



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİK-YL-2015-0001

**SAĞLIKLI VE OTİTİS EXTERNALİ KÖPEKLERDEN
STAPHYLOCOCCUS PSEUDINTERMEDIUS İZOLASYONU
VE ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇLİLİĞİNİN
BELİRLENMESİ**

Duygu KOCATEPE

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Serap SAVAŞAN**

AYDIN-2015

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİK-YL-2015-0001

**SAĞLIKLI VE OTİTİS EXTERNALİ KÖPEKLERDEN
STAPHYLOCOCCUS PSEUDINTERMEDIUS İZOLASYONU
VE ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇLİLİĞİNİN
BELİRLENMESİ**

Duygu KOCATEPE

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Serap SAVAŞAN**

AYDIN-2015

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

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Duygu ÖZKAN (KOCATEPE) tarafından hazırlanan “SAĞLIKLI VE OTİTİS EXTERNALİ KÖPEKLERDEN *STAPHYLOCOCCUS PSEUDINTERMEDIUS* İZOLASYONU VE ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ” başlıklı tez, 04/12/2014 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi :

1- Prof. Dr. Şükrü KIRKAN

ADÜ, Veteriner Fakültesi

2- Prof. Dr. Ergün Ö. GÖKSOY

ADÜ, Veteriner Fakültesi

3- Doç. Dr. Serap SAVAŞAN

ADÜ, Veteriner Fakültesi

İmzası:


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

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN
Enstitü Müdürü

Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü 09100- AYDIN
Santral : (256) 218 20 00 Direkt Telefon : 218 20 44 Fax : (256) 218 20 44

ÖNSÖZ

Köpeklerde kulak hastalıkları yaygın ve inatçı bir problemdir. Yapılan araştırmalarda kliniğe getirilen hastaların yaklaşık %15'inde otitis olgusuna rastlandığı bildirilmiştir. Otitis eksterna terimi spesifik bir hastalıktan çok dış kulak kanalının inflamasyonunu ifade eder. Otitis eksternanın primer nedenleri yabancı cisim, hipersensitivite reaksiyonları (atopi, gıda allerjisi), paraziter hastalıklar ve metabolik hastalıklardır (primer keratinizasyon defektleri, hipotiroidizm, hiperadrenokortisizm). Proliferatif değişiklikler, aşırı temizlik ya da uygun olmayan temizleme ürünlerinin kullanımı kulak problemlerini hazırlayıcı faktörlerdir. Otitis eksterna *Malassezia pachydermatitis* gibi bir infeksiyon sebebiyle sekonder olarak da oluşabilmektedir. Son zamanlara kadar canine otitis eksterna ve canine pyoderma vakalarının çoğundan *Staphylococcus intermedius*'un sorumlu olduğu düşünülmekteydi. Son yıllarda PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) kullanılarak yapılan çalışmalar *Staphylococcus intermedius* olarak identifiye edilen izolatların aslında *S. intermedius*, *Staphylococcus pseudintermedius* ve *Staphylococcus delphini* olmak üzere üç farklı türden oluştuğunu göstermiştir ve *S. intermedius* grup (SIG) olarak adlandırılmıştır. Böylece canine pyoderma ve canine otitis eksternaların yaygın patojeninin aslında *S. intermedius* değil *S. pseudintermedius* olduğu ortaya çıkmıştır.

S. pseudintermedius fırsatçı patojendir. Kedi ve köpeklerde pyoderma, otitis eksterna, idrar yolu infeksiyonları ve postoperatif yara infeksiyonlarından sorumludur. Hayvanlarla kontakt halinde bulunan veteriner hekimlerden, klinik personelinden ve hayvan sahiplerinden de izole edilmiştir. İnsanlarda yalnızca kolonizasyon olabileceği gibi başta deri infeksiyonu olmak üzere fırsatçı infeksiyonlara da neden olabilmektedir. Genelde kliniklerde rutin olarak kullanılan antibiyotiklere dirençlidir. Zoonoz olması, görülme sıklığının giderek artması ve antibiyotiklere dirençliliği nedeniyle son yıllarda oldukça fazla araştırılmaktadır.

Araştırmamız, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından VTF-13045 nolu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY SAYFASI	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ÇİZELGELER	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	2
1.1.1. Otitis Eksterna	2
1.1.1.1. Etiyoloji	3
1.1.1.2 Klinik Belirtiler	5
1.1.1.3 Tanı	5
1.2. Otitis Eksterna’da Kulak Kanalıdan Sık İzole Edilen Bakteriyel Etkenler	7
1.2.1. <i>Pseudomonas spp.</i> Türleri	7
1.2.2. <i>Corynebacterium spp.</i> Türleri	8
1.2.3. <i>Escherichia coli</i>	9
1.2.4. <i>Klebsiella spp.</i> Türleri	10
1.2.5. <i>Proteus spp.</i> Türleri	11
1.2.6. Stafilokoklar	11
1.2.6.1. Genel Bilgiler	11
1.2.6.2. Tarihçe	12
1.2.6.3. Sınıflandırma	12
1.2.6.4. Morfolojik ve Kimyasal Özellikleri	13
1.2.6.4.1. Görünüm ve Boyanma	13
1.2.6.4.2. Üreme ve Kültür Özellikleri	14
1.2.6.4.3. Biyokimyasal Özellikleri	15
1.2.6.4.4. Genom Yapısı	15
1.2.6.5. Virulans ve Patojeniteleri	16
1.2.6.5.1. Hücre Duvarı	16
1.2.6.5.2. Kapsül	17

1.2.6.5.3. Yüzey Proteinleri	17
1.2.6.5.4. Toksinleri	17
1.2.6.5.4.1. Sitolitik Toksinler	18
1.2.6.5.4.2. Lökositin (Panton-Valentine Leukositin (PVL))	19
1.2.6.5.4.3. Enterotoksinler	19
1.2.6.5.4.4. Eksfoliyatif Toksin (Eksfoliyatin)	20
1.2.6.5.4.5. Toksik Şok Sendromu Toksini-1 (TSST-1)	20
1.2.6.5.5. Enzimleri	20
1.2.6.6. Patojenite	22
1.2.6.7. Epidemiyoloji	22
1.2.6.8. Stafilocokların Neden Olduğu İnfeksiyonlar	23
1.2.6.9. Otitis Eksterna Vakalarına neden olan Stafilocok Türleri	25
1.2.6.9.1. <i>S. aureus</i>	25
1.2.6.9.2. <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>Schleiferi</i> ve <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>Coagulans</i>	25
1.2.6.9.3. <i>S. intermedius</i>	25
1.2.6.9.4. <i>S. pseudintermedius</i>	26
1.3. İnsanlarda <i>S. pseudintermedius</i> 'un Zoonotik Önemi	29
1.4. Stafilocoklarda Metisilin, Mupirosin ve Vankomisin Dirençliliği	29
1.5. <i>S. pseudintermedius</i> 'un Moleküler Tanısı	33
1.5.1. Multiplex PCR	33
1.5.2. Multilokus Dizi Tipleme (Multilocus Sequence Typing, MLST)	34
1.5.3. PCR- Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)	35
2. GEREÇ VE YÖNTEM	36
2.1. Örneklerin Toplanması	36
2.2. Stafilocok Şüpheli Bakterilerin Belirlenmesi	36
2.3. <i>S. pseudintermedius</i> 'un PCR-RFLP Metoduyla İdentifikasyonu	37
2.3.1. Stafilocokal DNA Ekstraksiyonu	37
2.3.2. Primerler	37
2.3.3. Standart Suş	37
2.3.4. PCR Karışımı	37
2.3.5. Amplifikasyon Koşulları	37
2.3.6. RFLP	38
2.3.7. DNA Agaroz Jel Elektroforezi	38

2.4. Disk Difüzyon Metodu ile Antibiyotik Duyarlılığının Belirlenmesi	38
3. BULGULAR	39
3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	39
3.1.2. PCR-RFLP Sonuçları	40
3.2. Antibiyogram Sonuçları	40
4. TARTIŞMA	42
5. SONUÇ	45
ÖZET	46
SUMMARY	47
KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	55
TEŞEKKÜR	56

SİMGELER VE KISALTMALAR

CHIPS:	<i>S. aureus</i> 'un Kemotaksis İnhibitör Proteinini
CLSI:	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
CRF:	Koagulaz Aktifleştirici Faktör
Eap:	Ekstrasellüler Adherens Protein
Efb:	Ekstrasellüler Fibrinojen Bağlayıcı Protein
EHEC:	Enterohemorajik <i>E. coli</i>
EIEC:	Enteroinvaziv <i>E. coli</i>
EMB Agar:	Eosin Methylene Blue Agar
EPEC:	Enteropatojenik <i>E. coli</i>
ETEC:	Enterotoksijenik <i>E. coli</i>
FLIPr:	Formil Peptid Reseptör Benzeri İnhibitör Protein
ICD:	İmplant Kardiyoverter Defibrilatör
Ig:	İmmunoglobulin
IL:	İnterlökin
KNS:	Koagulaz Negatif Stafilokoklar
KPS:	Koagulaz Pozitif Stafilokoklar
Luk-I:	Leucotoksin-I
MLST:	Multilokus Gen Dizilimi
MRSA:	Metisilin Dirençli <i>S. aureus</i>
MSS:	Metisiline Hassas Stafilokok
PABA:	Para-amino Benzoik Asit
PBP2a:	Penisilin Bağlayan Protein
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCR-RFLP:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu- Kısıtlı Fragment Uzunluk Polimorfizmi
PTSAgs:	Pirojenik Toksin Süperantijenleri
PVL:	Panton-Valentine Lökosidin
SAK:	Stafilokinaz
SCC:	Stafilokokal Kaset Kromozomu
SCIN:	Stafilokokal Komplemant İnhibitörü
SIG:	<i>S. intermedius</i> grup

SPA:	Stafilokokal Protein A
SSSS:	Stafilokokal Haşlanmış Deri Sendromu
STSS:	Stafilokokal Toksik Şok Sendromu
TSI Agar:	Triple Sugar Iron Agar
TSST-1:	Toksik Şok Sendromu Toksin-1
XLD Agar:	Xylose Lysine Deoxycholate Agar

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 1.1.	Kulak akıntısı tipleri ve muhtemel nedenleri	7
Çizelge 1.2.	Stafilokok türlerinin sınıflandırılması	13
Çizelge 1.3.	<i>Koagulaz Pozitif Stafilokoklar</i> ve Klinik Önemleri	24
Çizelge 1.4.	Köpek ve kedilerden izole edilen <i>Koagulaz Pozitif Stafilokok</i> türlerinin fenotipik identifikasyonu	26
Çizelge 1.5.	<i>S. pseudintermedius</i> 'u diğer Stafilokoklardan ayıran özellikleri	28
Çizelge 3.1.	Sağlıklı ve otitis eksternalı köpeklerden izole edilen suşlarda identifikasyon bulguları	39
Çizelge 3.2.	<i>S. pseudintermedius</i> suşlarına ait antibiyotik duyarlılık testi sonuçları	41

1. GİRİŞ

Otitis eksterna kulak kanalı derisi ve kulağın ek yapılarının yangısı olarak ifade edilmektedir. Bu durum küçük hayvan kliniklerinde karşılaşılan en yaygın ve sinir bozucu problemdir. Otitis eksterna sıklıkla genel dermatolojik durumun klinik yansımasıdır. Otitis eksternanın sebebi genellikle multifaktöryeldir, problemin çözümü ve tekrarların önlenmesi için sistematik teşhis ve tedavi planı gerektirir (Sasaki ve ark 2005).

