aspesifik seyredebilir. Suni besiyerlerinde izolasyon sırasında karşılaşılan zorluklarla birlikte *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* arasında mevcut benzerliklerin olması

prevalansın ciddiye alınmamasına neden olmaktadır (Blanche ve ark. 1998). Ayrıca köpek ısırığına maruz kalan asiplenik kişilerde bu organizma ile infeksiyonun hızlı ölümüne götürme potansiyeli olduğu için ısırık yaraları göz ardı edilmemelidir (Maury ve ark. 1999, Bilgrami ve ark. 1992). Bu durum *Capnocytophaga canimorsus* prevalansı için yapılan deneysel testlerin geniş çapta değişik sonuçlar vermesine de neden olmaktadır.

Köpek ısırığı yaraları büyük oranda eller, ayaklar, baş, boyun ve gövdede sıklıkla 20 yaş üstü erkeklerde görülmektedir (Goldstein ve ark. 2005). 5-9 yaş arası çocuklarda ise yaralanmalar daha sıklıkla baş ve yüz bölgesinde görülmektedir (Goldstein 1992). Kedi ısırıklarına bağlı yaralanmaların % 66'sı üst ekstremitelerde ve tipik olarak ellerde görülmektedir (MacBean ve ark. 2007). Kemirgen kaynaklı yaralanmalar daha çok fare kaynaklıdır ve ısırıkların çoğu geceleri, yüz veya ellerde meydana gelmektedir (MacBean ve ark. 2007, Goldstein 1992).

Isırılma durumunda köpekten infeksiyon bulaşma oranı % 3 ile % 20 arasında olmasına rağmen (Underman 1987, Goldstein 1992), kedi ısırıkları için bu oran % 20 ile % 50 arasındadır (Talan ve ark. 1999).

Capnocytophaga canimorsus'a ait elde edilen değerler insan sağlığını da kapsamaktadır. Hastanede yapılan teşhis metodları genellikle kültür esaslı olmaktadır ve *Capnocytophaga spp.* infeksiyonu varlığında yanıtıcı sonuçlar meydana gelebilmektedir. Çünkü tüm hücreler kültür agara canlı olarak aktarılamamaktadır. Yavaş üreyen *Capnocytophaga canimorsus* kolonileri eş zamanlı olarak kolayca aşırı üreme gösterebilir ve eğer özellikle inokülasyon zamanında orijinal relatif sayıları küçükse oral mikroplar daha hızlı gelişebilir.

Bununla birlikte insanların oral kavitesinde çoğunlukla bulunan *Capnocytophaga ohrecae*, *Capnocytophaga haemolytica*, *Capnocytophaga gingivalis* ve *Capnocytophaga granulosa* türleri de beklenilmediği halde köpeklerden izole edilmiştir. Aynı zamanda kandan, beyin omurilik sıvısından, solunum yolu sıvılarından (pleura sıvısı da dahil) da

izole edilmişlerdir. Bu organizmaların in vitro hassasiyet testlerini yapmak zordur. Çünkü bunlar yavaş ve zor üreyen bakterilerdir (Kullberg ve ark. 1991).

Yapılan bir çalışmada örnek toplanan 120 köpekten % 49.2'sinin *Capnocytophaga spp.*'nin bir türünü, % 21.7'sinin ve % 11.7'sinin (14 pozitif) *Capnocytophaga cynodegmi* suşunu taşıdığını görülmüştür. Ayrıca 4 köpekte *Capnocytophaga ochracea*, 1 köpekte *Capnocytophaga haemolytica*, *Capnocytophaga gingivalis* ya da *Capnocytophaga granulosa* izolatından birine rastlanmıştır.

1.7. *Capnocytophaga* İnfeksiyonlarında Klinik Belirtiler

Capnocytophaga spp. ile infekte olan hastalarda sıklıkla bir köpek tarafından ısırılma veya ısırılma olmadan köpekle karşılaşma hikayesi vardır. Isırık sonucu meydana gelen yara infeksiyonlarının % 50'sinden fazlasında aerobik ve anaerobik olan patojenler izole edilmekte, ısırıklarda yaralanmaların daha çok ezilme tarzında olduğu gözlemlenmektedir. Ayrıca bu yaraların % 4 ile % 25'inde infeksiyon meydana gelmektedir. Köpek ısırığı başlangıçlı sistemik belirtilerin kuluçka dönemi yaklaşık 5 gün ve hospitalizasyon ile ısırılma zamanı aralığı da ortalama 7 gün olmaktadır (LeMoal ve ark. 2003).

Isırılma sonrası setisemiden sonra ilk belirtileri ateş (% 78 hastada), titreme (% 46), miyalji (% 31), kusma (% 31), diyare (% 26), karın ağrısı (% 26), halsizlik (% 26) , nefes darlığı (% 23), mental konfüzyon (% 23) ve baş ağrısı (% 18)'dir (Pers ve ark 1996). Sepsis, menenjit, osteomyelitis, peritonit, endokardit, pnömoni, pürülan artrit, dissemine intravasküler koagülasyon (DIC) ve fulminan purpura ile karakterize hastalıklar immün sistemi baskılanmış kişilerde ciddi bir hal alabilmektedir (Tobe ve ark. 1999). Lokalize selülit, ısırık ve yara bölgesinde ağrı, pürülan akıntı, lenfanjit ve daha sonraki aşamalarda bölgesel lenfadenopati de infeksiyona ait belirtiler arasında sayılabilmektedir (Pers ve ark 1996).

Capnocytophaga canimorsus çok hafif belirtilerle seyreden yada fatal sepsis gibi ağır semptom gösteren infeksiyonlara yol açmaktadır. *Capnocytophaga cynodegmi*'nin ise sistemik infeksiyon oluşturma olasılığı düşüktür. Bu sebeple daha çok lokal yara infeksiyonları, periodontal infeksiyonlar, oftalmik lezyonlar, solunum yolu infeksiyonları, travmatik perikarditis, mediastinal veya servikal abseler gibi orofarinks ile bitişik organları

etkileyip infeksiyonlara neden olduğu rapor edilmiştir (Handal ve ark. 2005, Mortensen ve ark. 1985).

Periodontal hastalıklarla birlikte sıklıkla mukozal ülserasyon, kanayan diş etleri ve gingivitis ile bağlantılı olarak *Capnocytophaga spp.* türlerinin dental plağa ait komensal bir mikroorganizma olduğu düşünülmektedir. Mukozitis ve oral mukozal bariyere ait lezyonların meydana gelmesi bu organizma için gerekli portal giriş yolunu sağlamaktadır. Böylece septisemi, peripartum infeksiyonlar, piyonefrozis, osteomyelitis ve septik artritis gibi infeksiyonlara neden olmaktadır (Winn ve ark. 1984, Glupczynski ve ark. 1983). Etkene bağlı diğer infeksiyonlar arasında siroz, splenektomi, Hodgkin hastalığı, Hairy hücreli lösemi, pulmoner fibroz, peptik ülser, Waldenström makroglobulinemisi, dissemine intravasküler koagülasyon (DIC), menenjit, endokardit ve selülit de sayılabilir (Winn ve ark. 2006). Ayrıca amniyonitis ve sonradan gelişen fetal kolonizasyon gibi diğer hematojen kaynaklı infeksiyonlardan da sorumlu olmaktadır (Hager ve ark. 1988).

Deneysel olarak *Capnocytophaga canimorsus* ile infekte edilen tavşanlarda damar içi pıhtılaşma bozukluğu, böbrek yetmezliği, böbreküstü bezlerinde hücrel nekroz, kutanöz gangren, trombositopeni, hipotansiyon, purpurik lezyonlar, hemorajik diatez ve peteşi ile karakterize klinik sendromlar tespit edilmiştir (Piccininno ve ark. 1984).

1.8. *Capnocytophaga* İnfeksiyonlarında Tanı

1.8.1. Konvansiyonel Yöntemler

Capnocytophaga canimorsus infeksiyonunun tanısı genellikle ısırılan kişiden alınan kan (% 88) ve ısırılan lokal bölgeden alınan örnek ile yapılan bakteri kültürü sonucu konulmaktadır. Bakteri fırsatçı bir patojen olarak çeşitli infeksiyonlardan ve balgamdan da izole edilebilmektedir (Janda ve ark. 2006). Tanıda faz kontrast mikroskopisi, fizyolojik test sonuçlarının belirsizlik göstermesi ve koloni morfolojisinin *Capnocytophaga spp.* ile eşleşmesi halinde olası *Capnocytophaga spp.* izolatlarının tespit edilmesinde kullanılmaktadır (Nachnani ve ark. 1992).

Capnocytophaga spp. türleri gibi yavaş üreyen mikroorganizmaları otomatize sistemlerle tanımlamak her zaman mümkün olmamaktadır. Bu sistemlerin yetersiz kaldığı durumlarda konvansiyonel biyokimyasal yöntemlerle bakteri tanımlanmasına gidilmektedir (Hawkey ve ark. 1984, Rummens ve ark. 1985).

Hücre sel yağ asitlerinin gaz-sıvı kromatografisi *Capnocytophaga canimorsus*'u da kapsayan köpek ısırığı infeksiyonları ile ilişkili gram-negatif bakterilerin ayrımı için hızlı bir test imkanı sağlamaktadır (Dees ve ark. 1981). Polianetol-sülfonat, otomatik kan kültürü sistemlerinde antikoagülan olarak sıkça kullanılan bir maddedir ve *Capnocytophaga canimorsus*'un üremesini engellemek gibi bir özelliği vardır (Sowden ve ark. 1995). Bafı kot (antikoagülanlı kanın, santrifüj edilerek plazma ile eritrositlerin arasında kalan ve lökosit içeren beyaz renkli kısım, buffy coat) yaymasında veya periferik yaymada bulunan lökositlerin içinde veya ısırığa bağlı olarak gelişen yara bölgesinden 1-7 gün içinde yapılan yaymada gram negatif basillerin görülmesi *Capnocytophaga canimorsus* infeksiyonunu akla getirmektedir (Lutwick 2005). Bir çalışmada 20 vakadan toplanan beyin omurilik sıvısı ile yapılan gram boyamalarda % 65 oranında *Capnocytophaga canimorsus* etkenine rastlanmıştır (De Boer ve ark. 2007).

Tay ve arkadaşları (1985), piyonefrozis gibi üriner sistem infeksiyonlarında standart tekniklerle idrardan *Capnocytophaga spp.* etkenini izole edememişler, fakat sadece cerrahi yolla toplanan irinden izole edebilmişlerdir.

Yapılan morfolojik ve fizyolojik testler *Capnocytophaga canimorsus*'un varlığını en çok köpeklerde göstermiştir. Bazı *Capnocytophaga canimorsus* kültürlerine ait testlerin negatif oksidaz veya katalaz olması iki şekilde açıklanmıştır. Buna göre birincil durum olarak *Capnocytophaga canimorsus* suşlarının hepsi katalaz ve oksidaz pozitif olmamaktadır, ikincil durum olarak ise bazı kültürlerde görülen katı, susuz üreme ile katalaz ve oksidaz testleri için yeterli hücre aktarımı engellenmiş olmaktadır (Rummens ve ark. 1986).

Capnocytophaga spp. suşlarının antibiyotik duyarlılıklarını saptamak zordur. Çünkü yavaş gelişim göstermektedirler (Rummens ve ark. 1986). Klinik laboratuvarlarda *Capnocytophaga spp.* suşlarına yönelik antibiyotik duyarlılık testlerinde % 1 poliviteks ve % 1 hemoglobin ile zenginleştirilmiş, 35 °C’de % 10 CO₂ ile 48 saat inkube edilmiş Columbia agarın baz alındığı agar dilüsyon metodunu kullanmışlardır (Nachnani ve ark. 1992, Rummens ve ark. 1986).

1.8.2. Moleküler Yöntemler

Günümüzde *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* arasındaki biyokimyasal benzerliğin tür tespitinde zorluk oluşturması iki tür arasındaki ayırım için gelişmiş duyarlı moleküler metotlara ihtiyaç duyulmasını beraberinde getirmiştir (Laughon ve ark. 1982). Oral gram-negatif türlerin konvansiyonel identifikasyonunda biyokimyasal testler ve hızlı identifikasyonda ise enzimatik reaksiyon testleri kullanılmaktadır. Ayrıca suşu kapsayan MIC (minimal inhibitör konsantrasyon) yokluğu bu infeksiyonların moleküler teşhisine öncülük etmektedir. Hazırlanan bir raporda, *Capnocytophaga canimorsus*’un, *Capnocytophaga cynodegmi*’den 16S rRNA sekans karşılaştırma metoduyla bile zor ayırt edildiği belirtilmektedir. Bu sebeple *Capnocytophaga spp.* için gelişmiş uygun ve spesifik tanı yöntemi olan PCR gerekmektedir. Günümüzde PCR bazlı prevalans tespit metotları da geliştirilmiştir (Mally ve ark. 2009).