Micrococcaceae ailesinin üyesi olan Stafilokoklar, deri ve mukozalarda kolonize olabilen, memelilerin, kuşların ve sürüngenlerin normal flora üyeleridir. Fırsatçı patojen olmaları, hem insan hem de hayvanlarda önemli bir mortalite ve morbidite nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Hayvanlarda en fazla hastalık yapan Stafilokoklar; *Staphylococcus aureus*, *S. schleiferi*, *S. epidermidis*, *S. hyicus*, *S. xylosus*, *S. simulans* ve *S. intermedius* türleridir (Öztürk ve ark 2010, Bond ve Loeffler 2012, Udegbumam ve ark 2014). İnsanların deri ve mukozalarına yerleşen en yaygın Stafilokok; *S. aerus* ve *Koagulaz Negatif Stafilakok*lardır (Paul ve ark 2010).

Fenotipik olarak *Staphylococcus intermedius* olarak tanımlanan izolatlar *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* ve *S. delphini*'yi içeren üç farklı türden oluşmaktadır ve bu türler hep birlikte *S. intermedius* grup (SIG) olarak isimlendirilmiştir (Sareyyüpoğlu ve ark 2014). *Staphylococcus pseudintermedius* ilk kez 2005 yılında ayrı bir Stafilokok türü olarak tanımlanmıştır. Birbirine çok yakın olan *S. intermedius* ve *S. delphini*'den ilk olarak DNA-DNA hibridizasyonu ile ayırtedilmiştir. Şu anda SIG üyelerinin tür identifikasyonunda hızlı ve ekonomik bir alternatif olarak *kat* ve *pta* genlerinin PCR-restriction fragment length polimorfizm analizleri geliştirilmiş olsa da *sodA*, *hsp60*, *nuc* veya *kat* gen sekanslarıyla genotipleme metodu da kullanılmaktadır (Hariharan ve ark 2014). Köpeklerde ve kedilerde kolonize olan ve infeksiyonlara yol açan fırsatçı patojen SIG türü genellikle *S. intermedius*'tan ziyade *S. pseudintermedius*'tur (Sareyyüpoğlu ve ark 2014). Birkaç yıl öncesine kadar *S. intermedius*'un köpeklerin mikroflorasında bulunan bir fırsatçı patojen olduğu, köpek ve kedilerde pyoderma, yara infeksiyonları, otitis eksterna ve diğer doku infeksiyonlarına yol açtığı düşünülmekteydi (Morris ve ark 2006). Ancak Bannoehr ve arkadaşları (2009) ve Sasaki ve arkadaşlarının (2005) yaptığı iki bağımsız çalışma ile *S. intermedius*'un güvercinlerle bağlantılı olduğu, köpeklerden en

fazla izole edilen Stafilokokal türün ise *S. pseudintermedius* olduğu kanıtlanmıştır (Paul ve ark 2011). Sağlıklı köpeklerdeki *S. pseudintermedius* kolonizasyonu % 68' lere varan oranlardadır (Rubin ve ark 2011).

Normalde sağlıklı insanların mikroflorasında bulunmayan *S. pseudintermedius* zaman zaman özellikle petlerle yakın ilişkisi olan küçük hayvan veteriner hekimlerinde ve pet sahiplerinde oluşan ciddi infeksiyonlardan izole edilmiştir (Sareyyüpoğlu ve ark 2014). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, çalışmaya katılan 128 veteriner hekimden 5'inin köpek ve kedilerde ortaya çıkan metisilin dirençli *S. pseudintermedius* (MRSP) klonu taşıdığı tesbit edilmiştir. Bu çalışmayla MRSP'nin daha önceki çalışmalarda söylendiği gibi sadece petler arasında değil veteriner hekimler arasında da yaygınlaştığı görülmüştür. Çoklu ilaç direnci bakımından metisilin dirençli *S. pseudintermedius*'un metisilin dirençli *S. aureus*'tan daha dirençli olduğu bulunmuştur (Paul ve ark 2011). *S. pseudintermedius*'un infekte veya kolonize petlerden insanlara geçmesi ve antimikrobiyal dirençliliğin artması halk sağlığını tehdit etmektedir (Sareyyüpoğlu ve ark 2014).

Bu tez çalışması, son dönemlerde insanlarda ve hayvanlarda sıklıkla rastlanan ve antibiyotiklere dirençliliği nedeniyle problem oluşturan *S. pseudintermedius*'un otitis eksternalarda varlığının ortaya konması ve antibiyotik dirençliliğinin belirlenmesi açısından önemlidir.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. Otitis Eksterna

Dış kulak kanalı, kanalın açık tutulabilmesi için destek görevi yapan kıkırdak ve kıkırdağı kaplayan deriden meydana gelir. Kulak kıkırdağı; kulak kepçesi ve kulak kanalının dikey açısı için iskeleti oluşturur ayrıca dairesel kıkırdak dış kulak kanalının yatay bölümünü destekler. Dış kulak kanalı yağ bezleri, apokrin bezleri ve kıl folikülleri içeren çok katlı yassı epitel ile kaplıdır. Direkt epitel katının altında çok sayıda yağ bezleri bulunur. Apokrin bezler daha derinde, koryumda bulunur. Normal serumenin bu iki bezin salgısından meydana geldiği kabul edilmektedir. Yangı durumlarında apokrin bezler kistik hale gelir ve sekresyonları görülebilir derecede artar (Griffin 2009).

Dış kulak kanalı derisinin akut ya da kronik yangısına otitis eksterna denir. Kedi ve köpeklerin dış kulak yolunda görülen en yaygın hastalıktır. Köpeklerde rastlanma oranı çok yüksektir, kedilerde daha az rastlanır. Köpeklerde rapor edilen otitis eksterna prevalansı popülasyonun %10'u ile %20'si arasında değişirken kedilerde otitis eksterna prevalansı %2 ile %10 arasındadır ve genellikle paraziter kaynaklıdır. Köpeklerde kulak kepçesinin ve dış kulak kanalının farklı anatomik yapılarda olması otitis eksternayı predispoze kılar (Griffin 2009).

1.1.1.1. Etiyoloji

Otitis eksterna komplike ve multifaktöryel bir hastalıktır. Nedenlerini primer nedenler, sekonder nedenler, predispoze faktörler ve devamını sağlayan faktörler olarak sınıflandırmak mümkündür (Griffin 2009).

Predispoze faktörler otitis eksterna oluşma riskini artıran faktörlerdir.

İrk özellikleri: Olguların yaklaşık %80'ini uzun kulaklı ırklar, özellikle Cocker Spaniel, Poodle, Terrier, Labrador Retriever, Alman Çoban Köpeği ve Kangal Çoban Köpeği ile kulak yolunda çok fazla kılları olan ırklar oluşturur. Dış kulak kanalı deliğinin kulak kepçesi tarafından örtülmesi, dış kulak kanalının çok fazla kıllarla örtülmesi hava akımını engelleyerek infeksiyon oluşumunu kolaylaştırır (Griffin 2009).

Anatomik yapı: Köpeklerde dış kulak kanalının açısı oluşturacak şekilde 'L' harfi gibi dirseklenme göstermesi ve bu bölgenin dar olması, biriken toz ve kulak sekresyonlarının dışarı atılmasını olanaksız kılar (Griffin 2009).

Su ve soğukluk etkisi: Dış kulak yoluna suyun girmesi çoğunlukla yüzmeyi seven köpeklerde yüzme sırasında, banyo yaptırılması sırasında ve av köpeklerinde olduğu gibi avı yakalamak için nehre ya da göle girmesi sırasında oluşmaktadır. Özellikle sabunlu sular dış kulak yolunun asit ortamını bakterilerin üreyebileceği şekilde nötralize eder ve kulak yolu derisinin epitelini bozabilir. Sürekli nem mikroorganizmaların üremesi için uygun bir ortam oluşturur. Üşütme ve cereyanda kalma sonucu soğuk hava akımı dış kulak kanalını etkileyerek kataral bir yangı oluşturur (Griffin 2009).

Yaş: Otitis eksterna olgularının çoğu 5-8 yaşlarında ortaya çıkmaktadır.

Travmatik etkiler: Sık sık otların arasında dolaşan köpeklerde delici özelliği olan pisipisi otu başakçıkları ya da kum, toz, toprak gibi diğer yabancı cisimler kulak kanalına kolaylıkla girerler ve otitisleri oluştururlar. Kulak kanalına konsantre ilaç uygulandığında dış kulak kanalı epitellerini ve kulak zarını etkileyerek otitisin oluşumuna yardımcı olur. Kulak kanalının temizlenmesi sırasında portecotonun zorlayarak ilerletilmesi ya da otoskopi sırasında normalinden daha kalın bir spekulum uygulanması sonucu oluşabilecek yaralanmalar otitisin travmatik nedenlerini oluştururlar (Griffin 2009).