Filogenetik analiz çalışmalarında her sekans için BLAST analizi uygulanmakta, tüm sıra, altbirim ve filogenetik analizi kapsayan en iyi BLAST uyuşması aranmaktadır. Veritabanında homoloji araştırması için öncelikle uygun BLAST programının seçilmesi gerekmektedir. BLASTN, bir nükleotid dizisi ile komplementer diziyi ele alarak nükleotid dizisi veritabanlarıyla karşılaştırılır. Hız amacıyla tasarlandığı için yüksek duyarlılık aranan durumlar için uygun olmamaktadır. BLASTN ve BALSTX, EST verilerinin analizi genomik dizi örneklemelerinin incelenmesinde kullanılır. *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* arasındaki 16S rRNA gen sekans benzerliği BLAST analizi esaslı olarak % 97 oranındadır. *Capnocytophaga canimorsus* sekans klad’ları için iyi bir destek olmasına rağmen grup içindeki çeşitlilik miktarı ve bu bölgede olası ağaç topolojisini bozan birbiriyle bağlantılı bir takım uzun dalların (daha çeşitli sekanslar)

mevcudiyetinden dolayı (> % 50) eksik destek ile *Capnocytophaga canimorsus* türünün birleştirilmesi daha olası olmaktadır (Van Dam ve ark. 2009).

1.9. *Capnocytophaga* Türlerinde Antibiyotiklere Duyarlılık

Günümüzde, kromozomal ve diğer plazmid kodlanmış laktamazlar *Capnocytophaga spp.* türleri içinde tanımlanmış ve CfxA3 (Jolivet-Gougeon ve ark. 2000) ve CfxA2 olarak isimlendirilmişlerdir. Handal ve ark. *Capnocytophaga spp.* türlerinde laktam antibiyotiklerine karşı % 80 oranında gelişen geniş-spektrumlu direnç'ten cfxA2 ve cfxA3 genlerinin sorumlu olduğu sonucunda karar kılmışlardır (Handal ve ark. 2005). Sıklıkla laktamazlar laktamaz inhibitör kombinasyonlarıyla inaktive edilebilmektedir ve Jolivet-Gougeon ve arkadaşları klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktamın *Capnocytophaga spp.* üzerinde intrinsik aktiviteye sahip olduğu tanımlanmıştır (Jolivet-Gougeon ve ark. 2000).

Beta-laktamaz üretimi olan bakterilerde beta-laktam antibiyotiklere direnç gözlenebileceğinden beta-laktamaz testinin üreyen mikroorganizmalara mutlaka uygulanması gerekmektedir (Winn ve ark. 2006).

İlk laktamaz üreten suşlar Kinder ve arkadaşları tarafından tespit edilmiş, daha sonra Rummens ve arkadaşları tarafından multiresiztant klinik izolasyonu yapılmıştır (Kinder ve ark. 1986). Laktamaz üreten suşlar ile ilgili birçok tanımlama yapılmış, fakat sadece Rosenau ve arkadaşları (2000) laktamaz'ın komple karakterizasyonu ile ilgili denemelerde bulunmuş ve plazmid kodlanımı genişletilmiş spektrum TEM-17 olarak rapor edilmiştir. TEM-17 enzimi ise *Capnocytophaga ochracea*'da bildirilmiştir (Gür 2004). Genellikle penisiline duyarlı olup aynı zamanda beta-laktamaz üretebilirler. Etken suşların % 30'u β -laktamaz salgılar (Rosenau ve ark. 2000). Geniş spektrumlu β -laktamaz fenotipi gösteren ilk TEM türeği TEM-3'tür ve 1987 yılında bildirilmiştir (Bradford 2001, Stürenburg ve ark. 2003). TEM-1 gram-negatif bakterilerde en sık bulunan ve dirençten sorumlu bir enzimdir. TEM-1 ve TEM-2 enzimleri sıklıkla transpozonlar tarafından kodlanan dar spektrumlu enzimlerdir (Gür 2004). TEM grubu β -laktamazlar Enterobacteriaceae üyelerinde sık bulunmaktadır (Bradford 2001, Welthagen ve ark. 2003).

Capnocytophaga spp. etkenine yönelik antimikrobiyel duyarlılık çalışmalarında bu türün tipik olarak klindamisin, linezolid, tetrasiklin, kloramfenikol, imipenem ve laktamaz inhibitor kombinasyonlarına dayanıksız olduğu gözlemlenmiştir (Geisler ve ark. 2001, Roscoe ve ark. 1992). Buna karşın çoğu suşun polimiksin, fusidik asit, fosfomisin, kolimisin ve trimethoprim'e karşı dirençli olduğu rapor edilmiştir (Rummens ve ark. 1986). *Capnocytophaga spp.* türleri üzerine etkili en etkili ajan klindamisin, diğer etkili ajanlar amoksisilin, kalvulonik asit, iminepem, latamoksef, seftazidim ve seftriakson olarak saptanmıştır. Aminoglikozit, vankomisin, trimetoprim ve aztreonam ajanlarına karşı bakteri direnç göstermektedir (Hawkey ve ark. 1987, Rummens ve ark. 1986).

1.10. Tedavi

Hastalarda suşun izolasyonu ve in vitro ortamda antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının tespit edilmesi hastalığın tedaviye cevap verme şansını arttırmaktadır. Suşlar hala çoğu antibiyotiğe duyarlıdır ve çoğu hasta dar spektrumlu antibiyotiklerle başarılı bir şekilde tedavi edilebilmektedir (Sandoe 2004). Duyarlılık sonuçlarının bazen bakteriyeminin ilerlemiş ve geç safhalarında elde edilmesi sebebiyle özellikle kan kültürlerinde ya da direkt muayenede gram negatif fusiform basil tespit edilir edilmez antibiyotik tedavisine başlanması gerekmektedir.

Capnocytophaga spp. türleri genellikle eritromisin, lindamisin, tetrasiklin, imipenem ve florokinolonlara duyarlı olup penisilin, aztreonam, kolistin ve metranidazole karşı duyarlılıkları ise değişkendir. Bu duruma göre ampirik tedavilerde antibiyotik olarak florokinolonlar, amoksisilin/klavulanik asit veya klindamisin tercih edilebilir (Campbell ve ark. 1991). Hatta etkili bir tedavinin ilk basamağı olarak parenteral laktam antibiyotiklerin verilmesi tavsiye edilmektedir. Beta-laktamaz üreten suşlar penisiline duyarlı olsa da amoksisilin ve sefalosporinlere direnç gösterebilirler. Bu nedenle *Capnocytophaga spp.* türlerinin aminoglikozidlere, trimetoprim'e, kolistin ve vankomisin'e intrinsik olarak direnç göstermeleri hastalığın seyri açısından bakterinin hızlı bir şekilde tanımlanmasını ve beta-laktamaz üretimi ve intrinsik aminoglikozid direncinin mümkün olan en kısa sürede klinisyene bildirilmesi sorumluluğunu yanında getirmektedir (Winn ve ark. 2006).

Antibakteriyel ajanlardan klaritromisin, mikrobiyolojik olarak değerlendirilmemiş olsa da *Capnocytophaga cynodegmi* ile enfekte olan romatoid artritli bir hastanın 10 gün

boyunca günde 1 gr klaritromisin alarak tedavi edilmesi sonucunun olumlu olduğunu belirtmiştir (Gerster ve ark. 2004). Linezolid ajanına karşı minimal inhibitör konsantrasyonuna yönelik net bir bilgi olmasada çalışmalarda *Capnocytophaga spp.* suşlarının bu ilaca duyarlı oldukları sonucuna varılmıştır (Sabbatani ve ark. 2004, Geisler ve ark. 2001).

Nötropeni riski taşıyan hastalarda tedavi dikkatli yapılmalıdır ve spektrum aktivitesi baz alınarak gram negatif suşlara karşı verilecek antibiyotik iyi seçilmelidir. Bu suşlar için genellikle imipenem/silastatin kombinasyonu kullanılmaktadır ve *Capnocytophaga spp.* suşları da bu kombinasyona her daim duyarlı olmaktadır. *Capnocytophaga spp.* ile meydana gelen septik artritlerin eradike edilmesi ve cerrahi yolla enfeksiyon bölgesinin drenajının yapılmasından sonra florokinolonların rifampisin yada klindamisin ile kombine edilerek tedavide kullanılmasına olumlu yanıt alındığı rapor edilmiştir. Yine, 8 haftalık bir septik artrit vakasından (Winn ve ark. 1984) *Capnocytophaga ochracea* etkenini cerrahi drenaj ile birlikte 6 haftalık sefamandol, sefaklor ve 2 haftalık metronidazol antibakteriyel tedavisi ile eradike etmişlerdir. Hastaya yapılacak drenaj ile birlikte laktamaz inhibitör kombinasyonları ve klindamisin gibi antibiyotiklerin kullanılması enfeksiyon riskine karşı koruma sağlamaktadır (Winn ve ark. 1984).

Capnocytophaga spp. bakterisi nadiren endoftalmitis, keratitis veya konjunktivitis gibi göz enfeksiyonlarından da izole edilmektedir (Font ve ark. 1994, Phipps ve ark. 2002). Topikal klindamisin uygulaması, florokinolonlar veya rifampisin kullanımı yararlı olmakla birlikte ciddi enfeksiyonlarda oral olarak amoksisilin / klavulanik asit kullanımı tercih edilmelidir (Le Moal ve ark. 2003, Rosenman ve ark. 2003).

1.11. Koruma

Capnocytophaga canimorsus'un neden olduğu enfeksiyon mortalite oranı % 30'dur ve prognoz ise zayıftır. Isırılma sonrası sistemik enfeksiyonlara karşı korunma amacıyla lokal pansuman, tetrasiklin ve amoksisilin/klavulanik asit kullanımı tavsiye edilmektedir (Lion ve ark. 1996).

Bağıışıklık sistemi zayıf hastalarda akciğer apsesi, empiyem ve sinüzitis gibi solunum yolu infeksiyonları oral kavite sekresyonları ile kontaminasyonun bir sonucu olarak meydana gelmektedir ve infeksiyonların çoğu polimikrobiktir. Bu kimselerde periodontal lezyonlardan korunma amacıyla klorheksidin içeren preparatların kullanılması ve bu içeriklerle günlük oral gargara yapılmasının faydalı olduğu tespit edilmiştir.

Dezinfeksiyon bakımından oral kavite ve özellikle dental plak *Capnocytophaga spp.* için ana habitat ortamıdır. Suşların en önemli yayılım kaynağı olmakla birlikte hedef olarak preventif tedavinin de uygulanacağı ilk basamak görevini üstlenmektedir. İyi bir hijyene sahip oral kavite de bu sayede düşük plak düzeyi ile birlikte mukozal yüzey ve salivaya yönelik *Capnocytophaga spp.* barınma kontrolü de sağlanmış olmaktadır. Ayrıca kronik nötropenili hastalarda gingival şartları iyileştirmek ve oral hijyeni sağlamak amacıyla %1'lik povidon-iyot solusyonlarının uygulanması ve lokal antibiyotiklerin tatbik edilmesi yine yararlı olmaktadır (Kobayashi ve ark. 2001).

1.12. *Capnocytophaga* İnfeksiyonlarında İstatistiksel Veriler

Son yıllarda bir köpeğin hayatı boyunca *Capnocytophaga spp.* bakterisini edinme faktörleri tanımlanarak olası infeksiyon oranı, infeksiyona maruz kalan insanların ve hayvanların yer aldığı vaka sayısı azaltılmaya çalışılmaktadır. Bu düşünceye yönelik yapılan çalışmalarda köpeklerde *Capnocytophaga spp.* mevcudiyeti ile cinsiyet (kısırlık durumu) ve yaş arasında dikkat çekici bir istatistiksel bağlantı olduğu anlaşılmış ve bu bağlantıya yönelik yapılan istatistiksel analizin ilk metodunda köpeğin cinsiyeti ve kısır olma durumunu kapsayan cinsiyetsizlik hali, yaş değerleri gibi lojistik metotlar *Capnocytophaga spp.* cinsinin ve *Capnocytophaga canimorsus* türünün tespiti için kullanılmıştır.

Bu değerler ışığında dişi köpeklerin erkek köpeklere oranla daha az *Capnocytophaga spp.* taşıdığı ve kısırlaştırılmış köpeklerde kısırlaştırılmamış olanlara oranla daha fazla *Capnocytophaga spp.* içerdiği tespit edilmiştir. Cinsiyet ve kısır olma durumu için p değerleri (p değeri; iki grubu karşılaştırmak amacı ile yapılan bir istatistiksel değerlendirmede, iki grup arasındaki farkın şans eseri olarak mı ortaya çıktığı olasılığını göstermektedir) *Capnocytophaga spp.* göz önünde tutulmasında belirleyici rol oynarken,

köpeğin cinsiyeti ise köpeğin bakteri barındırıp barındırmadığı değerlendirmesinde belirleyici bir sınır çizgisi olmaktadır (Lavy ve ark. 2009).

Yaş, temel bir belirleyici özellik olmasada *Capnocytophaga spp.* türünün genç köpeklerde fazla bulunmadığı, köpeğin yaşam döngüsündeki çevresel ve genetik karakter kombinasyonu ile organizmanın kazanımı arasında bir uygunluk olduğunu desteklemektedir. Lavy ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada oral bakteriyel tür çeşitliliğinde gözlemlenen değişimler ile köpeğin yaşı arasında istatistiksel bir bağlantı bulamamışlardır (Lavy ve ark. 2009).