Kulak kanalının kirliliği: Özellikle kulak kanalı uzun kıllarla örtülü olan köpeklerde kulak kanalına giren toz, toprak, kum gibi yabancı cisimler bu kıllar tarafından tutulurlar. Bu duruma kulak kanalı derisi bezlerinden salgılanan ve serumen adı verilen salgının da karışmasıyla kulak kiri oluşur. Kirlerin kulak kanalında birikmesi kulak kanalını tıkararak ventilasyonu engeller ve kulak kanalının sürekli nemli kalmasına neden olur. Kulak kiri irkiltiye neden olarak bölgeyi mikroorganizmalara duyarlı kılar ve otitis oluşur (Griffin 2009).

Tümörler ve polipler: Özellikle kedilerde gözlenir.

Primer nedenler direkt olarak otitis eksternaya sebep olan etkenlerdir. Bunlar arasında otoimmün hastalıklar, allerjik dermatitis, hipersensitivite reaksiyonları, köpek gençlik hastalığı, *Otodectes cynotis* gibi paraziter hastalıklar sayılabilir (Griffin 2009).

Devam ettirici nedenler otitis eksterna sonucu oluşan ödem, hiperplazi, stenozis gibi yangısal ve patolojik cevaplardır. Hastalığın iyileşmesini engellerler (Griffin 2009).

Sekonder nedenler genellikle çeşitli türden bakterilerdir. Bakterilerin çoğu kulak kanalında saprofit olarak bulunur ancak patojen olanları da vardır. Sağlıklı bir köpeğin kulak kanalında en sık rastlanan mikroorganizmalar *Staphylococcus spp.* (koagulaz pozitif) ve *Malassezia pachydermatitis*'tir. Kulağın normal florasında koagulaz pozitif, koagulaz negatif *Staphylococcus spp.*, β -hemolitik *Streptococcus spp.*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* bakterileri bulunur (Griffin 2009). Yapılan

çeşitli çalışmalarda, sağlıklı köpeklerin kulak kanalından *Pasteurella multocida* bakterisinin de izole edilebileceği bildirilmiştir. Bu bakterilerden başka *Malassezia pachydermatitis*, *Microsporum canis* ve *Otodectes cynoti* de klinik belirtiler vermeden hastalık etkeni olarak izole edilebilmektedir. Otitis eksterna vakalarında en sık izole edilen bakteriyel etkenler ise: *S. intermedius*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella spp.*, *Bacillus spp.*, *Serratia spp.*, *Corynebacterium spp.* ve *E. coli*'dir. Özellikle kronik infeksiyonlarda *Proteus spp.* ve *Pseudomonas spp.*'ye daha sık rastlanır. Bu nedenle söz konusu bakteriler ve mayalar otitis eksterna vakalarına yol açan fırsatçı patojenler olarak değerlendirilmektedirler. Otitis olgularının çoğunda birden fazla etken izole edilebilmektedir. Kulak kanalında yetersiz hava sirkülasyonu bakteriyel enfeksiyonlara predispozisyon yaratır (Petrov ve ark 2013).

1.1.1.2 Klinik belirtiler

Otitis eksterna tek ya da çift taraflı görülebilir. En çok gözlenen klinik belirtiler kafa sallama ve kaşıntıdır. Baş, hasta kulak tarafına eğik tutulur. Dokunulduğunda ağrılıdır, ağlama ya da sızlanma sesi çıkarabilir. Huzursuzdur. Koku ve kulak akıntısı oluşur (Petrov ve ark 2013). Erken devredeki lokal bulguları eritem ve örtücü epitelin şişkinliğidir. Burada hipersensitivite reaksiyonu ya da bir irritasyona karşı reaksiyon söz konusudur. Bölgede akut nemli dermatitis gelişebilir. Hassas deri kolayca yaralanabilir, ülserleşebilir ve sekonder infeksiyona karşı duyarlıdır. Purulent ya da kanlı bir eksudat oluşur. Eğer infeksiyon uzun süre devam ederse kulak kanalı derisi kalınlaşır ve hiperplastik bir hal alır. Karnabahar tarzı üremeler ya da kıkırdakta kemikleşmeler oluşabilir. Bu oluşumlar kulak kanalını daraltır ve tıkayabilir. Bu durumlarda işitme azalır ya da tamamen engellenir (Griffin 2009).

1.1.1.3 Tanı

Otitis eksternanın teşhisi ve klinik olarak idaresi genellikle moral bozucudur çünkü otitis oluşumuna zemin hazırlayan pek çok faktör veya hastalık ve süreci hızlandırıp şiddetlendiren birçok sekonder patojen vardır. Otitis eksternaya sebep olan geniş bir faktör yelpazesi olduğundan tanı için sistematik bir yaklaşım gerekir. Kulağa yaklaşım 20 yıl önce muayene et ve sadece kulağı tedavi et şeklindeydi. Şimdiki yaklaşım ise kulak kanalının derinin özel bir parçası olarak bilinmesine dayanarak farklılaşmıştır. Otitis eksterna şimdi dermatolojik bir durum olarak düşünülmektedir. Otitis eksterna yalnızca

kulak kanalının bir hastalığı değil genel dermatolojik durumun yansıması olarak ortaya çıkan bir sendromdur (Griffin 2009).

Sendromun tanısı kolaydır. Değişen derecelerde kafa sallama, kaşıntı, ağrı, koku ve kulak akıntısı ile farkedilebilir. Kaşıntıya bağlı olarak othematom oluşabilir. Otitisin tanısında önemli olan primer sebebi saptamak, sekonder ve devam ettirici faktörleri belirlemektir. Ancak hangi sıklıkla bir spesifik primer tanı yapılabildiğini belirlemek data azlığı nedeniyle zordur. Bir çalışmada 12 kronik proliferatif *Pseudomonas sp.* kaynaklı otitisten 8'inde primer sebep belirlenebilmiştir. Primer nedeni bulmak kronik ve tekrarlayan otitislerde oldukça önemlidir (Griffin 2009).

Bütün vakalarda yaklaşım; genel ve dermatolojik anamnez, fiziksel ve dermatolojik muayene, otoskopi, sitoloji, kültür ve sensitivite testi şeklinde olmalıdır. Tüm vakalarda önemli noktaları kaçırmamak adına standart bir dermatolojik anket kullanılabilir. Otoskopide kulak kanalının çapı, eksudatın miktarı ve tipi, ülser oluşumu, yabancı cisimler, parazitler, tümörler ve kulak zarının durumu görülebilir. Sitoloji kulak kanalından alınan svap örneğinin lam üzerinde yağla muamele edilerek incelenmesi ve ayrıca hazırlanan preparatların boyanıp incelenmesine dayanır. Sitolojik muayene ile parazit, maya, bakteri, yangısal ve neoplastik hücreler görülebilir. Ancak normal kulak kanalında da mikroorganizmalar bulunduğu için sitolojide görülen bakterilerin normal mi yoksa anormal mi olduğunu anlamak güçtür. Yangısal hücrelerin özellikle de fagositik hücrelerin varlığı kuşku ortadan kaldırır ancak her zaman, özellikle de *Malassezia* infeksiyonlarında, otitislerde yangısal hücre görülmeyebilir. Otitis eksternalı kulaklardan alınan örneklerde bulunan bakterilerin miktarı, maya-bakteri oranları da tanıya yardımcı olur. Genel bir prensip olarak sağlıklı kulak kanalında birkaç keratin hücresi, az sayıda *Malassezia* (10x40 büyütmede, sahada <10) ve kok ve hiç ya da nadiren yangısal hücre görülür. Çok sayıda *Malassezia* ve/veya kok, rodlar, mantar hifaları, ektoparazitler, neoplastik hücreler ve yangı hücreleri ise anormaldir. Sitolojide tek tip gram negatif bakteri veya çubuk şekilli bakteri popülasyonuna rastlandığında, kulak kanalında ülser varlığında, antimikrobiyal tedaviye cevap alınamadığında, kronik ve tekrarlayan infeksiyonlarda kültür ve sensitivite testine başvurulur (Jacobson 2002).

Çizelge 1.1. Kulak akıntısı tipleri ve muhtemel nedenleri (Jacobson 2002)

Akıntının Tipi	Şüpheli Etken
Bol koyu kahverengi, yapışkan, tatlı kokulu	<i>M. pachydermatitis</i> enfeksiyonu
Koyu kahverengi-siyah, kahve telvesi gibi	<i>O. cynotis</i> enfeksiyonu
Koyu sarı-açık kahverengi, kremi	Gram pozitif kok
Şiddetli, tatlı kokulu, yağlı, sarı-taba (seruminöz otitis)	Sebore, atopi, endokrinopati gibi non-infeksiyöz
Açık sarı, ince, tatlı kokulu, peynirimsi	Gram negatif basil

1.2. Otitis Eksterna’da kulak Kanalından Sık İzole Edilen Bakteriyel Etkenler

1.2.1. *Pseudomonas spp.* Türleri

Pseudomonas aeruginosa insan ve hayvanlarda irinli, nadiren sistemik enfeksiyon oluşturan fırsatçı patojen bir mikroorganizmadır (Cengiz 1999). Gram negatif, 1,5-3 µ boyutlarında, zorunlu aerobik, çomak şekilli, karbonhidratları okside edebilen bir bakteri türüdür. İzolatlarının çoğu katalaz ve oksidaz pozitifdir. Sahip oldukları bir veya daha fazla polar flagellalar yardımı ile aktif hareket edebilmektedirler. Sporsuz ve genellikle kapsülsüz olan etkenin bazı suşlarında kapsül varlığı saptanmıştır (Aydın ve ark 2006).

Genel besiyerlerinde: 37°C’de 1 gün içinde oluşan koloniler; içerdiği piyosiyonin pigmentinden dolayı mavi renkli ve tipik üzüksü meyve kokusundadır. Koyun Kanlı Agarda; hemoliz, metalik parlaklık, MacConkey Agarda; yeşilimsi-mavi renkte büyük, laktoz negatif, Brilliant Green ve XLD Agarda; kırmızı koloniler oluşması ve TSI Agarda herhangi bir değişiklik olmaması, *P. aeruginosa* yönünden olumlu reaksiyonlardır (Aydın ve ark 2006).