Dişi ve erkek köpekler arasındaki bakım farkı genelde minimumdur. Evcil hayvanlarını cinsiyetsizleştirme ve kısırlaştırma sorumluluğunu alan insanlar tarafından edinilen köpekler sık sık en iyi bakılanlardır. Ve sonuç olarak minyatür ırklar genel olarak daha az dirençlidir ve daha dikkatli bakım gerekir. Daha iyi şartlarda bakılan köpeklerin bu organizmayı edinmeye daha yatkın olduğu düşünüldüğünde bu hipotezi test etmek için daha geniş örneklemeye ihtiyaç duyulabilir (Gaastra ve Lipman 2010).

Sadece köpeğin boyutlarını tanımlayan ağırlık özelliği ile ilgili herhangi bir korelasyon bulunmuyorken, ırk klasifikasyonu saptanmasında kullanılan iki metod ile fonksiyon ve olağan ağırlıklar değerlendirme altına alınabilmektedir. Bu metotlardan ırk sınıflama metodu 1, oyuncak ırkı grubun, AKC standart ırk ağırlığında ve 4.5 kg 'nin altında olan köpeklerin (genellikle AKC toy ırkları) *Capnocytophaga canimorsus* taşımaya daha yatkın olduğunu istatistiksel olarak öne sürmektedir (Gaastra ve Lipman 2010).

Küçük vücut ağırlığında olan 0.5-4.9 kg arası köpek ırkları oyuncak ırk (toy breed), 5.0-11.0 kg arası olan köpek ırkları küçük ırk, 11.7-20.3 kg arası olan köpek ırkları orta ırk, 20.7-33.8 kg arası olan köpek ırkları büyük ırk ve 34.2 kg ve üzeri olan köpek ırkları da ekstra büyük ırk olarak değerlendirilmiştir. Bu sınıflandırma baz alındığında ağırlık sıralamasının en altında yer alan köpek ırklarının *Capnocytophaga spp.* taşıma ihtimalinin daha büyük ve hatta bulundurma ihtimalinin daha kuvvetli olduğu sonucuna varılmıştır. Irkın boyutu sadece *Capnocytophagacanimorsus'un* dağılımını etkilemekte ve diğer

Capnocytophaga spp. türlerinin dağılımında etki göstermemektedir (van Dam ve ark 2009).

İrk sınıflandırma metodu 2 ise toy ırkların *Capnocytophaga canimorsus* taşımaya yatkın olduğunu (ayrı ayrı % 42.9 ve % 36.4) ve köpeklerin herhangi bir *Capnocytophaga spp.* türünü bulundurmaya da daha eğilimli olduğunu (toy köpeklerin % 72.7'si) göstermektedir. Bu durum sporcu, teriyer ve tazı gruplarının tam tersidir (% 0.0 ve % 16.7) çünkü bu gruplar *Capnocytophagacanimorsus* taşımaya daha az yatkınlık gösterirler (van Dam ve ark 2009).

Bu doktora tez araştırması ile köpeklerde *Capnocytophaga* türlerinin bölgesel olarak varlığının ortaya çıkarılması ve bu bakterinin insanlar için taşıdığı riskin belirlenmesi hedeflenmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. İzolasyon Örnekleri

Araştırma için Ocak-Nisan 2012 tarihleri arasında, Muğla ili ve çevresinde bulunan, dış taşı olan sahipli köpeklerden tekniğine uygun olarak alınan 200 adet oral swap örneği Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına soğuk zincirde getirilmiştir. Araştırma materyalini oluşturan oral swap örneklerinin 77 (% 38.5)'si erkek köpeklere ve 123 (% 61.5)'ü dişi köpeklere aittir. Örneklerin yaş ve cinsiyete göre dağılımı Çizelge 2.1.'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Alınan swap örneklerinin yaş ve cinsiyete göre dağılımı

Örnekleme Yapılan Köpek Irklarının Yaş Grubu	Örneklenen Erkek Köpek Sayısı (adet)	Örneklenen Dişi Köpek Sayısı (adet)	Toplam Örneklenen Köpek Sayısı (adet)
0-5 yaş	63	107	170
6-9 yaş	13	15	28
10 yaş ve üzeri	1	1	2
TOPLAM	77	123	200

2.1.2. Kullanılan Besiyerleri, Solusyonlar, Ayıraçlar

2.1.2.1. Besiyerleri

2.1.2.1.1. İzolasyon besiyeri

2.1.2.1.1.1. Gentamisin İlaveli Kanlı Agar (Merck 1.10886)

Blood agar base.....40 g.

Distile su.....100 ml

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlanıp, 15 dakika otoklav edildikten sonra, 50 °C'ye kadar soğutulup, içine %7 oranında steril defibrine koyun kanı ve 2 ml Gentamisin (Gentavilin™, flakon, 50 mg/1 ml) ilave edildi.

2.1.2.1.1.2. Brain-Heart Infusion Broth (Merck 1.10493)

Beyin-kalp ekstratı ve Pepton	27.5 g
D(+)-glukoz	2.0 g
Sodyum Klorid	5.0 g
Di-sodyumhidrojenfosfat	2.5 g
Distile su	1000 ml

Karışımın pH'sı 5.6'ya ayarlandıktan sonra ependorflara 2'şer mililitre aktarılıp 15 dakika otoklavda steril edildi.

2.1.2.1.1.3. Lassen'in 3'lü Tüp Besiyerleri

Tüp I

Peptone	20 g
Lactose	10 g
Glucose	1g
Sodium thiosulphate	0.2 g
Ferric ammonium sulphate	0.3 g
NaCl	6 g
Agar	17 g
Phenol red (0.2'lik)	12.5 ml
Distile su	1000 ml

Karışımın pH'sı 7.6'ya ayarlandı ve 121 °C'de 15 dk otoklav edilmek suretiyle steril edildi.

Tüp II

Peptone	5 g
Neopeptone	5 g
Mannitol	2 g
Agar	2.5 g
Potassiumnitrate	1.7 g
Phenol red (% 0.2'lik)	20 ml
Distile su	1000 ml

Karışımın pH'sı 7.6'ya ayarlandı ve 121 °C'de 15 dk otoklav edilmek suretiyle steril edildi.

Tüp III

L- Tryptophan	0.3 g
PotassiumDihydrogenphosphate	0.1 g
PotassiumHydrognephosphate	0.1 g
Üre	2 g
Ethanol (% 95'lik)	1 g
Phenol red (% 0.2'lik)	20 ml
NaCl	0.5 g
Distile su	1000 ml

Besiyerinin sterilizasyonu milipore (0.2 µ) filtreden süzülerek yapıldı (Koneman ve ark. 1997).

2.1.2.2. Solusyonlar

2.1.2.2.1. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH:8.0) Buffer

10X TBE Stok Solusyonu

Tris Base.....	121,1 g
Borik Asit.....	61,83 g
EDTA.....	5,84 g

Distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 15 dk otoklav edilip, pH 8.0 ayarlanarak buzdolabında saklandı.

0,5X TBE Kullanma Solusyonu

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

Karıştırılarak solusyon hazırlandı.

2.1.2.2.2. Gel Loading Buffer (6X)

Bromfenol Mavisi.....25 mg
Sükroz.....4 g
H₂O.....10 ml

Karıştırılarak solusyon hazırlandı.

2.1.2.2.3. Tris (1M)

Tris Base.....121 g

Tris Base 800 ml distile suda eritilip, yaklaşık olarak 60 ml HCl asit ilave edilerek pH: 7.6'ya ayarlanarak karışım 1000 ml'ye tamamlandı. 121 °C'de 15 dk otoklav edildi.

2.1.2.2.4. NaCl (1M)

NaCl.....58,44 g
Distile Su.....800 ml

NaCl distile suda çözüldükten sonra son hacim 1000 ml' ye tamamlandı.

2.1.2.2.5. TE Buffer (10mM tris+ 1mM EDTA)

Tris (1M).....10 ml
EDTA(0,5 M).....2 ml

Karıştırıldıktan sonra karışım 1000 ml distile su ile tamamlandı.

2.1.2.3. Ayıraçlar

2.1.2.3.1. İndol ayıracı

P-Dimethylaminobenzaldehyde	10 g
Isoamylalcohol	150 ml
HCl (konsantre)	50 ml

2.1.3. PCR

2.1.3.1. Kullanılan cihazlar

PCR 25 örnek kapasiteli Eppendorf Master Cycler kademeli termal döngüleme cihazında gerçekleştirilmiştir.

2.1.3.2. MgCl₂, pfu DNA Polimeraz, 10X Vi Buffer A, dNTP Set

50mM MgCl₂ (Vivantis ®), pfu DNA polimeraz (5U) (Vivantis ®), 10X ViBuffer A (100 mM Tris-HCl, pH 9.1, 500mM KCl, 0.1% Triton X-100) (Vivantis ®), 100mM deoksiniükleotidtrifosfat (dNTP) set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermentas ®) kullanılmıştır.

2.1.3.3. Primerler

Capnocytophaga spp. için *CaL2*, *AS1*, *CaR* ve *CyR* genlerinin belirlenmesinde kullanılan primerler Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. PCR'da kullanılan oligonükleotid primer dizileri (Suzuki ve ark. 2010)

Primer	Oligonükleotiddizisi (5'-3')	Büyükölük (bp)
<i>CaL2</i>	5'-GTAGAGTGCTTCGGCACTTG-3'	124
<i>AS1</i>	5'-GTGATGCCACCAAACAATACTA-3'	
<i>CaR</i>	5'-GCCGATGCTTATTCATACA-3'	427
<i>CyR</i>	5'-GCCGATGCTTATTCGTATG-3'	

2.1.4. Elektroforez Cihazı

Elektroforez işlemi Thermo marka, elektroforez tankında, görüntüleme işlemi VilberLourmat marka görüntüleme cihazında gerçekleştirildi.

2.1.4.1. Agarose Jel Hazırlanışı

Agarose (Sigma)..... 2 g
TBE (0,5X)..... 100 ml

Buffer, şişe içerisindeki agarozun üzerine ilave edilip, karıştırıldı ve mikrodalga fırında yaklaşık 3-5 dk kaynatılan karışım, 40-50 °C'ye kadar soğutuldu. Halen sıvı halde olan karışım, jel kalıbının içerisine yavaşça, kabarcık bırakmayacak şekilde döküldü ve içerisine yükleme kuyucuklarını oluşturacak olan taraklar yerleştirilerek, 15-20 dakika oda ısısında soğumaya bırakıldı. Soğutulan jel, kalıptan çıkarılarak, elektroforez tankına dikkatlice yerleştirildi.

2.1.4.2. Marker

Marker olarak 100 bp'lik DNA ladder (Fermentas) kullanıldı.

2.1.4.3. Etidium Bromür

Elektroforez işleminden sonra görüntüleme için jelin boyanmasında Sigma marka % 1' lik Ethidium Bromür 500 ml 0,5X TBE ile hazırlanan %2' lik agaroz jelin içerisine 5 µl miktarında eklenerek kullanıldı.

2.1.4.4. Pozitif Kontrol

Polimeraz Zincir Reaksiyonu çalışmalarının aşamalarında kullanılan *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* türlerinin standart suşlarından purifiye edilen pozitif kontrol DNA'lar, Michio SUZUKI (1-23-1 Toyama Shinjuku-ku Tokyo, Japonya)'den temin edilmiştir.

2.1.5. DNA Ekstraksiyon Kiti

DNA ekstraksiyonu amacıyla birçok mikroorganizmadan yüksek kaliteli genomik DNA'nın izolasyonu için dizayn edilmiş UltraClean Microbial DNA Isolation Kit® (MO BIO Laboratories, Inc.) kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Örneklerin Alınması

Araştırma için Ocak-Nisan 2012 tarihleri arasında, Muğla ili ve çevresinde bulunan, dış taşı olan sahipli köpeklerden tekniğine uygun olarak alınan 200 adet oral svap örneği Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına soğuk zincirde getirildi.

2.2.2. *Capnocytophaga spp.* İzolasyonu

Laboratuvara getirilen oral svap örneklerden *Capnocytophaga spp.* etkenlerinin saf olarak elde edilmesi amaçlanmıştır. Bunun için, oral svap örnekleri, diğer flora bakterilerinin üremesinin engellenmesi amacıyla gentamisin edilmiş koyun kanlı agara ekilmiştir. Ekimi yapılan agar plaklar, % 5 CO₂'li ortamda 5 gün süre ile inkubasyona bırakılmıştır (Suzuki ve ark. 2010). 5 gün sonunda sonunda üreme şekillenen besiyerlerinden preparatlar hazırlanarak Gram boyama yapılmıştır. Boyama sonucunda belirlenen gram-negatif basillerin ait olduğu kolonilere biyokimyasal testler uygulanmıştır (Çizelge 2.3.).

Çizelge 2.3. *Capnocytophaga spp.* identifikasyonu için kullanılan kriterler (Hawkey ve ark. 1984, Rummens ve ark. 1985)

KOLONİ MORFOLOJİSİ		KARBONHİDRATLARDAN ASİT ÜRETME	
Kanlı Agarda Üreme	Beyaz, sarı pigment, kabarık, yanlar basık, 2-3 mm çaplı ve R tipi.	Glukoz	Pozitif
MacConkey Agarda Üreme	Negatif	Maltoz	Pozitif
İndol	Negatif	Sükroz	Pozitif
Katalaz	Negatif	Mannoz	Pozitif
Oksidaz	Negatif	Mannitol	Negatif
Üreaz	Negatif	Riboz	Negatif
Arjinin Dehidrolaz	Negatif	Sorbitol	Negatif
Ornitin Dekarboksilaz	Negatif	Ksiloz	Negatif
Lizin Dekarboksilaz	Negatif	Trehaloz	Negatif
Esculin Hidrolizi	Pozitif	-	-

2.2.3. DNA İzolasyonu

200 köpeğin dışından alınan steril swaplar ile toplanan örnekler öncelikle (BD BBL kültür swab plus) Brain-heart infüzyon broth'da süspanse edildi ve 24 saat 35 °C'de % 5 CO₂ içeren mikroaerofilik atmosferde inkubasyona bırakıldı. İnkubasyona bırakılan broth kültürden bakteri hücreleri toplandı ve DNA ekstraksiyonu aşamasına geçildi (Kikuchi ve ark. 2005). Swap örneklerinden DNA izolasyonu UltraClean Microbial DNA Isolation Kit ile prosedüre uygun olarak yapılmıştır. Ayrılan DNA'lar PCR çalışmaları yapılana kadar cryo tüplerde -20 °C derin dondurucuda saklanmıştır.

UltraClean Microbial DNA Isolation Kit Prosedürü:

- 1.8 ml örnek ependorf tüpe aktarılıp 10000 devirde 30 saniye santrifüj edildi. Üst sıvı atıldıktan sonra tekrar 10000 devirde 30 saniye santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı.
- Pelete 300 µl microbead solüsyonu eklendi ve microbead tüplere aktarıldı.
- 50 µl MD1 solüsyonu eklendi ve 65 °C de 10 dakika Benmari’de inkübe edildi.
- Microbead tüpler 10 dakika ardından yatık olarak çalkalayıcıya kondu ve 10 dakika tutuldu.
- Microbead tüpler 10 dakikanın ardından fazla sarsılmadan 10000 devirde 30 saniye santrifüj edildi.
- Süpernatant steril temiz ependorfa transfer edildi
- Üzerine 100 µl MD 2 solusyonu eklendi ve 5 saniye vortekslendi. Ardından 4 °C de 5 dakika inkubasyona bırakıldı.
- 5 dakikayı takiben 10000 devirde 1 dakika santrifüj edildi.
- Yaklaşık 450 µl süpernatant pipetle alıdı ve steril ependorfa aktarıldı.
- Üzerine 900 µl MD3 solusyonu eklendi ve 5 saniye vortekslendi.
- Karışımın 700 µl’si Spin Filtreli tüpe aktarıldı ve 10000 devirde 30 saniye santrifüj edildi. Alt sıvı atıldı ve aynı işlem kalan karışım için tekrarlandı.
- Spin filtreli tüpe 300 µl MD4 ilave edildi ve 10000 devirde 30 saniye santrifüj edildi. Altta kalan sıvı kısım atıldıktan sonra tekrar boş olarak santrifüj edildi.
- Filtre yeni steril tüpe aktarıldı.
- Üzerine 50 µl MD5 filtrenin üzerine gelecek şekilde eklendi ve 10000 devirde 30 saniye santrifüj edildi.
- Santrifüjden sonra filtre atıldı ve altta kalan sıvı DNA olarak kullanıldı.

2.2.3.1. PCR

Master Mikslerin Hazırlanışı: Araştırmamızda *Capnocytophaga spp.* identifikasyonu için yapılan PCR reaksiyonlarında bir örnek için PCR amplifikasyonu 50 µl toplam hacimde, son konsantrasyon ViBuffer A (Vivantis ®) 10X enzimi tampon çözeltisi 1X, magnesium klorür (MgCl₂) 50 mM, dNTP 10x, primer (*CaL2-AS1* primer çifti için) 10 pmol, pfu DNA polymerase 5U (Vivantis ®) olacak şekilde gerçekleştirildi (Suzuki ve ark. 2010). Kullanılan malzemeler ve volümleri Çizelge 2. 3.’de belirtilmiştir. *Capnocytophaga canimorsus* identifikasyonu için yapılan PCR reaksiyonlarında bir örnek

için PCR amplifikasyonu 50 µl toplam hacimde, son konsantrasyon ViBuffer A (Vivantis ®) 10X enzimi tampon çözeltisi 1X, magnesium klorür (MgCl₂) 50 mM, dNTP 10x, primer (*CaL2-CaR* primer çifti için) 10 pmol, pfu DNA polymerase 5U (Vivantis ®) olacak şekilde gerçekleştirildi (Suzuki ve ark. 2010). Kullanılan malzemeler ve volümleri Çizelge 2. 4.'de belirtilmiştir. *Capnocytophaga cynodegmi* identifikasyonu için yapılan PCR reaksiyonlarında bir örnek için PCR amplifikasyonu 50 µl toplam hacimde, son konsantrasyon ViBuffer A (Vivantis ®) 10X enzimi tampon çözeltisi 1X, magnesium klorür (MgCl₂) 50 mM, dNTP 10x, primer (*CaL2-CyR* primer çifti için) 10 pmol, pfu DNA polymerase 5U (Vivantis ®) olacak şekilde gerçekleştirildi (Suzuki ve ark. 2010). Kullanılan malzemeler ve volümleri Çizelge 2. 5.'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.4. *Capnocytophaga spp.* için mastermiks hazırlanma oranları (Suzuki ve ark. 2010)

Malzeme (Ticari)	İstenen Son Miktar (µl)
ViBuffer A (10X)	5 µl
MgCl₂	3 µl
dNTP (2mM)	3 µl
Primer 1 (<i>CaL2</i>)	1 µl
Primer 2 (<i>ASI</i>)	1 µl
Pfu DNA Polimeraz (5U)	0.5 µl
ddH₂O	Son Volüme Tamamlanır
Template DNA (200 nM)	5 µl
TOPLAM	50 µl

Çizelge 2.5. *Capnocytophaga canimorsus* için mastermiks hazırlanma oranları (Suzuki ve ark. 2010)

Malzeme (Ticari)	İstenen Son Miktar (µl)
ViBuffer A (10X)	5 µl
MgCl ₂	3 µl
dNTP (2mM)	3 µl
Primer 1 (<i>CaL2</i>)	1 µl
Primer 2 (<i>CaR</i>)	1 µl
Pfu DNA Polimeraz (5U)	0.5 µl
ddH ₂ O	Son Volüme Tamamlanır
Template DNA (200 nM)	5 µl
TOPLAM	50 µl

Çizelge 2.6. *Capnocytophaga cynodegmi* için mastermiks hazırlanma oranları (Suzuki ve ark. 2010)

Malzeme (Ticari)	İstenen Son Miktar (µl)
ViBuffer A (10X)	5 µl
MgCl ₂	3 µl
dNTP (2mM)	3 µl
Primer 1 (<i>CaL2</i>)	1 µl
Primer 2 (<i>CyR</i>)	1 µl
Pfu DNA Polimeraz (5U)	0.5 µl
ddH ₂ O	Son Volüme Tamamlanır
Template DNA (200 nM)	5 µl
TOPLAM	50 µl

Mastermiksler hazırlandıktan sonra 0,2 mL’lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine 45’er µl hazırlanılan mastermiksden ilave edildi. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA’dan 5’şer µl alınıp, ilgili tüplerin içine eklenmiş ve ağızları sıkıca kapatıldı. Hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme cihazlarına yüklenip,

programlandı. *CaL2-AS1*, *CaL2-CaR* ve *CaL2-CyR* primerlerine özgü hazırlanan mastermikslere PCR analizlerinde kullanılan ısıt döngü ve süre diyagramı (Kikuchi ve ark 2005) Çizelge 2.5’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.7. PCR işlemine ait ısıt döngü ve süre diyagramı (Kikuchi ve ark 2005)

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	95°C	5 dk
Denatürasyon	35	95°C	30 sn
Bağlanma		58°C	1 dk
Uzama		72°C	1 dk
Son Uzama	1	72°C	7 dk
Bekletme	1	4°C	∞ dk

2.2.3.2. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi

0,2 mL tüplerde oluşturulan 50 µl’ lik PCR ürünlerinden 10’ ar µl pipet yardımıyla alınıp, 3 µl 6x loading dye solusyonu ile karıştırıldı. Oluşturulan karışımın tamamı alınarak, % 2’lik agaroz jeldeki uygun pozisyonadaki kuyucuğa yüklendi.

2.2.3.3. Jelde Yürütme

Hazırlanmış olan jele, istenilen örnekler ve markerların yüklemesi yapıldıktan sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonda bağlandıktan sonra 80V 500A akımda 40 dakika yürütüldü.

2.2.3.4. Görüntüleme ve Değerlendirme

Elektroforez işleminin ardından elde edilen jel, dikkatli bir şekilde elektroforez tankından çıkarıldı. Süre sonunda yürütülen jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki odacığa yerleştirildi. UV ışığı altında fotoğraflandıktan sonra, bant uzunlukları her PCR için ayrı değerlendirildi.

Değerlendirme daha önce bildirilen şekilde yapıldı. PCR analizinde, *CaL2* ve *AS1* primeri için 124 bp, *CaR* ve *CyR* primerleri için 427 bp uzunluğundaki bant oluşumları arandı.

3. BULGULAR

3.1. İzolasyon Bulguları

Araştırma için 2012 Ocak-Nisan tarihleri arasında, Muğla ili ve çevresinde bulunan, diş taşı olan sahipli köpeklerden tekniğine uygun olarak alınan 200 adet oral svap örneği Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına getirilmiştir. Laboratuvara getirilen oral svap örneklerinden *Capnocytophaga spp.* etkenlerinin saf olarak elde edilmesi için, oral svap örnekleri, diğer flora bakterilerinin üremesinin engellenmesi amacıyla gentamisin ilave edilmiş % 5 koyun kanlı agara ekilmiştir. Ekimi yapılan agar plaklar, % 5 CO₂'li ortamda 5 gün süre ile inkubasyona bırakılmıştır (Suzuki ve ark. 2010). İnkubasyon periyodu sonunda agar plaklarda şekillenen koloniler, Gram boyama yöntemi ile mikroskopik morfoloji açısından incelenmiştir. Boyama sonucunda belirlenen gram-negatif basillerin ait olduğu kolonilere biyokimyasal testler uygulanmıştır (Çizelge 2.2.) (Hawkey ve ark. 1984, Rummens ve ark. 1985).

Capnocytophaga şüpheli kolonilere yapılan izolasyon, identifikasyon ve biyokimyasal testler sonucunda elde edilen izolatlardan hiçbiri *Capnocytophaga spp.* olarak identifiye edilmemiştir.

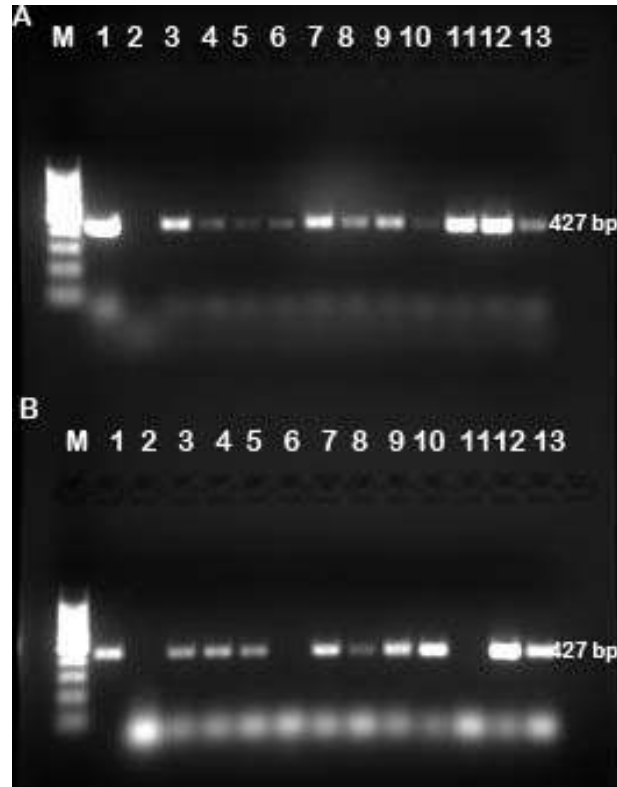
3.2. PCR Bulguları

Bu tez çalışması ile köpeklerde oral florada görülen ve klinik tanısı rutin olarak konulamayan *Capnocytophaga* infeksiyonlarının tanıları *CaL2*, *AS1*, *CaR* ve *CyR* geni nükleotid sekansları kullanılarak yapılmıştır. Araştırmamızda Muğla ili ve çevresinde bulunan diş taşı olan sahipli köpeklerden toplanan 200 adet oral svap örneği incelenmiş ve yapılan birinci PCR sonucunda 200 örneğin 11 (% 5.5)'inde *CaL2* ve *AS1* gen taşıyıcılığı saptanmıştır. Dolayısıyla bu örnekler, *Capnocytophaga spp.* pozitif olarak değerlendirilmiştir. Daha sonra *Capnocytophaga spp.* olarak tanımlanan etkenlerin DNA'ları, aynı koşullarla yapılan ikinci PCR sonucunda *CaR* ve *CyR* geni nükleotid sekansları kullanılarak *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* pozitifliği açısından da değerlendirilmiştir.