P. aeruginosa suşlarının, proteolizise duyarlı S-tipi ve proteolizise dirençli R-tipi olmak üzere iki adet bakteriyosini bulunmaktadır. Bunun diğer suşları öldürücü etkisi vardır. *P. aeruginosa* ekzotoksin, enterotoksin, endotoksin, proteaz, elastaz ve hemolizin gibi çok sayıda ekstrasellüler maddeler sentezleyebilmektedir (Aydın ve ark 2006).

P. aeruginosa sağlıklı hayvanların deri, mukoz membran, barsaklarında; su, toprak, lağım ve musluklarda bulunur. Fırsatçı patojendir, direnç düştüğünde ve vücut bariyeri bozulduğunda hastalık meydana gelir. Etken invazivdir, toksijeniktir ve potansiyel virulans

faktörleri mevcuttur. Köpek ve kedilerde dış kulak yangısı, üriner sistem infeksiyonu, pnömoni, ülseratif keratitis ve dermatitis şekillenir. Koyunlarda; Yeşil Yün (yapağı çürüğü) Hastalığı, mastitis, pnömoni, akciğer ve beyin apsesi, sığırlarda; mastitis, sistemik infeksiyonlar ve infertilite, atlarda; metritis, infertilite, abortus, korneal ülser, taylarda; ishal, mink ve çinçillalarda hemorajik pnömoni, domuzlarda nekrotik pnömoni, papağanlarda sistemik infeksiyonlar, konjunktivitis ve rhinitise neden olmaktadır (Cengiz 1999). Çoğunlukla köpeklerin kronik, ülseratif ve proliferatif otitis eksternalarından sorumludur. Özellikle etkenin proteolitik enzimlerinden elastazlar, otitis eksterna olgularında doku hasarı sonucu lezyonların şiddetlenmesine neden olmaktadır (Jacobson 2002).

Kumar ve ark (2002) yapmış oldukları bir çalışmada 200 otitis eksternalı köpeğe ait izolatlardan, *P. aeruginosa*'nın 101 suşta yer aldığını bildirmişlerdir. Chaudhary ve ark (2003) yapmış oldukları benzer bir çalışmada, 59 suş içinde söz konusu bakterinin 11.43 oranında olduğunu rapor etmişlerdir. Ahmed (2000)'in yapmış olduğu bir çalışmada ise bu oranın 10 olduğu bildirilmiştir. Oliveira ve ark (2005) ise çalışmalarında *P. aeruginosa* türünün diğer türlere göre en fazla izole ettikleri etken olduğunu rapor etmişlerdir.

1.2.2. *Corynebacterium* spp. Türleri

Korinebakteriler gram pozitif, 2-6 mikrometre boyutlarında, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz, pleomorfik (çomak-kokoid), preparatlarda çin harfleri gibi ya da X, V, Y formlarındadır. Çevre koşullarına bağlı olarak uzunlukları ve şekilleri değişiklik gösterir. Genellikle fakültatif anaerobtur, *C. diphtheria* aerobtur. Glukoz, galaktoz, maltoz ve mannozu gaz oluşturmaksızın fermente eder, katalaz ve üreaz aktiviteleri pozitifdir (Muckle ve ark 1992).

Korinebakteriler zenginleştirilmiş besi yerinde bile yavaş ürerler. Üremeleri için biotine ihtiyaç duyarlar, bazı türlerinin thiamin ve PABA (Para-amino Benzoik Asit) ihtiyaçları da vardır. Loeffler's Medium, Kanlı Agar ve Trypticase Soy Agarda (TSA) ürerler. Granüler görümlü, genelde şeffaf, ortası opak, konveks, düzgün kenarlı gri küçük koloniler oluştururlar. Loeffler's Mediumda sarımsı-beyaz koloniler oluşur. TSA'da ortası siyah yeşil koloniler oluşturabilirler (Muckle ve ark 1992).

Korinebakteri türleri genelde doğada; toprak, su, bitkiler ve gıdalarda bulunur. Nondifteroid Korinebakteri türleri insan ve hayvanların normal mukoza ve deri florasında bile bulunabilir. Birçoğu fırsatçı patojendir. İrinli infeksiyonlara sebep olurlar. İnsanlarda en fazla karşılaşılan patojen tür *C. diphteriae*'dir. Difteri toksini üretme yeteneği kazanabilmesi için bakteriofajla aktive olması gerekir. Hayvanlarda en sık görülen patojen türler ise *C. bovis*, *C. renale* ve *C. pseudotuberculosis*'tir (Yassin 2003).

C. pseudotuberculosis (ovis) koyun ve keçilerde Kazeöz Lenfadenitis'e atlarda Ülseratif Lenfangitis'e ve Kontagiyöz Akne'ye neden olur. *C. renale*, *C. pilosum* ve *C. cystitidis* sığır, at, koyun, keçi, domuz, köpek ve tavşanlarda üretrit ve pyelonefrit oluşturur (Cengiz 1999).

Lipid tabakasıyla birlikte salgılanan ekzotoksin (Fosfolipaz-D), Korinebakterilerin virulans faktörleridir (Pepin ve ark 1991). Protein yapıda olan ekzotoksin daha çok bakterinin hücre duvarında sentezlenip, damar permeabilitesinin artmasına neden olmaktadır. Köpeklerde otitis eksterna hastalığına yol açmaları durumunda da kulaktan irinli akıntılarının gelmesine sebep olmaktadır (Aydın ve ark 2006).

Yoshida ve ark (2002)'nin yapmış oldukları çalışmada 110 otitis eksternalı köpeğe ait suşlardan yalnızca 18 tanesinde *Corynebacterium spp.* saptamışlardır. Sarierler ve Kırkan (2004) ise 234 otitis eksternalı izolatta söz konusu bakterinin 6.42 oranında bulunduğunu belirtmişlerdir. Yapılan diğer çalışmalarda ise *Corynebacterium spp.* otitis eksternalı köpeklerden izole edilen toplam suşların yalnızca bir tanesinde gözlemlenmiştir (Ducha ve ark 1981, Akay ve ark 1984, Janer ve Castro 1984, Kihyang ve ark 1999).

1.2.3. *Escherichia coli*

Enterobacteriaceae ailesinin genel özelliklerini taşır. Gram negatif, çomak şekilli, 2-6 µm boyutlarında, sporsuz, aerob ya da fakültatif anaerob bir bakteridir. Peritrik flagellaya sahip olduklarından hareketlidirler ancak hareketsiz türleri de bulunmaktadır. Genel besiyerinde kolayca ürer, kanlı agarda bazı suşları hemoliz oluşturur. Kanlı Agar, Nutrient Agar ve *Enterobacteriaceae* türleri için diferensiyel ve selektif olan besiyerlerinde (MacConkey, EMB) 37°C'de 24 saat içinde gözle görülebilmektedir. S tipi koloniler oluşturur. Sıvı besiyerlerinde ise homojen bulanıklık meydana getirerek üremektedir. *E.*

coli; laktoz, mannitol, glukozu asit ve gaz oluşturarak fermente etmektedir. MacConkey Agarda pembe renkli koloniler, EMB Agarda ise metalik yeşil refleli koloniler oluşturmaktadır (Cengiz 1999).

Normal barsak flora etkeni olan *E. coli*'ler dışkı ile çevreye yayılmaktadır. Bulaşmaları fekal-oral yol ile olmaktadır. *E. coli* doğa koşullarında (su, dışkı, barınaklarda) aylarca canlı kalabilir. Bazı dezenfektanlara (fenol, kresol) ve ısıya dirençlidir. 'O' somatik antijeni, 'H' flagellar antijeni, 'K' kapsüler antijeni ve 'F' fimbrial (pilus) antijenine sahiptir. Pilus antijenleri barsak epiteline ve diğer vücut bölgelerine tutunmayı sağladığı için önemlidir ve *E. coli*'lerin virulans faktörü olarak kabul edilirler. Patojenik *E. coli* suşları barsak infeksiyonları ve yeni doğanların hızlı gelişen septisemilerinden sorumludur. *E.coli*'nin patotipleri: Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), Enteropatojenik *E. coli* (EPEC), Enterohemorajik *E. coli* (EHEC), Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC)'dir. Enterotoksijenik ishaller yenidoğan kuzu, buzağı, tay, domuz ve köpeklerde meydana gelmektedir. ETEC'lerin enterositlere bağlanması, sahip oldukları kapsüler K antijeni ve fimbrial antijenleri (F) sayesinde olmaktadır. EPEC'ler toksin üretmezler ancak barsakta tipik lezyonlara yol açmaktadır. EHEC suşları ise kanlı ishalleri neden olmaktadır. EHEC prototipi *E. coli* O157:H7'dir (Keskin ve ark 1999). Nonpatojen suşlar ise meme, uterus ve diğer vücut bölgelerinde fırsatçı infeksiyonlara neden olurlar (Cengiz 1999).

E. coli'nin köpeklerde otitis eksterna, koliseptisemisi, pyometra ve üriner sistem infeksiyonlarına neden olduğu bilinmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda 81 ve 234 otitisli köpekten izole edilen suşlarda sırasıyla 2.4 ve 1.28 oranlarında *E. coli* türü izole edildiği bildirilmiştir (Keskin ve ark 1999, Sarıerler ve ark 2004).

1.2.4. *Klebsiella spp.* Türleri

Enterobacteriaceae familyasından, gram negatif, hareketsiz, çoğunlukla kapsüllü, çubuk şeklinde, lizin dekarboksilaz üreten fakat ornitin dekarboksilaz üretmeyen ve genellikle Voges-Proskauer testi pozitif olan bir bakteridir (Aydın ve ark 2006). *K. pneumoniae* normalde su, toprak ve bitkilerde; insan ve hayvanların normal ağız, deri ve barsak florasında bulunur. Fırsatçı patojendir. Başta akciğer, üriner sistem ve hastane infeksiyonları olmak üzere fırsatçı infeksiyonlardan sorumludur (Kihyang ve ark 1999).

Yapılan çeşitli araştırmalarda *Klebsiella* türlerinin otitis eksterna vakalarına yol açtığı rapor edilmiştir. Çeşitli araştırmacılar *K. ozanae* ve *K. pneumoniae* türlerini 234 otitis eksternalı köpekten 2.56 oranında, *Klebsiella sp.* türünü ise yalnızca bir suşta izole ettiklerini bildirmişlerdir (Kihyang ve ark 1999, Chaudhary ve ark 2003, Sarierler ve ark 2004).