CaR ve *CyR* spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen ikinci PCR sonrasında *Capnocytophaga spp.* pozitif olarak saptanan örneklerde *CaR* ve *CyR* gen taşıyıcılığı aranmıştır. İncelenen toplam 11 örneğin 2 (% 18.2)'sinin sadece *CaR* geni açısından pozitif olduğu, 9 (% 81.8)'unun ise hem *CaR*, hem de *CyR* geni açısından pozitif olduğu tespit edilmiştir. Araştırma sonucunda, sadece *CyR* geni açısından pozitif olan örneğe ise rastlanmamıştır. Sadece *CaR* geni saptanan örnekler *Capnocytophaga canimorsus* pozitif, hem *CaR*, hem de *CyR* geni saptanan örnekler ise *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* pozitif olarak değerlendirilmiştir. PCR sonucunda elde edilen *Capnocytophaga spp.* PCR pozitif örneklerin elektroforez görüntüsü Şekil 3.1'de, *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* PCR pozitif örneklerin elektroforez görüntüsü Şekil 3.2'de ve araştırma materyalini oluşturan köpeklerde *Capnocytophaga spp.* prevalansı Şekil 3.3.'de gösterilmektedir.

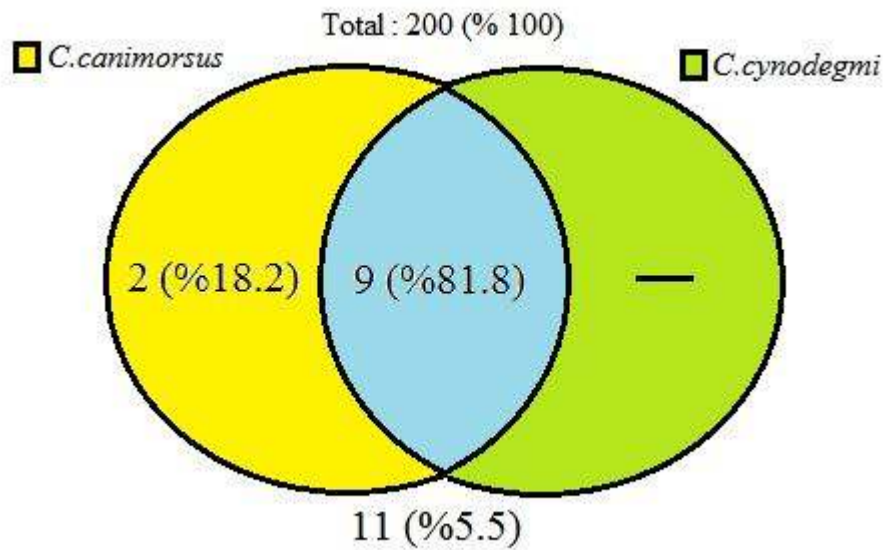


Şekil 3.1. *Capnocytophaga spp.* PCR pozitif örneklerin (*CaL2-AS1* primerleri ile yapılan PCR) elektroforez görüntüsü **M:**100 bp DNA ladder, **1:** *Capnocytophaga canimorsus* pozitif kontrol, **2:** *Capnocytophaga cynodegmi* pozitif kontrol **3:** Negatif Kontrol, **4-14:** *Capnocytophaga spp.* PCR pozitif örnekler



Şekil 3.2. *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* PCR pozitif örneklerin elektroforez görüntüsü

- A) *Capnocytophaga canimorsus* PCR pozitif örneklerin (*CaL2-CaR* primerleri ile yapılan PCR) elektroforez görüntüsü **M**:100 bp DNA ladder, **1**: *Capnocytophaga canimorsus* pozitif kontrol, **2**: Negatif Kontrol **3-13**: *Capnocytophaga canimorsus* PCR pozitif örnekler
- B) *Capnocytophaga cynodegmi* PCR pozitif örneklerin (*CaL2-CyR* primerleri ile yapılan PCR) elektroforez görüntüsü **M**:100 bp DNA ladder, **1**: *Capnocytophaga cynodegmi* pozitif kontrol, **2**: Negatif Kontrol **3-5**: *Capnocytophaga cynodegmi* PCR pozitif örnekler **6**: *Capnocytophaga cynodegmi* PCR negatif örnek **7-10**: *Capnocytophaga cynodegmi* PCR pozitif örnekler **11**: *Capnocytophaga cynodegmi* PCR negatif örnek **12-13**: *Capnocytophaga cynodegmi* PCR pozitif örnekler



Şekil 3.3. Elde edilen örneklerden *Capnocytophaga spp.* prevalansı

Elde edilen pozitiflik oranlarının cinsiyete ve yaşa göre dağılımı Çizelge 3.1, Çizelge 3.2., Çizelge 3.3. ve Çizelge 3.4.'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.1. *Capnocytophaga spp.* pozitiflik oranlarının cinsiyete göre dağılımı

PCR Pozitif Örnekler	Erkek köpek	Dişi köpek	Toplam pozitif örnek sayısı
<i>Capnocytophaga spp.</i>	2	9	11

Çizelge 3.2. *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* pozitiflik oranlarının cinsiyete göre dağılımı

PCR Pozitif Örnekler	Erkek köpek	Dişi köpek	Toplam pozitif örnek sayısı
<i>Capnocytophaga canimorsus</i>	-	2	2
<i>Capnocytophaga cynodegmi</i>	-	-	0
<i>Capnocytophaga canimorsus</i> ve <i>Capnocytophaga cynodegmi</i>	2	7	9
TOPLAM	2	9	11

Araştırmamız sonucunda *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* pozitif örneklerin 2 (% 22.2) adedi erkek hayvanlardan, 7 (% 78.2) adedi ise dişi hayvanlardan saptanmıştır. Sadece *Capnocytophaga canimorsus* pozitif olan 2 adet örneğin tamamı ise (% 100) dişi hayvanlardan saptanmıştır.

Çizelge 3.3. *Capnocytophaga spp.* pozitiflik oranlarının yaşa göre dağılımı

PCR Pozitif Örnekler	0-5 yaş	6-9 yaş	10 yaş ve üzeri	Toplam pozitif örnek sayısı
<i>Capnocytophaga spp.</i>	10	1	-	11

Çizelge 3.4. *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* pozitiflik oranlarının yaşa göre dağılımı

PCR Pozitif Örnekler	0-5 yaş	6-9 yaş	10 yaş ve üzeri	Toplam pozitif örnek sayısı
<i>Capnocytophaga canimorsus</i>	2	-	-	2
<i>Capnocytophaga cynodegmi</i>	-	-	-	0
<i>Capnocytophaga canimorsus</i> ve <i>Capnocytophaga cynodegmi</i>	8	1	-	9

Elde edilen pozitiflik oranlarının yaşa göre dağılımı incelendiğinde *Capnocytophaga* pozitif olarak saptanan 11 örneğin 10 (% 90.9)'unun 0-5 yaş grubu hayvanlardan, 1 (% 9.1)'inin ise 6 yaşlı bir hayvandan saptandığı belirlenmiştir. *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* pozitif örneklerin 8 (% 88.8)'inin 0-5 yaş grubu hayvanlardan, 1 (% 11.2)'inin ise 6 yaşlı bir hayvandan saptandığı belirlenmiştir. Sadece *Capnocytophaga canimorsus* pozitif olan 2 adet örneğin tamamı ise 0-5 yaş grubu hayvanlardan saptanmıştır.

Araştırmamızda, 200 örneğin 11 (% 5.5)'inden *Capnocytophaga spp.* identifiye edilmiştir. Pozitif örneklerin % 18'i *Capnocytophaga canimorsus*, % 82'si ise *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* olarak sınıflandırılmıştır. *Capnocytophaga canimorsus* sadece 2 dişi köpekten izole edilmiştir. 2 erkek köpek ve 7 dişi köpekten de *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* beraber identifiye edilmişlerdir. İzolatların 10'u 0-5 yaş köpeklerden identifiye edilirken, sadece 1'i 6-9 yaş köpekten identifiye edilmiştir.

4. TARTIŞMA

Capnocytophaga canimorsus köpek oral florasının bir üyesi olup ilk defa 1976 yılında köpek tarafından ısırılan sepsis ve menenjit infeksiyonu görülen bir hastanın kan ve beyin omurilik sıvısından izole edilmiş ve identifiye edilemeyen bir gram-negatif basillus olarak rapor edilmiştir (Bobo ve Newton 1976). O dönemlerde ajanın fenotipik özellikleri yanı sıra biyokimyasal özellikleri hakkında da yeterli bilgi bulunmamakta idi. Bir yıl sonra köpek ısırığı sonucu oluşan 17 olguda da infeksiyona identifiye edilemeyen bir gram-negatif basilin neden olduğu tespit edilmiştir (Butler ve ark. 1977). Bakteri daha sonra CDC grup DF-2 olarak kabul edildi, ancak araştırmalar sonucunda CDC grup DF-2'ye benzeyen başka bir bakteri grubu daha tanımlanınca 1989 yılında (Brenner ve ark. 1989) organizma'ya CDC grup DF-2'ye yavaş ve nispeten zayıf bir büyüme gösteren *Capnocytophaga canimorsus* (CDC grup DF-2 veya disgonik fermentör 2), CDC grup DF-2 benzeri bakterilere ise *Capnocytophaga cynodegmi* adı verilmiştir.

İnsanda 5 adet *Capnocytophaga* türü (*Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga granulosa* ve *Capnocytophaga haemolytica*) oral kavitede bulunmaktadır ve periodontitis ile ilişkilendirilmektedir. Bu genusa ait iki tür *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* kedi ve köpek oral florasının endojen üyesi olarak ağız boşluğunda bulunan komensal bir bakteridir (Brenner ve ark. 1989, Frandsen ve ark. 2008, Coyne ve ark. 2008). Disgonik fermenter grup (DF) 2'ye ait türleri kedi ve köpeklerin oral florasında bulunmaktadır. Disgonik fermenter grup 1'e ait türler ise sağlıklı kişilerin normal oral florasının üyesidir. Ayrıca insanlarda diş çürüğü varlığında bulunduğu düşünülen bazı türlerden *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga haemolytica*, *Capnocytophaga gingivalis* ve *Capnocytophaga granulosa*'da köpek oral florasından izole edilmiştir (Dilegge ve ark. 2011).

Capnocytophaga canimorsus prevelansına ilişkin ilk araştırmalarda test edilen 50 köpeğin % 8'inin pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir (Bailie ve ark. 1978). Daha sonraki çalışmalarda ise *Capnocytophaga* infeksiyonlarının çoğunun köpek ısırması ve yalaması sonucu açık yaralardan etkenin alınması şeklinde gerçekleştiği bildirilmiştir.

Konvansiyonel kültür metoduna göre yapılan bir çalışmada *Capnocytophaga canimorsus*'un ırısık yaralarından köpeklerde % 74, *Capnocytophaga cynodegmi* ise % 86 oranında izole edildiği tespit edilmiştir (Brenner ve ark. 1989). Başka bir çalışmada ise *Capnocytophaga canimorsus* bakımından test edilen köpeklerin % 26'sından yapılan kültürlerle yönelik sonuçları kapsamaktadır ve sonuçlar PCR'ın bakteriyel identifikasyona göre daha duyarlı olduğunu desteklenmiştir (Blanche ve ark. 1998). Günümüzde PCR yardımı ile *Capnocytophaga cynodegmi*'den *Capnocytophaga canimorsus*'un ayrımı ve tiplendirmesi yapılmakta, kedi ve köpeklerdeki prevalansı bu yöntem ile tespit edilebilmektedir (Suzuki ve ark 2010).

Günümüzde *Capnocytophaga canimorsus* 16S rDNA dizisi ile % 97 oranında identifiye edilebilmektedir (Frey ve ark. 2003). Suzuki ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan bir çalışmada *Capnocytophaga canimorsus* bakterisini barındıran köpeklerin yüzde oranını saptamak ve bu mikroorganizmanın varlığı, genel tür ve sağlık karakterleri arasındaki potansiyel bağlantıları hakkında ön verileri bir araya getirmek amacıyla 325 köpeğin % 74'üne ait oral svaplar kullanılarak küçük altbirim rRNA geni (16S rRNA) fragment PCR amplifikasyonu ile yapılan net moleküler görüntüleme sonucunda köpeklerin sadece % 22'sinin *Capnocytophaga canimorsus* taşıyıcılığı yaptığı tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada köpeklerden aldıkları örneklerde hala tanımlanmamış *Capnocytophaga spp.* türlerinin olduğunu da tespit etmişlerdir (Suzuki ve ark. 2010).

Bu tanımlanmamış izolatlar *Capnocytophaga spp.*'ya ait yeni türü temsil eden, iyi belirlenmiş % 100 ön yükleme destekli, belli bir ortak soydan gelen organizma takımını kapsayan filogenetik ağaç dalı olarak (klad) biçimlendirilmiştir. Bu filogenetik analizlerde bu klad'ın *Capnocytophaga gingivalis* ve *Capnocytophaga granulosa*'ya diğer bilinen *Capnocytophaga spp.* türlerinden daha yakın olduğunu belirlemiştir (Suzuki ve ark. 2010).