1.2.5. *Proteus spp.* Türleri

Proteus türleri *Enterobacteriaceae* ailesinden gram negatif, hareketli, aerobik çomak şekilli bakterilerdir. Üreaz pozitif ve sıvı besi yerinde hareket etmesini sağlayan periferik kırpıkları vardır. Kanlı agarda hemoliz meydana getirmezler, üreaz pozitif ve laktozu fermente etmezler. En önemli türleri, *P. mirabilis*, *P. vulgaris* ve *P. penneri*'dir. İnsan ve hayvanların normal barsak florasında ve kirli sularda bulunurlar. Fırsatçı patojendir. Özellikle üriner sistem olmak üzere vücudun çeşitli yerlerinde infeksiyonlara sebep olurlar (Abbott 2007).

Yapılan çeşitli araştırmalarda *Proteus spp.* türlerinin otitis eksterna vakalarına yol açtığı gözlemlenmiştir. Araştırmacılar otitis eksternalı köpeklere ilişkin izolatlarda sırasıyla: 200 örnekte 12.87, 20 örnekte 10.59, 100 örnekte 24.29, 15 örnekte 4.76 ve 35 örnekte 6 suşun *Proteus sp.*'ye ait olduğunu bildirmişlerdir (Kumar ve ark 2002, Vikas ve ark 2003, Chaudhary ve ark 2003, Nair 2004).

1.2.6. Stafilokoklar

1.2.6.1. Genel Bilgiler

Stafilokoklar *Micrococcaceae* ailesinden, fakültatif anaerobik, gram pozitif koklardır. Genellikle deri ve mukoz membranların zararsız kommensalleridir ancak insanlar ve diğer pek çok hayvan çeşidi için potansiyel patojendirler. Köpeklerdeki pyoderma vakalarının hemen hemen hepsi *S. intermedius* tarafından oluşturulur. *S. intermedius*, hücre duvarı kompozisyonu ve çeşitli biyokimyasal özellikleri bakımından *S. aerus*'tan farklılık gösteren izolatları isimlendirmek için kullanılmıştır. Şimdi ise *S. intermedius*'un köpek spesifik türü için *S. pseudintermedius* ismi kullanılmaktadır. *Staphylococcus intermedius* yara infeksiyonları, otitis eksterna, sistitis, oküler ve respiratorik hastalıkların önemli bir nedenidir. İnsanlarda görülen *S. aureus* kolonizasyonuna benzer şekilde sağlıklı köpekler genellikle normal mikrofloralarında *S.*

intermedius'u taşırlar. Deri ve tüylerde kısa süreli olarak bulunurken asıl rezervuar ağız ve burun boşluğu ile perineum ve anüstür. *S. intermedius* köpek corneocytlerine olan konak spesifitesi nedeniyle genellikle insanlardan izole edilmez ancak petlerden insanlara geçiş rapor edilmiştir (Koneman ve ark 2006).

1.2.6.2. Tarihçe

Bakteri ilk olarak 1878 yılında Alman bilim adamı Robert Koch tarafından tanımlanmıştır. Robert Koch deneyimlerine dayanarak özellikle insanları etkileyen kan zehirlenmesi ve sepsisemiye bir bakterinin yol açtığını düşünmüştür ancak bu bakterileri mikroskop altında görememiştir. Stafilocoklar ilk kez 1880 yılında diz ekleminde operasyon sonrası oluşan bir apsedden, İskoçyalı cerrah Sir Alexander Ogston tarafından tanımlanmıştır. Ogston bu bakteriye, benzerliğinden dolayı Yunancada üzüm salkımı anlamına gelen *Staphylococcus* adını vermiştir. 1884 yılında Alman hekim Friedrich Julius Rosenbach bakteriyi koloni renklerine göre *S. aureus* (altın) ve *S. albus* (beyaz) olarak ikiye ayırdı. *S. albus* insan derisindeki yaygınlığından dolayı sonradan *S. epidermidis* olarak tekrar adlandırıldı. 1940'lı yılların öncesinde hekimler invaziv Stafilocok infeksiyonlarında görülen önemli mortalite karşısında çaresiz kaldılar. Alexander Fleming'in 1928'de penisilini bulması ve 1940'da Florey ve Chain tarafından penisilin üretiminin başarılması ile Stafilocok infeksiyonlarının tedavisinde yeni yöntemler kaydedilmiştir. 1950'li yıllarda çoklu dirençli *S. aureus* ortaya çıkmıştır. 1959'da penisilin dirençli *S. aureus*'un tedavisinde metisilin geliştirilmiştir. 1961 yılında *S. aureus*'un laboratuvar suşlarında metisilin direnci bildirilmiştir. 1961'de ilk doğal olarak metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) rapor edilmiştir. 1960-2000 yıllarında Stafilocoklarda makrolid, tetrasiklin, kloramfenikol, aminoglikozid ve fluorokinolon dirençleri bildirilmiştir. 1980'li yıllarda Metisilin direncinin genetik temeli açıklanmıştır, PBP2a karakterizasyonu yapılmıştır (Koneman ve ark 2006).

1.2.6.3. Sınıflandırma

Staphylococcus cinsi *Staphylococcaceae* ailesinde yer alır. Stafilocok türlerinin sınıflandırılması Çizelge 1. 2.'de verilmiştir.

Çizelge 1. 2. Stafilokok türlerinin sınıflandırılması (Todar 1994).

Domain	<i>Bacteriae</i>
Alem	<i>Eubacteria</i>
Bölüm	<i>Firmicutes</i>
Sınıf	<i>Bacilli</i>
Takım	<i>Bacillales</i>
Aile	<i>Staphylococcaceae</i>
Cins	<i>Staphylococcus</i>
Tür (insan ve hayvanlarda hastalık yapan en önemli türler)	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. saprophyticus</i> <i>S. haemolyticus</i> <i>S. lugdunensis</i>

Stafilokok türleri DNA/DNA ilişkileri ve fenotipik özelliklerine göre her geçen gün değişmekle birlikte en az dört grup altında toplanabilirler:

- i) *S. epidermidis* grubu (*S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* ve *S. saccharolyticus* türleri),
- ii) *S. saprophyticus* grubu (*S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus* türleri),
- iii) *S. simulans* grubu (*S. simulans*, *S. carnosus* türleri),
- iv) *S. sciure* grubu (*S. sciure*, *S. lentus* türleri) yer almaktadır. *S. aureus*, *S. auricularis*, *S. intermedius*, *S. hyicus* ve *S. caseolyticus* herhangi bir gruba sokulamamıştır (Tünger ve ark 2004).

Moleküler metodlara dayanılarak yapılan son çalışmalara göre fenotipik olarak *S. intermedius* olarak tanımlanan tür *S. intermedius* Grup (SIG) adı altında *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. delphini* grup A ve *S. delphini* grup B olarak tekrar sınıflandırılmıştır (Sasaki ve ark 2005).

1.2.6.4. Morfolojik ve Kimyasal Özellikleri

1.2.6.4.1. Görünüm ve Boyanma

Staphylococcus genusunda bulunan bakteriler 0,5-1,5 µm çapında Gram pozitif kok görünümündedir. Tekli, ikili, dördü hücreler halinde bulunabilirler, üç veya dört hücreden

oluşan kısa zincirler yapabilirler ve düzensiz üzüm salkımı benzeri şekiller oluştururlar. Hareketsiz ve kapsülsüz mikroorganizmalardır (Cengiz 1999).

1.2.6.4.2. Üreme ve Kültür Özellikleri

Stafilokoklar %7,5-10 NaCl içeren basit besiyerleri dahil kanlı agar, nutrient agar, triptik soy agar veya beyin kalp infüzyon agar gibi birçok besiyerinde ürerler. Ancak kanlı besiyerlerinde daha iyi çoğalırlar (Cengiz 1999).

Zorunlu anaerob olan *S. saccharolyticus* ve *S. aureus subsp. anaerobius* dışında fakültatif anaerob olup çoğunlukla aerob üremeyi tercih etmektedirler. Anaerobik ortamda glukozdan asit oluştururlar (Cengiz 1999).

Stafilokok türlerinin çoğunluğu 30-37°C'de 18-24 saat içinde 1-3 mm çapında koloni oluşturmaktadır. 37°C ideal üreme sıcaklıkları olup, 10-48°C arasında toksin oluşturabilmektedirler (Koneman ve ark 2006). *S. aureus*'a ait koloniler geniş (6-8 mm çapında), düz, yüzeyden hafifçe kabarık, yarı şeffaf görünümündedir. Çoğu suşa ait koloniler krem-sarı, portakal rengi pigmentasyon gösterirler. *S. aureus* kanlı agarda beta hemoliz yapmaktadır (Cengiz 1999).

Hücreler tek veya çiftler halinde, üzüm benzeri salkım formları oluşturmaktadır. Pürülan örnek içinde, infekte vücut sıvılarında veya sıvı besiyerlerinde morfolojik özellikleri üçlü-dörtlü kısa zincir yapan koklar şeklinde değişebilmektedir. Bu görünümleri ile Streptokoklara benzeyen Stafilokoklar, katalaz testinin pozitif olması ile ayırt edilebilmektedir (Peacock 2005, Koneman ve ark 2006).

Stafilokoklar, sporsuz bakteriler içerisinde dış etkenlere ve dezenfektanlara karşı en fazla dayanabilen bakterilerdir. Kültürlerde, +4°C'de 2-3 ay, -20°C'de 3-6 ay kadar canlı kalabilmektedirler. Stafilokok türleri 60°C'de ancak yarım saatte, %2'lik fenolde 15 dakikada inaktive olup, %9'luk sodyum klorüre ve sakkarozaya direnç gösterebilmektedir. Kuarternir amonyum klorür bileşikleriyle etkin bir şekilde dezenfekte edilebilir ayrıca alkol ve iyot gibi antiseptiklere de oldukça duyarlıdır (Koneman ve ark 2006).