Başka bir çalışmada *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* 16S rRNA gen amplifikasyonu ayrımı için farklı primer kombinasyonları ile PCR spesifitesi ve sensivitesi tespit edildiğinde her iki türden ekstrakte edilen DNA'lardaki hedef sekanslar CaL2-AS1 primer çifti kullanılarak amplifiye edilmiş ve spesifik DNA amplifikasyonunda CaL2-CaR primerleri kullanılarak *Capnocytophaga canimorsus* DNA'sı, CaL-CyR primer çifti kullanılarak da *Capnocytophaga cynodegmi* DNA

fragmentine ulaşılmıştır. İnsan oral boşluğundan izole edilen diğer 5 *Capnocytophaga spp.* genusunu da kapsayan bakteriyel amplifikasyonda *CaL2* forward primer ile 3 reverse primer kombinasyonu kullanımından ise sonuç alınamamıştır (Suzuki ve ark. 2010).

PCR'da kullanılan *CaL2* primeri ile birlikte *CaR* ya da *CyR* primerleri ise *Capnocytophaga spp.* genusuna ait her bir türün spesifik amplikasyonunda imkan sağlamaktadır. Kedi ve köpeklerden bulunan örnekler ile *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* türlerine ait spesifik dizi analizi (sekans) varlığı açısından incelendiğinde 325 köpeğin 240'ında (% 74) ve 115 kedinin 66'sında (% 57) *Capnocytophaga canimorsus* bakterisi, 325 köpeğin 279'unda (% 86), 115 kedinin 97'sinde ise *Capnocytophaga cynodegmi* bakterisi tespit edilmiştir. Her iki bakteri türüne ise 325 köpeğin 219'unda % 67, 115 kedinin 64'ünde (% 56) rastlanmıştır. Başka bir çalışmada karşılaştırmalı olarak test edilen koyun ve sığır'ların % 25-30'unda *Capnocytophaga canimorsus* izolasyonu (DF-2) rapor edilmiş fakat domuzlarda edilmemiştir (Westwell ve ark. 1989). Araştırmamızda da *Capnocytophaga* türlerinin identifikasyonu *CaL2*, *AS1*, *CaR* ve *CyR* geni nükleotid sekansları kullanılarak yapılmıştır. Köpeklerden toplanan 200 adet oral svap örneklerinin PCR ile incelenmesi sonucunda 200 örneğin 11 (% 5.5)'inde *CaL2* ve *AS1* gen taşıyıcılığı saptanmıştır. Daha sonra *Capnocytophaga spp.* olarak tanımlanan bu etkenlerin DNA'ları, aynı koşullarla yapılan ikinci PCR sonucunda *CaR* ve *CyR* geni nükleotid sekansları kullanılarak *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* pozitifliği açısından da değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda ise İncelenen toplam 11 örneğin 2 (% 18.2)'sinin sadece *CaR* gen taşıyıcılığı açısından pozitif olduğu, 9 (% 81.8)'unun ise hem *CaR*, hem de *CyR* gen taşıyıcılığı açısından pozitif olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda sadece *CyR* geni açısından pozitif olan örneğe ise rastlanmamıştır.

Köpek tarafından ısırılan veya tırmalanan insanların bildirildiği yaklaşık 200 vakada *Capnocytophaga canimorsus*'un neden olduğu sepsisemi, menenjit veya gangren tespit edilmiştir (Brenner ve ark. 1989, Blanche ve ark. 1998, Tierney ve ark. 2006). Bu tür vakaların çoğunda köpek ısırıkları veya köpek ile temas ön plandadır (Blanche ve ark. 1998). Köpek ısırıklarında doku hasarı daha fazla olduğundan bakteri bu bölgelerde daha kolay üreme gösterebilmektedir (Carpenter ve ark. 1987). Bir araştırmada (Lavy ve ark. 2009) 6 aylıktan daha küçük 17 köpekten 3 tanesinde *Capnocytophaga spp.*'ye

rastlanmıştır. Bu yaş aralığını ilginç kılan ise yavru köpeklerin yaşının 4. ayı itibari ile ilk dişlerini kaybetmeye başlaması ve 6. aydan itibaren bu dişlerin yerini tamamen yetişkin olanlara bırakmasıdır. Köpek ırkları içinde minyatür ırk köpeklerin % 72.7'sinde en az bir tür *Capnocytophaga spp.* bulunduğu tespit edilmiştir, fakat bu sonuçlar tehlike olarak algılanmamıştır (Dilegge ve ark. 2011). Araştırmamızda elde edilen edilen *Capnocytophaga spp.* pozitiflik oranlarının yaşa göre dağılımı incelendiğinde *Capnocytophaga spp.* pozitif olarak saptanan 11 örneğin 10 (% 90.9)'unun 0-5 yaş grubu hayvanlardan, 1 (% 9.1)'inin ise 6 yaşlı bir hayvandan saptandığı belirlenmiştir. *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* pozitif örneklerin 8 (% 88.8)'inin 0-5 yaş grubu hayvanlardan, 1 (% 11.2)'inin ise 6 yaşlı bir hayvandan saptandığı belirlenmiştir. Sadece *Capnocytophaga canimorsus* pozitif olan 2 adet örneğin tamamı ise 0-5 yaş grubu hayvanlardan saptanmıştır. Bu veriler doğrultusunda da etkenin genç hayvanlarda daha çok görüldüğü ortaya çıkmaktadır.

Köpeklerin ağızlarında bakteri bulundurma sıklığının esas alındığı değişik çalışmalarda bu oranlar 50 köpek örneğinde % 8 (Bailie ve ark. 1978), 180 köpek örneğinde % 24 (Westwell ve ark. 1989), 90 köpek örneğinde % 25 (Blanche ve ark. 1998) ve % 41 (Gaastra ve Lipman 2010), 106 köpek örneğinde % 57 (Mally ve ark. 2009), 53 köpek örneğinde % 73 (van Dam ve ark. 2009) ve en son 325 köpek örneğinde % 74 (Suzuki ve ark. 2010) olarak tespit edilmiştir. Yapılan başka bir çalışma sonucuna göre (Dilegge ve ark. 2011) köpeklerin % 49.2'si bir *Capnocytophaga spp.* türünü barındırmakta ve istatistiklere göre bu oranlar ile cinsiyet (p değeri 0.046) ve kısırlık durumu (p değeri 0.046) arasında belirgin bağlantılar bulunmuştur. Erkek köpekler dişi köpeklerden biraz daha duyarlı olarak belirlenmiştir ve kısırlaştırılmış erkek ve dişi hayvanlar, fertil olan hayvanlara göre istatistiksel olarak *Capnocytophaga spp.* türünü taşımaya daha yatkın olarak rapor edilmiştir (Dilegge ve ark. 2011).

Çalışmamızda da *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* pozitif örneklerin 2 (% 22.2) adedi erkek hayvanlardan, 7 (% 78.2) adedi ise dişi hayvanlardan saptanmıştır. Sadece *Capnocytophaga canimorsus* pozitif olan 2 adet örneğin tamamı ise (% 100) dişi hayvanlardan saptanmıştır. Bu veriler doğrultusunda dişi hayvanların taşıyıcılık açısından daha duyarlı olduğu saptanmıştır.

Araştırmamızda ise 200 adet köpekten 11 adet *Capnocytophaga spp.* etkeni saptanmıştır. Muğla ili ve çevresindeki pet hayvanı olarak beslenen köpeklerde yapılan tez çalışmamız sonucunda *Capnocytophaga* etkenlerinin saptanmasının, etkenin zoonotik karakter taşıdığı göz önünde bulundurulduğu zaman, infeksiyonların oluşması için risk teşkil ettiği ortaya çıkmaktadır.

5. SONUÇ

Muğla ili ve çevresinde bulunan sahipli köpeklerde *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* türlerinin identifikasyonunun hedeflendiği bu tez çalışmasında, diş taşı bulunan köpeklerden alınan 200 adet oral svap örnekleri ile *CaL2*, *AS1*, *CaR* ve *CyR* genlerine spesifik primerlere dayalı olarak PCR metodu kullanılmıştır.

PCR çalışması, *CaL2-AS1* gen primerleri, ayrıca *CaR* ve *CyR* gen primerlerinin saptanması açısından iki ayrı aşamada yapılmıştır. 200 adet oral svap örneğinden 11 (%5.5) adedinde *CaL2-AS1* geni saptanmıştır ve bu örnekler *Capnocytophaga spp.* pozitif olarak belirlenmiştir.

CaR ve *CyR* spesifik primerleri kullanılarak gerçekleştirilen ikinci PCR sonrasında *Capnocytophaga spp.* pozitif olarak saptanan örneklerde *CaR* ve *CyR* gen taşıyıcılığı aranmıştır. İncelenen toplam 11 adet *Capnocytophaga spp.* pozitif örneğin 2 (% 18.2)'sinin sadece *CaR* geni açısından pozitif olduğu, 9 (% 81.8)'unun ise hem *CaR*, hem de *CyR* geni açısından pozitif olduğu tespit edilmiştir. Araştırma sonucunda, sadece *CyR* geni açısından pozitif olan örneğe ise rastlanmamıştır. Sadece *CaR* geni saptanan örnekler *Capnocytophaga canimorsus* pozitif, hem *CaR*, hem de *CyR* geni saptanan örnekler ise *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Araştırmamız sonucunda *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* pozitif örneklerin 2 (% 22.2) adedi erkek hayvanlardan, 7 (% 78.2) adedi ise dişi hayvanlardan saptanmıştır. Sadece *Capnocytophaga canimorsus* pozitif olan 2 adet örneğin tamamı ise (% 100) dişi hayvanlardan saptanmıştır.

Elde edilen pozitiflik oranlarının yaşa göre dağılımı incelendiğinde *Capnocytophaga* pozitif olarak saptanan 11 örneğin 10 (% 90.9) adedinin 0-5 yaş grubu hayvanlardan, 1 (% 9.1) adedinin ise 6 yaşlı bir hayvandan saptandığı belirlenmiştir. *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* pozitif örneklerin 8 (% 88.8) adedi 0-5 yaş grubu hayvanlardan, 1 (% 11.2) adedi ise 6 yaşlı bir hayvandan saptandığı belirlenmiştir. Sadece *Capnocytophaga canimorsus* pozitif olan 2 adet örneğin tamamı ise 0-5 yaş grubu hayvanlardan saptanmıştır.

İnsan sağlığı açısından da risk teşkil etmekte olan *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* türlerinin rutin teşhisinin zor olması, bu infeksiyoların göz ardı edilmesine yol açmıştır. Ülkemizde yaygın şekilde pet hayvanı olarak beslenen köpeklerin oral florasından bu etkenlerin izole edilmiş olması, hastalığın köpeklerden insanlara geçebileceğini göstermektedir. *Capnocytophaga* infeksiyonlarının, insanlarda menenjit, akut organ yetmezlikleri, intravasküler koagülopati, gibi ciddi vakalara yol açtığı düşünülürse etkenin zoonoz olduğu ortaya çıkmaktadır ve özellikle immun sistemi baskılanmış insanlarda, bu tarz infeksiyonlarda kullanılan antibiyotiklerin, diğer etkenleri baskılaması sonucu *Capnocytophaga* infeksiyonları meydana gelmektedir. Hastalık, ayrıca insanlara köpeklerden özellikle oral yolla ve öpme şeklinde bulaşabilmektedir.

Sonuç olarak bu tez çalışması, lkemizde *Capnocytophaga* infeksiyonlarının tanısı açısından Veteriner alanda yapılan ilk moleküler çalışmadır. Ülkemizde de zoonotik önemi olan *Capnocytophaga* infeksiyonları ile ilgili sağlıklı veriler elde edilebilmesi için, çalışmaların yaygınlaştırılması ve devam ettirilmesi önerilmektedir.

ÖZET

Köpeklerde *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* Türlerinin Kültür ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması

Her yıl dünya çapında milyonlarca insanın hayvanlar tarafından ısırıldığı rapor edilmektedir. Isırıkların %90'ı köpekler tarafından meydana getirilir ve bu ısırık yaralarının büyük çoğunluğuna tıbbi müdahale yapılmamaktadır. *Capnocytophaga* cinsi içerisinde bulunan *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* türleri, köpeklerin ağız boşluğunda komensal olarak yaşayan mikroorganizmalardır ve bazen insanlarda ölümcül sistemik infeksiyonlara neden olabilmektedir.