1.2.6.4.3. Biyokimyasal Özellikleri

Biyokimyasal olarak streptokokları stafilokoklardan ayırmanın en iyi yolu katalaz testidir. Stafilokoklar katalaz pozitifdir. Test lam üzerine alınan bir koloninin üzerine %3 hidrojen peroksit eklenmesiyle yapılır. Katalaz pozitif kültürler O₂ ve köpük oluşturur. Test kanlı agarda yapılmamalıdır çünkü kanın kendisi katalaz içerir (Koneman ve ark 2006).

Plazmayı pıhtılaştırma yeteneğini gösteren koagulaz deneyi, Stafilokokların sınıflandırılmasında en yaygın olarak kullanılan, en çok önem taşıyan ve genel olarak kabul gören identifikasyon kriteridir. Koagulaz pozitif olan Stafilokoklar; *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. lugdunensis*, *S. hyicus*, *S. delphini*, *S. lutrae* ve *S. schleiferi subsp.*'dir. İki farklı yöntemle koagulaz testi yapılabilir. Birincisi Stafilokokların besiyerine saldıkları serbest koagulazın araştırıldığı tüp testidir. İkincisi ise kümeleştirme faktörü olarak da bilinen bağlı koagulazın araştırıldığı lam deneyidir. Lam deneyi hızlı sonuç vermekle birlikte, *S. aureus* suşlarının %10-15'i bu yöntemle negatif sonuç verebilir. Lam koagulazı negatif olan Stafilokoklar için mutlaka tüp koagulaz testi de uygulanmalıdır (Koneman ve ark 2006).

Stafilokoklar glukozu fermantatif olarak parçalar ve son ürün olarak laktik asit oluştururlar. Ayırt edici besiyeri olan Mannitol Salt Agarda yüksek yoğunlukta tuz varlığında üreyebilen Stafilokoklardan *S. aureus*, diğerlerinden mannitolu fermente ederek koloniler etrafında sarı hale oluşturmasıyla ayrılır. Fakat diğer bazı Stafilokoklar (örn. *S. saprophyticus*) da mannitolü fermente ederek benzer koloniler oluşturabilir. Mannitol Salt Agar ve diğer ayırt edici besiyerlerinde üremenin belirlenmesi için 48-72 saat inkübasyon gerekli olabilir. Diğer karbonhidratlardan trehaloz, mannoz, maltoz, sukroz ve laktozu parçalarlar, ksiloz, sellobioz, arabinoz ve rafinozu parçalamazlar. Nitratları nitritlere indirgerler. Oksidaz negatiftirler (Cengiz 1999).

1.2.6.4.4. Genom Yapısı

Genom projelerinde en fazla araştırılan türler arasında *Staphylococcus aureus* genomu bulunmaktadır. Genomu yaklaşık 2000-3000 kbp bir kromozom ile profajlar, plazmidler ve transpozonlardan oluşmaktadır. Stafilokokal DNA düşük oranda Guanin ve Sitozin (G+C) içermektedir. G+C içeriği %30-39 mol arasındadır (Tünger 2004, Peacock

2005). Bununla beraber *Micrococcus* soyu üyeleri %68-74 mol arasında G+C içerirler. *S. aureus* genomu, 2500'e yakın geni kodladığı düşünülen 2800 kbp uzunluğunda tek bir kromozomdan oluşup, G+C içeriği yaklaşık %32 moldür. *S. epidermidis*'in genomu, 2500 kbp uzunluğundaki bir kromozom ve çeşitli sayıdaki plazmidlerden (*S. epiermidis* ATCC12228 altı plazmid ve RP62A suşu tek plazmid içerir) oluşmaktadır. Bu türler %32'lik G+C içeriğine sahiptir ve 2400-2500 kodlanmış sekans içermektedir (Baba ve ark 2002).

Virulans faktörleri fajlar, plazmidler, patojenik adalar ve *Staphylococcus* kaset kromozomu tarafından kodlanır. Artan antibiyotik dirençliliği bir konjuge plasmid içine konmuş bir transpozon (Tn 1546) tarafından kodlanır. Bu transpozon dezenfektanlara olan direnci de kodlar. MRSA (metisilin resistant *S. aureus*) *mecA* geninin kodladığı modifiye bir penisillin bağlayıcı proteini ifade eder. Yapılan araştırmalar metisiline duyarlı *S. aureus* türlerinin birçoğunda *mecA* horizontal gen transferi ile değişim olduğunu göstermiştir. *S. aureus* popülasyonu içindeki değişikliklerin mutasyon, rekombinasyon ve horizontal gen transferi kombinasyonu ile olduğu düşünülmektedir. Bakterinin bu değişimi asemptomatik kolonizasyon sırasında veya oluşturduğu hastalık sürecinde meydana gelebilmektedir (Peacock 2005).

1.2.6.5. Virulans ve Patojeniteleri

S. aureus virulansı en yüksek olan Stafilokok türüdür. Ancak infeksiyon olup olmaması mikroorganizmanın virulansı ile konak savunma sisteminin oluşturacakları dengeye bağlıdır. *S. aureus* tarafından oluşturulan hastalıkların büyük kısmı yüzeye yapışmasını sağlayan, immun sistemi baskılayan ya da ele geçiren ve konakçıda zararlı toksik etkilere yol açan bir dizi virulans faktörüyle ilgilidir. Stafilokokların virulansında rol oynayan faktörler hücre duvar yapıları, kapsül, yüzey proteinleri, toksinleri ve enzimleridir (Peacock 2005).

1.2.6.5.1. Hücre Duvarı

Diğer Gram pozitif bakterilerde olduğu gibi Stafilokokların da hücre duvarı kuru ağırlığının yaklaşık %50'sini peptidoglikan tabaka oluşturmaktadır. Bu tabaka insanda Gram negatif bakterilerin endotoksinlerine benzer aktivite gösterir. Yani makrofajlardan sitokin salınımını uyarır, komplemanın aktivasyonuna yol açar ve trombosit agregasyonuna

neden olur. Ayrıca monositlerden İnterlökin-1 salınımını uyararak polimorfonükleer lökositlerin infeksiyon bölgesine toplanmalarına ve sonuçta apse oluşumuna da yol açar. Sadece Gram pozitif bakterilerde bulunan teikoik asit Stafilokokların hücre duvarında da yer alır ve mukozalarda bulunan özgül reseptörleri ile birleşerek Stafilokokların konağa adherensini sağlar (Cengiz 1999).

1.2.6.5.2. Kapsül

Birçok *S. aureus* kökeninde polisakkarid yapıda bir mikrokapsül bulunmaktadır. Bu ekzopolisakkarid bakteriyi fagositozdan korur ve konak hücrelerine ve özellikle de kateterler gibi yabancı cisimlere adherensini sağlar (Cengiz 1999).

1.2.6.5.3. Yüzey Proteinleri

S. aureus'un kolonizasyon sürecini başlatan konakçı hücre yüzeyine tutunması bazı adhesinler aracılığıyla olur. *S. aureus* adhesinlerinin büyük bir sınıfı hücre peptidoglikanlarına (C terminalinde işaret sırasındaki threonin kalıntısı aracılığıyla) tutunan ortak proteinleri içerir. Bu proteinler özellikle plazma veya ekstrasellüler matriks (ECM) bileşenlerine yapışır ve hepsi birlikte adheziv matriks moleküllerini tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenleri olarak isimlendirilir (MSCRAMMs). MSCRAMM ailesinin tipik üyeleri Stafilokokal protein A (SpA), fibronektin bağlayıcı proteinler A ve B (FnbpA ve FnbpB), kollojen bağlayıcı protein, elastin bağlayıcı protein ve kümeleştirici faktör (Clf) A ve B proteinleridir. Bunlar kimyasal yapıları ve hücre duvarı yerleşimleri birbirlerine benzeyen Stafilokoksik yüzey proteinleridir. Bu proteinler Stafilokokların konak dokularında kolonize olmasında en önemli faktörlerdir. Bu proteinlerin prototipi olan protein A'nın en önemli özelliği, IgG3 dışındaki tüm IgG ve IgA2 ile bazı IgM'lerin Fc reseptörleri ile birleşebilmesidir. Bu nedenle protein A'nın antikomplemanter ve antifagositer etkinliği vardır (Sareyyüpoğlu 2013).

1.2.6.5.4. Toksinleri

S. aureus, konak hücre morfolojisini ve/veya fonksiyonunu etkileyen çok sayıda ekstraselüler toksin üretebilir. Bunlardan bir kısmı toksik etkilerini enzimatik aktivite ile gösterirken, diğerleri süperantijen özellikleri nedeniyle sitokin salınımını indükler. Ayrıca, bu toksinler sayesinde Stafilokoklar yoğun inflamatuvar yanıt olan bölgelerde bile üremelerini sürdürebilirler (Sareyyüpoğlu 2013).

1.2.6.5.4.1.Sitolitik Toksinler

Stafilokoklar sitolitik aktiviteye sahip ekzotoksinler üretir. Eritrositler ve çeşitli hücreler üzerinde sitolitik, deney hayvanlarında öldürücü, nekrotik etkileri olan ekzotoksinlerdir. Sitolitik toksinler plazma membranında oligomerize olup β tüp porları oluşturarak hücre içeriğinin sızmasına ve hedef hücrenin lizisine neden olur. İyi antijen yapısındaki bu toksinlere karşı organizmada nötralizan antikorlar oluşmaktadır. Bu toksinler dört tiptir (Sareyyüpoğlu 2013):

Alfa toksin: Bu toksin ilk kez Kraus ve Clairmont tarafından 1900 yılında tanımlanmıştır. *S. aureus* insan suşlarının ana hemolizindir. Hemolitik, dermonekrotik, lizozom parçalayıcı ve doku kültürlerinde sitolitik etkileri vardır. Tavşan eritrositleri için hemolitik aktivitesi en fazladır, insan eritrositlerine fazla bir etkisi yoktur. İnsan makrofajları ve trombositleri üzerine litik etkisi vardır, monositlere etkisizdir. Dolaşım, kas ve böbrek korteksi dokuları toksine karşı duyarlıdır, bu dokularda tahribat yapar (Sareyyüpoğlu 2013).

Beta toksin: İlk kez 1935'te Glenny ve Stevens tarafından tanımlanmıştır. Stafilokok sfingomyelinazıdır. En iyi koyun, daha az olarak insan ve tavşan eritrositlerini eritir. Soğukta ve sfingomyelin üzerine etki ederek eritrositleri eritir (Sareyyüpoğlu 2013).

Gama toksin: 1938'de Smith ve Price tarafından tanımlanmış, Mollby Wadstron tarafından elde edilmiştir. İnsan, tavşan ve koyun eritrositleri duyarlıdır, at ve kuş eritrositleri dirençlidir. Özellikle Stafilokoklara bağlı kemik infeksiyonlarında kanda bu toksine karşı antikor düzeyinin yüksek bulunması, bu toksinin bu hastalıklarda etkili olduğunu düşündürmektedir (Sareyyüpoğlu 2013).

Delta toksin: Bu toksini 1947'de Williams ve Harper tanımlamıştır. İnsan, tavşan, koyun ve maymun eritrositlerini eritir. Biyolojik etkinliği geniş olup, eritrosit, lökosit, makrofaj, lenfosit ve trombositleri hasara uğratan bir proteindir (Sareyyüpoğlu 2013).

Bu sitolitik toksinlerden alfa ve delta toksin, insanlarda hastalık oluşturan *S. Aureus* suşlarında en çok bulunanlardır. *S. aureus* suşlarının %95'inde bunlardan biri, %82'sinde her ikisi birlikte bulunur (Sareyyüpoğlu 2013).

1.2.6.5.4.2. Lökositidin [Panton-Valentine Leukosidin (PVL)]

Bazı alfa hemolizinler diğer hücrelere ek olarak lökositleri de eritebilir, lökositidin ya da Panton-Valentin Leukosidin (PVL) olarak adlandırılır. Lökositidin üreten Stafilokok kökenleri üretmeyenlere göre fagositoza daha dayanıklıdır. Diğer hemolizinler kromozom üzerinde kodlanmıştır ve çoğu *S. aureus* suşunda bulunur. PVL toksini ise alfa hemolizinin bir homologudur, mobil bir faj üzerinde kodlanır ve transfer edilebilir. Özellikle toplum kökenli suşlar tarafından sentezlenmekle birlikte, yapılan çalışmalar PVL pozitif *S. aureus* suşlarının hastanelerde yayılabildiğini, hatta hastane kaynaklı salgınlara neden olabildiğini göstermektedir. *S. aureus* izolatları arasında ortalama olarak %2-10 arasında PVL pozitifliği bildirilmektedir (Morgan 2008). PVL özellikle toplum kökenli cilt ve yumuşak doku infeksiyonları ile akut nekrotizan pnömonilerden izole edilen *S. aureus* suşları tarafından salgılanan bir toksindir. PVL, aynı zamanda hem metisilin duyarlı hem de metisilin dirençli Stafilokok suşları tarafından üretilen önemli bir virülans faktörüdür. PVL, birbiri ile sinerjik etki gösteren iki komponentli bir toksin olup, konak lökositlerinin membranlarında porlar oluşturarak bu hücrelerin erimesine neden olmaktadır. Bu nedenle, PVL sentezleyen suşlar tarafından oluşturulan infeksiyonlar daha şiddetli seyretmekte ve ölümle sonuçlanabilmektedir. PVL toksin genleri evcil hayvanlardan izole edilen suşlarda da bulunmuştur. PVL tavşanlarda deri içi enjekte edildiğinde deride nekroz oluşturduğu belirlenmiştir (Morgan 2008).

1.2.6.5.4.3. Enterotoksinler

Isıya dirençli, 100°C'ye 30 dakika dayanabilen, polipeptit yapısında maddelerdir. Özellikle yüksek CO₂'li atmosfer ortamında karbondhidratlı ve proteinli besiyerlerinde üreyen Stafilokoklar tarafından oluşturulurlar. Enterotoksinin A, B, C1, C2, D, E ve F şeklinde yedi immunolojik tipi vardır. *S. aureus* kökenlerinin %35-50'sinin bu toksinleri oluşturabildikleri saptanmıştır. A ve D besin zehirlenmelerinde, B ise hastane infeksiyonlarında çok karşılaşılan bir toksindir. Özellikle burun veya nazofarenks portörlerinden oluşan gıda elleyicilerinin kontamine ettiği gıdalarla besin zehirlenmesi tablolarına yol açarlar. Besin zehirlenmelerinde tablo, Stafilokok üremiş ve enterotoksin oluşmuş besinlerin yenmesini izleyen 2-6 saat içinde bulantı, kusma ve ishal ile başlar. Semptom ve bulgular genellikle 24 saat içinde düzelir. İyileşme tamdır. Enterotoksijenik Stafilokok üremesine uygun ortam oluşturan besin maddeleri arasında jambon, patates, salam, dondurulmuş tavuk, süt tozu, yağ, krema ve mayonez sayılabilir. Kusturucu etkileri

mide ve barsaklardaki reseptörler aracılığıyla Nervus vagus ve sempatik sinirler yoluyla kusma merkezine iletilen uyarı ile oluşmaktadır. İshal oluşturmaları barsak lumeninden su absorpsiyonunun engellenmesi ve mukozadan barsak boşluğuna sıvı boşalmasının artması yoluyla olur (Devriese ve ark 2009).

1.2.6.5.4.4. Eksfoliyatif Toksin (Eksfoliyatin)

Epidermolitik toksin olarak da bilinen bu toksin, Stafilokok infeksiyonlarının veziküler ve eksfoliyatif deri lezyonlarından sorumludur. Stafilokokal Subkorneal Soyulma Sendromuna (SSSS) neden olur. Antijenik ve biyokimyasal yapıları bakımından en az iki farklı eksfoliyatin bulunduğu saptanmıştır. A tipi kromozomal, B tipi plazmide bağlı genlerce oluşturulur. Eksfoliyatif toksinlerin uzun bir süre T lenfositler için mitojenik aktiviteye sahip oldukları düşünülmüştür ancak süperantijenler kapsamına alınıp alınmaması hala tartışmalıdır (Sasaki ve ark 2005).

1.2.6.5.4.5. Toksik Şok Sendromu Toksini-1 (TSST-1)

TSST-1 ve Stafilokokal enterotoksinler pirojenik toksin süperantijenleri (PTSAgs) olarak bilinen bir toksin grubuna aittir. Bu grubun en karakterize özelliği T lenfositlerin proliferasyonunu stimule etme özelliği kazandıran süperantijenitedir. Toksik şok sendromunda yer alan Stafilokokların çoğu faj-1 grubundan 29 ve 52 tiplerindendir. Bu özgül toksini salgılayan *S.aureus* suşlarının hastane kaynaklı olabileceği bildirilmektedir (Devriese ve ark 2009, Sasaki ve ark 2005).

1.2.6.5.5. Enzimleri

Stafilokoklar lipaz, hiyaluronidaz, fibrinolizin, penisilinaz, katalaz, koagulaz ve DNaz gibi birçok enzim üretirler. Bu enzimlerin ana fonksiyonu lokal konakçı dokularını bakteriyel üreme için gerekli besinlere dönüştürmektir. Ayrıca bu enzimler özellikle Stafilokokların komşu dokulara yayılımını kolaylaştırarak infeksiyon patogenezinde rol alırlar (Sasaki ve ark 2005).

Katalaz: Tüm Stafilokok türleri toksik hidrojen peroksidi toksik olmayan oksijen ve suya ayırtıran katalaz enzimi üretir. Bakteriler, bu enzim sayesinde fagositlerin içinde toksik oksijen radikalleri tarafından öldürülmeye direnç kazanır (Sasaki ve ark 2005).

Koagülaz: Ekstrasellüler bir proenzimdir. Coagulase-Reacting faktör (CRF) ile birleşerek aktif duruma geçer ve plazmayı pıhtılaştırır. *S. aureus* için standart belirleyici olan koagulazla, patojen olan-olmayan Stafilokok ayrımı yapılır. Koagulaz Pozitif Stafilokokların üzerinde oluşan kalın fibrin tabakasının, mikroorganizmayı fagositoza karşı koruyarak, patojenliğe katkı sağladığı ileri sürülmektedir (Sasaki ve ark 2005).

Lipaz: *S. aureus* suşlarının tümü ve koagulaz negatif Stafilokokların da yaklaşık 1/3'ü lipaz enzimi üretir. Lipaz, yağları hidrolize ederek vücudun lipid içeren bölgelerinde Stafilokokların yaşamasını sağlamakta ve Stafilokokların yüzeysel dokuları invaze ederek fronkul ve karbonkul gibi infeksiyonlarının gelişimine neden olmaktadır (Sasaki ve ark 2005).

Hiyaluronidaz: Bağ dokusunun aselüler matriksindeki asit mukopolisakkaridler olan hiyaluronik asidi hidrolize eden enzimlerdir (Sasaki ve ark 2005).

Deoksiribonükleaz: DNaz enzimleri endo ve ekzonükleaz aktivitesine sahip, nükleik asitleri fosfomononukleotidlere parçalayan fosfodiesterazlardır (Sasaki ve ark 2005).

B- laktamazlar: Klinik kullanıma girdiği dönemlerde hemen tüm Stafilokok kökenleri penisiline duyarlı iken, günümüzde özellikle hastane kaynaklı izolatlarda bu oran %5'in altına düşmüştür. Stafilokoklarda penisilin direncine neden olan mekanizma β -laktamaz üretimidir (Devriese ve ark 2009).

S. aureus ayrıca doğal ve kazanılmış bağışıklık üzerinde ciddi etkileri olan spesifik proteinlere de sahiptir. Bu proteinlere örnek Stafilokokal complement inhibitör (SCIN), *S. aureus*'un kemotaksis inhibitör proteini (CHIPS), stafilokinaz (SAK), ekstrasellüler fibrinojen bağlayıcı protein (Efb), ekstrasellüler adherens protein (Eap) ve formil peptid reseptör benzeri inhibitör proteindir (FLIPr). SCIN, insan nötrofillerinin bakteriyi fagosit etmelerini sağlayan bakteri yüzeyinde C3b formasyonunu bloke eden bir C3 konvertaz inhibitörüdür. CHIPS ve FLIPr pozitif kemotaksis sağlayan nötrofil reseptörlerini bloke eder. Eap nötrofillerin kan damarlarından dokulara migrasyonunu bloke eder. Efb komplement aktivasyonunun hem klasik hem de alternatif yollarını inhibe ederken SAK, α -defensinlere bağlanarak bakterisidal etkilerini yok eder (Sasaki ve ark 2005).