Bu tez çalışması ile köpeklerde oral florada görülen ve klinik tanısı rutin olarak konulamayan *Capnocytophaga* infeksiyonlarının tanıları *CaL2*, *AS1*, *CaR* ve *CyR* geni nükleotid sekansları kullanılarak yapılmıştır. Araştırmamızda Muğla ili ve çevresinde bulunan, diş taşı olan sahipli köpeklerden toplanan 200 adet oral swap örneği incelenmiş ve yapılan birinci PCR sonucunda 200 adet örneğin 11 (% 5.5)'inde *CaL2* ve *AS1* gen taşıyıcılığı saptanmıştır. İncelenen toplam 11 adet *Capnocytophaga spp.* pozitif örneğin 2 (% 18.2)'sinin sadece *CaR* geni açısından pozitif olduğu, 9 (% 81.8)'unun ise hem *CaR*, hem de *CyR* geni açısından pozitif olduğu tespit edilmiştir. Araştırma sonucunda, sadece *CyR* geni açısından pozitif olan örneğe ise rastlanmamıştır. Sadece *CaR* geni saptanan örnekler *Capnocytophaga canimorsus* pozitif, hem *CaR*, hem de *CyR* geni saptanan örnekler ise *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* pozitif olarak değerlendirilmiştir. *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* pozitif örneklerin 2 (% 22.2) adedi erkek hayvanlardan, 7 (% 78.2) adedi ise dişi hayvanlardan saptanmıştır. Sadece *Capnocytophaga canimorsus* pozitif olan 2 adet örneğin tamamı ise (% 100) dişi hayvanlardan saptanmıştır. Elde edilen pozitiflik oranlarının yaşa göre dağılımı incelendiğinde *Capnocytophaga spp.* pozitif olarak saptanan 11 örneğin 10 (% 90.9) adedinin 0-5 yaş grubu hayvanlardan, 1 (% 9.1) adedinin ise 6 yaşlı bir hayvandan saptandığı belirlenmiştir. *Capnocytophaga canimorsus* ve *Capnocytophaga cynodegmi* pozitif örneklerin 8 (% 88.8) adedi 0-5 yaş grubu hayvanlardan, 1 (% 11.2) adedi ise 6 yaşlı bir hayvandan saptandığı belirlenmiştir. Sadece *Capnocytophaga canimorsus* pozitif olan 2 adet örneğin tamamı ise 0-5 yaş grubu hayvanlardan saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Capnocytophaga canimorsus*, *Capnocytophaga cynodegmi*, köpek, identifikasyon, PCR

SUMMARY

Detection of *Capnocytophaga canimorsus* and *Capnocytophaga cynodegmi* in Dogs by Cultural and Molecular Methods

Every year, it is reported that millions of people are bitten by animals worldwide. 90 % of the bites are caused by dogs and there is no any special medical care for these bite wounds. *Capnocytophaga canimorsus* and *Capnocytophaga cynodegmi* species are microorganisms found in *Capnocytophaga* genus and grow commensally in oral flora of dogs. *Capnocytophaga canimorsus* may also cause mortal systemic infections in human

By this thesis work, the diagnosis of *Capnocytophaga* infections which could not made as routinely, was done by using *CaL2*, *AS*, *CaR* and *CyR* gene sequences. In our study, 200 oral swap samples which were taken from owned dogs which have dental plaque, were examined and in the end of first PCR, *CaL2* and *AS1* gene were detected from 11 (5.5 %) samples out of 200 samples. It is found that 2 (18.2 %) of the samples were positive for *CaR* gene and 9 (81.8 %) of the samples were positive for both *CaR* and *CyR* gene out of examined 11 *Capnocytophaga spp.* positive samples. As a result of this research, there was no any positive sample detected that is only positive for *CyR* gene. The samples that only *CaR* positive were evaluated as *Capnocytophaga canimorsus* positive, the samples that both *CaR* and *CyR* positive were evaluated as *Capnocytophaga canimorsus* and *Capnocytophaga cynodegmi* positive. 2 (22.2 %) of the *Capnocytophaga canimorsus* and *Capnocytophaga cynodegmi* positive samples were detected from male animals, 7 (78.2 %) of them were detected from female animals. The whole 2 (100 %) samples that are only *Capnocytophaga canimorsus* positive were detected from female animals. In the result of positivity range by age, 10 (90.9 %) of the samples were detected from 0-5 age animals, and 1 (9.1 %) of the samples were detected from 6 aged animal out of 11 *Capnocytophaga spp.* positive samples. 8 (88.8 %) of the samples were detected from 0-5 age animals, and 1 (11.2 %) of the sample were detected from 6 aged animal out of 9 *Capnocytophaga canimorsus* and *Capnocytophaga cynodegmi* positive samples. The whole 2 (100 %) samples that are only *Capnocytophaga canimorsus* positive were detected from 0-5 age animals.

Keywords: *Capnocytophaga canimorsus*, *Capnocytophaga cynodegmi*, dog, identification, PCR

KAYNAKLAR

- Aderem A.** Role of toll – like receptors in inflammatory response in macrophages. Crit Care Med. 2001, 29(7):16-18.
- Alugupalli KR, Kalfas S.** Degradation of lactoferrin by periodontitis associated bacteria. FEMS Microbiol Lett. 1996,145:209–14.
- Andersen HK, Pedersen M.** Infective endocarditis with involvement of the tricuspid valve due to *Capnocytophaga canimorsus*. Eur. J. Clin Microbiol. Infect. Dis. 1992, 11, 831-832.
- Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC.** TLR4 mutations are associates with endotoxin hyporesponsiveness in humans. Nat Genet 2000, 25:187-191.
- Bailie WE, Stowe EC, Schmitt AM,** Aerobic bacterial flora of oral and nasal fluids of canines with reference to bacteria associated with bites. J. Clin. Microbiol. 1978, 7, 223-231.
- Bilgrami S, Bergstrom SK, Peterson DE.** *Capnocytophaga* bacteremia in a patient with Hodgkin's disease following bone marrow transplantation: a case report and review. Clin Infect Dis; 1992, 14:1045–9.
- Blanche P, Bloch E, Sicard D.** *Capnocytophaga canimorsus* in the oral flora of dogs and cats. J. Infect. 1998, 36, 134.
- Bobo RA, Newton EJ.** A previously undescribed Gram-negative bacillus causing septicemia and meningitis. Am. J. Clin. Pathol. 1976; 65, 564–569.
- Bradford PA.** Extended spectrum beta-lactamases in the 21st century. Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Clin Micr Rev; 2001, 14: 933-51.
- Brenner DJ, DG Hollis, G R Fanning, RE Weaver.** *Capnocytophaga canimorsus* sp. nov. (formerly CDC group DF-2), a cause of septicemia following dog bite, and *C. cynodegmi* sp. nov. a cause of localized wound infection following dog bite. J. Clin. Microbiol. 1989, 27:231–235.
- Burnaugh AM, Frantz LJ, King SJ.** Growth of *Streptococcus pneumoniae* on human glycoconjugates is dependent upon the sequential activity of bacterial exoglycosidases. J Bacteriol. 2007, 190(1):221-30.
- Butler T, Weaver RE, Ramani TKV, Uyeda CT, Bobo RA, Ruy JS, Kohler RB.** Unidentified gram-negative rod infection. Ann. Intern. Med. 1977, 86, 1-5
- Campbell JR, Edwards MS.** *Capnocytophaga* species infections in children. Pediatr Infect Dis J; 1991, 10:944–8.
- Carpenter PD, Heppner BT, Gnann JW.** DF-2 bacteremia following cat bites, report of two cases. Am. J. Med. 1987, 82, 621-623.
- Chodosh J.** Cat's tooth keratitis: Human corneal infection with *Capnocytophaga canimorsus*. Cornea 2001, 20, 661-663.

Ciantar M, Newman HN, Wilson M, Spratt DA. Molecular identification of *Capnocytophaga* spp. via 16S rRNA PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. J. Clin. Microbiol. 2005, 43, 1894–1901.

Coyne MJ, Comstock LE. Niche-specific features of the intestinal Bacteroidales. J. Bacteriol. 2008, 190:736–742.

De Boer MGJ, Lambregts PCLA, van Dam AP, van 't Wout JW. Meningitis caused by *Capnocytophaga canimorsus*: when to expect the unexpected. Clin. Neurol. Neurosurg. 2007, 109, 393-398.

Dees SB, Powell J, Moss CW, Hollis DG, Weaver RE. Cellular fatty acid composition of organisms frequently associated with human infections resulting from dog bites: *Pasteurella multocida* and groups EF-4, IIj, M-5 and DF-2. J. Clin. Microbiol. 1981, 14, 612-616.

Dendle C, Looke D. Management of mammalian bites. Aust Fam Physician; 2009, 38 (11): 868-74.

Dendle C , Looke D. Review article:animal bites:anupdate for management with a focus on infections. Emergency Medicine Australasia; 2008, 20(6):458—67.

Deshmukh PM, Camp CJ, Rose FB, Narayanan S. *Capnocytophaga canimorsus* sepsis with purpura fulminans and symmetrical gangrene following a dog bite in a shelter employee. Am. J. Med. Sci. 2004, 327, 369-372.

Dilegge SK, Edgcomb VP, Leadbetter ER. Presence of the oral bacterium *Capnocytophaga canimorsus* in the tooth plaque of canines. Veterinary Microbiology 2011, 149;437–445.

De Smet MD, Chan CC, Nussenblatt RB, Palestine AG. *Capnocytophaga canimorsus* as the cause of a chronic corneal infection. Am. J. Ophtalmol. 1990 , 109, 240-242.

Fine DP, Colley DG, Sargent JS, Des Prez RM. C3 shunt activation in human serum chelated with EGTA. J. Immunol. 1972, 109:807–809.

Fischer LJ, Weyant RS, White EH, Quinn FD. Intracellular multiplication and toxic destruction of cultured macrophages by *Capnocytophaga canimorsus*. Infect. Immun. 1995, 63, 3484-3490.

Font RL, Jay V, Misra RP. *Capnocytophaga* keratitis. A clinicopathologic study of three patients, including electron microscopic observations. Ophthalmology. 1994, 101:1929–34.

Frandsen EV, Poulsen K, Kononen E, Kilian M. Diversity of *Capnocytophaga* species in children and description of *Capnocytophaga leadbetteri* sp. nov. and *Capnocytophaga* genospecies AHN8471. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008, 58:324–336.

Frieling JTM, Mulder JA, Hendriks T, Curfs J, van der Linden CJ, Sauerwein RW. Differential induction of pro- and anti-inflammatory cytokines in whole blood by bacteria: effects of antibiotic treatment. Antimicrob. Agents Chemother. 1997, 41, 1439-1443.

Gaastra W, Lipman LJ. *Capnocytophaga canimorsus*. Vet. Microbiol. 2010, 140, 339–346.

Geisler WM, Malhotra U, Stamm WE. Pneumonia and sepsis due to fluoroquinolone-resistant *Capnocytophaga gingivalis* after autologous stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant; 2001, 28:1171–3.

Gerster J, Dudler J. Cellulitis caused by *Capnocytophaga cynodegmi* associated with etanercept treatment in a patient with rheumatoid arthritis. Clinical Rheumatology. 2004, Volume 23, (6).

Glupczynski Y, Labbe M, Putz P. Ostéite à *Capnocytophaga ochracea*. Med Mal Infect. 1983, 13:94–6.

Godchaux III W, Leadbetter ER. *Capnocytophaga spp.* contain sulfonolipids that are novel in procaryotes. J. Bacteriol. 1980, 144: 592-602.

Godchaux III W, Leadbetter ER. Unusual sulfonolipids are characteristic of the Cytophaga-Flexibacter group. J. Bacteriol. 1983, 153: 1238-1246.

Goldstein EJC. Bite wounds and infection. Clin. Infect. Dis. 1992, 14, 633-638.

Goldstein EFC. Bites. In: Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R. (eds). Principles of Infectious Diseases, 6th edition, Churchill Livingstone, New York. pp. 2005, 3552-3556.

Griego RD, Rosen T, Orengo IF, Wolf JE. Dog, cat, and human bites: a review. J Am Acad Dermatol. Dec; 1995, 33(6):1019–1029.

Grosdent N, Maridonneau-Parini I, Sory MP, Cornelis GR. Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. Infect. Immun. 2002, 70:4165–4176.

Gür D. ESBL'lerin genel özellikleri ve ESBL tipleri. In: Ünal S, Vahaboğlu H, Leblebicioğlu H, Öztürk R, Köksal İ.(eds). Yeni ve yeniden gündeme gelen infeksiyonlar; Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi. 2004, 5-13.

Hager H, DeLasho G, Zenn R. Peripartum infections with *Capnocytophaga*. A case report. J Reprod Med; 1988, 33:657–60.

Handal T, Giraud-Morin C, Caugant DA. Chromosome and plasmid encoded beta-lactamases in *Capnocytophaga spp.* Antimicrob Agents Chemother; 2005, 49:3940–3.

Hawkey PM, Malnick H, Glover SAM. *Capnocytophaga ochracea* infection: two cases and a review of the published work. J Clin Pathol. 1984, 37:1066-1070.

Hawkey PM, Smith SD, Haynes J. In vitro susceptibility of capnocytophaga species to antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother. 1987,31: 331-332.

Hicklin H, Verghese A, Alvarez S. Dysgonic Fermenter 2 septicemia. Rev. Infect. Dis. 1987, 9:884–890.

Hinrichs JH, Dunkelberg WE. DF-2 septicemia after splenectomy: epidemiology and immunologic response, South Med J; 1980, 73(12):1638-40

Janda JM, Graves MH, Lindquist D, Probert WS. Diagnosing *Capnocytophaga canimorsus* infections. Emerg. Infect. Dis. 2006, 12, 340–342.

Jolivet-Gougeon A, Buffet A, Dupuy C. In vitro susceptibilities of *Capnocytophaga* isolates to beta-lactam antibiotics and beta-lactamase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000, 44:3186–8.

Kadam SK, Rehemtulla A. Cloning of rfaG, B, I, and J genes for glycosyltransferase enzymes for synthesis of the lipopolysaccharide core of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 1985, 161:277–284.

Kikuchi K, Ehara K, Miyasaka A, Koyama S, Yaguchi Y, Tamai K, Mitsui M, Notake S, Muramatsu K, Yanagisawa H, Kawakami Y. A rare case of bacteremia due to *Capnocytophaga canimorsus*. *Nippon Rinsho Biseibutsugaku Zasshi.* 2005, 15; 9–14.

Kim SJ, Kato T, Naito Y. B-cell mitogenicity and IL-1 beta production of lipopolysaccharides from various *Capnocytophaga* strains. *Bull Tokyo Dent Coll.* 1994, 35:79–83.

Kinder SA, Holt SC, Korman KS. Penicillin resistance in the subgingival microbiota associated with adult periodontitis. *J. Clin. Microbiol.* 1986, 23:1127-1133.

Kobayashi M, Okada M, Hino T. Clinical periodontal findings and microflora profiles in children with chronic neutropenia undersupervised oral hygiene. *J Periodontol.* 2001, 72:945–52.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Shchreckerberger PG, Winn WC. Color Atlas and Teret Book of Diagnostik Microbiology, Enteric Gram Negative Rods, Chapter 4, Fifth Edition, Lippincott, Philadelphia, Newyork. 1997, 196-199.

Koretke KK, Szczesny P, Gruber M, Lupas AN. Model structure of the prototypical non-fimbrial adhesin YadA of *Yersinia enterocolitica*. *J Struct Biol.* 2006, 155:154–161.

Kullberg BJ, Westendorp RG, van't Wout JW, Meinders AE. Purpura fulminans and symmetrical peripheral gangrene caused by *Capnocytophaga canimorsus* (formerly DF-2) septicemia a complication of dog bite. *Medicine (Baltimore).* 1991 Sep, 70(5):287–292.

Landercasper J, Cogbill TH, Strutt PJ, Landercasper BO. Trauma and the veterinarian. *J Trauma.* 1988, 28, 1255-1258.

Lavy E, Golani Y, Friedman M, Bdolah-Abram T, Steinberg D. Comparison of the distribution of oral cavity bacteria in various dog populations. *Isr. J. Vet. Med.* 2009, 64, 78–83.

Laughon BE, Syed SA, Loesche WJ. API ZYM system for identification of *Bacteroides* spp., *Capnocytophaga* spp., and spirochetes of oral origin. *J Clin Microbiol* 1982;15:97–102.

LeMoal G, Landron C, Grollier G, Robert R, Burucoa C. Meningitis due to *Capnocytophaga canimorsis* after receipt of a dog bite: case report and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 2003, 36, e42-e46.

Lion C, Escande F, Burdin JC. *Capnocytophaga canimorsus* infections in human: Review of the literature and cases report. *Eur. J. Epidemiol.* 1996, 12, 521-533.

Lutwick LI Infections in asplenic patients. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 2005, 6th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 3524.

MacBean CE, Taylor MDD, Ashby K. Animal and human bite injuries in Victoria. Med J Aust. 2007, 186 (1): 38-40.

Mally M, Paroz C, Shin H, Meyer S, Soussoula LV, Schmiediger U, Saillen-Paroz C, Cornelis GR. Prevalence of *Capnocytophaga canimorsus* in dogs and occurrence of potential virulence factors. Microbes Infect. 2009, 11, 509–514.

Mally M, Shin H, Paroz C, Landmann R, Cornelis GR. *Capnocytophaga canimorsus*: a human pathogen feeding at the surface of epithelial cells and phagocytes. PLoS Pathog. 2008, 4:e1000164. doi:10.1371/journal.ppat.1000164.

Mashimo PA, Yamamoto Y, Nakamura M, Slots J. Selective recover of oral *Capnocytophaga spp.* with sheep blood agar containing bacitracin and polymyxin B. J Clin Microbiol, 1983, 17: 187-191.

Maury S, Leblanc T, Rousselot P. Bacteremia due to *Capnocytophaga* species in patients with neutropenia: high frequency of lactamase-producing strains. Clin Infect Dis. 1999, 28:1172–4.

Medzhitov R, Janeway C. Innate immunity, N Engl J Med. 2000, 343 :338-344.

Meyer S, Shin H, Cornelis GR. *Capnocytophaga canimorsus* resists phagocytosis by macrophages and blocks the ability of macrophages to kill other bacteria. Immunobiology: 2008, 213(9-10):805-14.

Modlin RL, Brightbill HD, Godowski PJ. The toll of innate immunity on microbial pathogenes. N Engl J Med. 1999, 340:1834-1835

Mortensen JE, LeMaistre A, Moore DG. Peritonitis involving *Capnocytophaga ochracea*. Diagn Microbiol Infect Dis. 1985, 3:359–62.

Nachnani S, Scuteri A, Newman MG. E-test: a new technique for antimicrobial susceptibility testing for periodontal microorganisms. J Periodontol. 1992, 63:576–83.

Opal SM, Huber C. The toll-like receptors and their role in septic shock. Critical care. 2002, 6:125-136.

Pers C, Gahrn-Hansen B, Frederiksen W. *Capnocytophaga canimorsus* septicemia in Denmark, 1982-1995: review of 39 cases. Clin. Infect. Dis. 1996, 23, 71-75.

Phipps SE, Tamblyn DM, Badenoch PR. *Capnocytophaga canimorsus* endophthalmitis following cataract surgery. Clin. Experiment. Ophtal., 2002, 30, 375-377.

Piccininno G, Palliola E, Sala V. Clinical and anatomohistological features of experimental infection by DF-2 in rabbits. Path. Res. Pract. 1984, 179, 95-100.

Poltorak A, He X, Smirnova I. Defective signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. Science 1998, 282:2085-2088.

Ponte E, Tabaj D, Maglione M, Melato M. Diabetes mellitus and oral disease. Acta Diabetol; 2001, 38(2):57-62).

- Pugsley AP, Kornacker MG, Ryter A.** Analysis of the subcellular location of pullulanase produced by *Escherichia coli* carrying the *pulA* gene from *Klebsiella pneumoniae* strain UNF5023. *Mol Microbiol.* 1990, 4: 59–72.
- Roscoe DL, Zemcov SJV, Thornber D, Wise R, Clarke AM.** Antimicrobial susceptibilities and β -lactamase characterization of *Capnocytophaga* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992, 36, 2197–2200.
- Rosenau A, Cattier B, Gousset N.** *Capnocytophaga ochracea*: characterization of a plasmid-encoded extended-spectrum TEM-17 beta-lactamase in the phylum Flavobacter-bacteroides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000, 44:760–2.
- Rosenberg A, Schengrund CL.** Circulating sialyl compounds. In: *Biological Roles of Sialic Acid.* Rosenberg A., Schengrund S., (Eds), Plenum Publishing Corp., New York. 1976, 275–294.
- Rosenman JR, Reynolds JK, Kleiman MB.** *Capnocytophaga canimorsus* meningitis in a newborn: an avoidable infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2003, 22:204–5.
- Rummens J, Fossepre J, Groyter M.** Isolation of *Capnocytophaga* species with a new selective medium. *J Clin Microbiol.* 1985, 22 (3): 375–378, 1985.
- Rummens J, Gordts B, Van-Landuyt HW.** In vitro susceptibility of *Capnocytophaga* species to antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986, 30 (5): 739–742.
- Sabbatani S, Manfredi R, Frank G.** *Capnocytophaga spp.* brain abscess in an immunocompetent host: problems in antimicrobial chemotherapy and literature review. *J Chemother.* 2004, 16:497–501.
- Sandoe JA.** *Capnocytophaga canimorsus* endocarditis. *J Med Microbiol.* 2004, 53:245–8.
- Schauer R.** Chemistry, metabolism and biological functions of sialic acids. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* 1982, 40:131–234.
- Schauer R.** Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconj J.* 2000, 17: 485–499.
- Shin H, Mally M, Kuhn M, Paroz C, Cornelis GR** Escape from immune surveillance by *Capnocytophaga canimorsus*. *J Infect Dis.* 2007, 195: 375–386
- Shurin SB, Socransky SS, Swency E.** A neutrophil disorder induced by *Capnocytophaga* a dental microorganism. *New Eng J Med.* 1985, 301 (16): 849–854.
- Sowden D, Allworth A, Davis LB.** *Capnocytophaga canimorsus* sepsis: poor growth using an automated blood culture system. *Clin. Microbiol. Newslett.* 1995, 17, 94–96.
- Speck H, Kroppenstedt RM, Mannheim W.** Genomic relationships and species differentiation in the genus *Capnocytophaga*. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. (A).* 1987, 266, 390–402.
- Spelman DW.** Postsplenectomy overwhelming sepsis: reducing the risks, *Med J Aust.* 1996, 164(11):648.
- Stürenburg E, Mack D.** Extended spektrum beta lactamases: Implications for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. *J Infect.* 2003, 47: 279–95.

- Suzuki M, Kimura M, Imaoka K, Yamada A.** Prevalence of *Capnocytophaga canimorsus* and *Capnocytophaga cynodegmi* in dogs and cats determined by using a newly established species-specific PCR. *Veterinary Microbiology* 144. 2010,172–176
- Talan DA, Citron DM, Abrahamian FM, Gregory DM, Moran J, Goldstein EJC.** Bacteriologic analysis of infected dog and cat bites. *N. Engl. J. Med.* 1999, 340, 85-92.
- Tay JS, Chusid MJ, Dunne Jr WM.** *Capnocytophaga ochracea* pyonephrosis in an infant with obstructive nephropathy. *Pediatr Infect Dis.* 1985, 4:555–6.
- Tierney DM, Strauss LP, Sanchez JL.** *Capnocytophaga canimorsus* mycotic abdominal aortic aneurysm: why the mailman is afraid of dogs. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44, 649-651.
- Tobe TJ, Franssen CF, Zijlstra JG, De Jong PE, Stegeman CA.** Hemolytic uremic syndrome due to *Capnocytophaga canimorsus* bacteremia after a dog bite. *Am. J. Kidney Dis.* 1999, 33:e5.
- Underman AE.** Bite wounds inflicted by dogs and cats. *Vet. Clin. North Am.* 1987, 17: 195-207.
- Van Dam AP, van Weert A, Harmanus C, Hovius KE, Claas EC, Reubsaet FA.** Molecular characterization of *Capnocytophaga canimorsus* and other canine *Capnocytophaga spp.* and assessment by PCR of their frequencies in dogs. *J. Clin. Microbiol.* 2009, 47:3218–3225.
- Varki NM, Varki A.** Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab Invest.* 2007, 87:851–857.
- Von Itzstein M.** The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2007, 6: 967–974.
- Welthagen GF, Poirel L, Nordman P.** Ambler class A extended-spectrum B-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003, 45:183-9.
- Westwell AJ, Kerr K, Spencer MB, Hutchinson DN.** DF-2 infection. *BMJ.* 1989, 298,;116–117.
- Wilson ME, Jonak–Urbanczyk JT, Bronson PM.** *Capnocytophaga* species: Increased resistance of clinical isolates to serum bactericidal action. *J Infect Dis.* 1987, 156(1):99-106.
- Winn WC, Koneman EW.** Koneman's color atlas and text book of diagnostic microbiology, 6th edition. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins. 2006, 474-479.
- Winn RE, Chase WF, Lauderdale PW, McCleskey FK.** Septic arthritis involving *Capnocytophaga ochracea*. *J Clin Microbiol.* 1984, 19:538–40.
- Woestyn S, Allaoui SA, Wattiau P, Cornelis GR.** YscN, the putative energizer of the *Yersinia* Yop secretion machinery. *J. Bacteriol.* 1994, 176:1561-1569.
- Yamamoto T, Kajiura S, Hirai Y.** *Capnocytophaga haemolytica sp. nov.* and *Capnocytophaga granulosa sp. nov.*, from human dental plaque. *Int J Syst Bacteriol.* 1994, 44:324–9.

ÖZGEÇMİŞ

1981 Gölcük, KOCAELİ doğumluyum. İlk, orta ve lise eğitimimi Marmaris, MUĞLA'da tamamladım. Marmaris Sabancı Lisesi'nden 1998 yılında mezun olduktan sonra 2001 yılında Veteriner Fakültesi lisans eğitime başladım. 2006 yılında Veteriner Fakültesi'nden mezun olduktan sonra 2 yıl özel bir Veteriner Hastanesinde klinisyen hekim olarak çalıştım. 2009 yılından itibaren ise kendi kliniğimi açtıktan sonra serbest Veteriner Hekim olarak çalışmaya devam ettim. Aynı yıl içinde Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora programına başladım. Yabancı dil olarak İngilizce bilmekteyim.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesi ile bana destek olan danışman hocam Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Şükrü KIRKAN'a ve Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Osman KAYA' ya, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine, laboratuvar çalışmaları ve tez yazım aşamasında hep yanımda olan sınıf arkadaşım Araştırma Görevlisi Dr. Uğur PARIN'a, desteklerini gördüğüm Vet. Hekim Neşe UÇAN'a, pozitif kontrol DNA'ların tedarik edilmesini sağlayan Michio SUZUKI'ye, bugünlere gelmemde bana hep destek olan ve emeğini esirgemeyen canım annem ve babama sonsuz teşekkür ederim.