S. aureus'un virulansının genellikle multifaktöryel olduğu ve farklı virulans belirleyicilerinin kombine etkilerine bağlı olarak oluştuğu düşünülür. Toksik şok sendromu, SSSS ve Stafilokokal gıda zehirlenmeleri gibi zehirlenme olayları ise ayrı ayrı toksik şok sendromu toksini, eksofoliyatif toksin A ve B ve farklı Stafilokokal enterotoksinler tarafından oluşturulur (Sasaki ve ark 2005).

1.2.6.6. Patojenite

S. aureus'un patojenitesi infeksiyonun farklı safhaları sırasında ekstrasellüler ve hücre duvarı komponentlerinin farklı sıralarında oluşan koordine değişiklikleri içeren kompleks bir süreçtir (kolonizasyon, konakçı savunmasının engellenmesi, üreme ve hücre bölünmesi ve bakteriyel bulaşma) (Bien 2011).

İnfeksiyon boyunca çevresel belirtilere cevap olarak farklı virulans faktörlerinin koordine hareketi (örneğin önce kolonizasyon sırasında adhesinlerin ortaya çıkması, daha sonra infeksiyon sırasında toksinlerin üretilmesi doku yayılımını kolaylaştırır) global düzenleyicilerin varlığına işaret eder. Bu düzenleyiciler bakteriye konakçının ortamına uyum sağlama yeteneği kazandıran faktörler üreterek, yaşamını sürdürmesine ve daha sonra uygun zamanda infeksiyon oluşturmaya yardımcı olur. Virulans faktörlerinin ortaya çıkmasında en büyük etken olan ortam işaretleri arasında besin mevcudiyetindeki değişiklikler, sıcaklık, pH, ozmolarite ve oksijen stresi yer almaktadır. *S. aureus* virulans determinantlarının üretimi; yardımcı gen düzenleyici (*agr*), Stafilokokal yardımcı düzenleyici (*sarA*), *sae*, *sigB*, *arl* ve bazı *sarA* homologları gibi birkaç düzenleyici bölge tarafından kontrol edilir. Bu düzenleyiciler *S. aureus* virulans genlerinin ortaya çıkmasında önemli bir iletişim rolü oynar. Virulans gen düzenleyicileri uygun ortamın olduğundan emin olduğunda direkt olarak promotörlere bağlanarak ya da diğer düzenleyiciler aracılığıyla hedef genlerin ortaya çıkmasını sağlar (Bien 2011).

1.2.6.7. Epidemiyoloji

Stafilokoklar doğada yaygın olarak bulunmakta ve fizyolojik olmayan çevre koşullarına uzun süre dayanabilmektedir. Fırsatçı patojen karaktere sahip olan bu etkenler, hayvanın stres altında kalması ve her türlü yaralanma sonucunda aktive olmaktadır (Bilgehan 2002, Bond ve ark 2012).

1.2.6.8. Stafilokokların Neden Olduğu İnfeksiyonlar

Stafilokoklar insanlar ve diğer hayvanlarda toksin üretmek veya işgal etmek yoluyla geniş bir çeşitlilikte hastalıklara yol açabilirler. Stafilokok toksinleri gıda zehirlenmesi durumlarında ana etkindir. Bakteri uygun olmayan şartlarda saklanan yiyeceklerde ürer. Pişirme süreci onları öldürse de, enterotoksinler ısıya dayanıklıdır ve dakikalarca kaynamaya bile dayanabilirler. Stafilokoklar daha çok su içeriği az olan peynir, salam ve sucuk gibi gıdalarda ürerler. Patojenik türlerinden birisi yaralarda infeksiyona yol açabilen *S. aureus*'tur. Bu türden olan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) hastaneden kazanılan infeksiyonlarda ana etken olmuştur *S. aureus* ayrıca Toksik Şok Sendromundan da sorumlu olabilir. Herhangi bir *S. aureus* infeksiyonu Stafilokokal Haşlanmış Cilt Sendromuna yol açabilir. Ayrıca piyemi diye adlandırılan bir çeşit septisemiye de yol açabilir. Hayvanlarda Stafilokoklardan ileri gelen başlıca infeksiyonlar; dermatitis, mastitis, botriyomikozis, enzootik piyemi, artritis, göz infeksiyonları ve gıda zehirlenmeleridir. Çeşitli infeksiyonlardan (solunum sistemi infeksiyonları, endokarditis, tromboflebitis, besin zehirlenmesi, septik artritis, otitis, osteomyelitis, meningitis, sepsis, bakteriyemi) ve birçok vücut bölgesindeki bakteriyel yangılardan da sıklıkla izole edilmektedirler (Quinn ve ark 2011).

Çizelge 1.3. Koagulaz Pozitif Stafilokoklar ve klinik önemleri (Quinn ve ark 2011)

TÜRLER	KONAKLAR	HASTALIKLAR/İZOLE EDİLEN YERLER
<i>S. aureus</i>	Sığır	Mastitis, impetigo
	Koyun	Mastitis, dermatitis, kene piyemisi, benign folikülitis
	Keçi	Mastitis, dermatitis
	Domuz	Meme bezlerinde botriyomikozis Meme bezlerinde impetigo
	At	Mastitis
	Kedi, Köpek	Piyoderma, endometritis, sistitis, otitis eksterna ve diğer irinli durumlar
	Kümes hayvanları	Artitis ve septisemi, bumblefoot, omfalitis
<i>S. pseudintermedius</i>	Köpek	Piyoderma, endometritis, sistitis, otitis eksterna ve diğer irinli durumlar
	Kedi	Çeşitli piyojenik durumlar
	At	Nadiren
	İnek	Nadiren
<i>S. hyicus</i>	Domuz	Eksudatif epidermitis, artrit
	Sığır	Mastitis
<i>S. intermedius</i>	At	Burun
	Güvercin	Üst solunum yolları
	Köpek, Kedi	Piyoderma, otitis eksterna, sistitis
<i>S. aureus subsp. anaerobius</i>	Koyun	Lenfadenitis
<i>S. delphini</i>	Yunus	İrinli deri lezyonları
	At	Burun
	Güvercin	Üst solunum yolları
<i>S. lutrae</i>	Samur	Patojenik önemi belirsiz
<i>S. schleiferi subsp. coagulans</i>	Köpek	Otitis eksterna

1.2.6.9. Otitis Eksterna Vakalarına Neden Olan Stafilokok Türleri

1.2.6.9.1. *S. aureus*

S. aureus, köpeklerde otitis eksterna vakalarında sık rastlanan mikroorganizmalar arasında yer almaktadır. Flora etkeni olmalarından dolayı, kulak yolundaki yangısal değişikliklerde de fırsatçı olarak sekonder infeksiyonlara yol açmaktadır. *S. aureus* virulansı en yüksek olan Stafilokok türlerindendir. Bu özelliklerinden dolayı da insanlar ve hayvanlarda önemli infeksiyonlara neden olmaktadır (Leonard ve ark 2006, Briscoe ve ark 2008). Keskin ve ark (1999) 81 otitisli köpekten izole ettikleri suşlarda en fazla *S. aureus* suşunu gözlemlemiş ve bu oranın %46,9 olduğunu belirtmişlerdir. Benzer bir çalışmada ise Kihyang ve ark (1999) 26 köpeğe ilişkin izolatanın *S. aureus* türüne ait olduğunu rapor etmişlerdir. Lilenbaum ve ark (2000) 65 otitis eksternalı köpekten izole ettikleri suşlarda, *S. aureus* türünün en fazla olduğu kaydedilmiştir. Mhatre ve ark (2005) yapmış oldukları bir diğer çalışmada ise 27 otitisli köpeğe ait izolatlardan 23 tanesinin *S. aureus* türüne ait olduğunu bildirmişlerdir.

1.2.6.9.2. *S. schleiferi subsp. schleiferi* ve *S. schleiferi subsp. coagulans*

Koagulaz negatif Stafilokokların sık sık tür seviyesinde tanımlanamamasından dolayı; koagulaz negatif *S. schleiferi subsp. schleiferi* etkenine ait vakaları ve prevalansı az sayıda çalışmada yer almaktadır. Önceleri bazı insan ve hayvanlarda nadir olarak *S. schleiferi subsp. coagulans* etkeni, *S. aureus* ve *S. intermedius* etkenleriyle fenotipik benzerliklerinden dolayı identifiye edilmiştir (Leung ve ark 1999). Yapılan çeşitli çalışmalarda; *S. schleiferi subsp. schleiferi* köpekte süperfisyal piyodermada, *S. schleiferi subsp. coagulans* ise 21 otitis eksternalı köpeğe ait suşlardan *S. intermedius*'tan sonra sık izole edilen ikinci etken olduğu rapor edilmiştir (Yamashita ve ark 2005).

1.2.6.9.3. *S. intermedius*

S. intermedius, çoğunlukla hem sağlıklı hem de lezyonlu köpeklerden izole edilen bir mikroorganizmadır. Sağlıklı köpeklerin mukoz membranlarında kommensal olarak bulundukları için ağız, kulak, burun, farenks ve anüslerinden izole edilebilirler. *S. intermedius*, *S. intermedius* grup (SIG) içinde yer almaktadır. Ayrıca *S. intermedius* grup (SIG) *S. pseudintermedius* ve *S. delphini* türlerini de kapsamaktadır. Fenotipik olarak *S. pseudintermedius* ve *S. delphini* türlerinden arjinin dihidrolaz reaksiyonları (*S. Intermedius*

negatif), aerobik koşullarda b-gentobiozdan asit üretimi (*S. intermedius* pozitif) ve anaerobik D-mannitol üretimi (*S. intermedius* pozitif) ile ayrılmaktadır. *S. pseudintermedius* ve *S. delphini* ise fenotipik testlerle ayrımı oldukça zordur, moleküler düzeyde ayrımı yapılabilmektedir (Petrov ve ark 2013).

Çizelge 1.4. Köpek ve kedilerden izole edilen *Koagülaz Pozitif Stafilocok* türlerinin fenotipik identifikasyonu (Petrov ve ark 2013)

TEST	<i>S.aureus</i>	<i>S.pseudintermedius</i>	<i>S.intermedius</i>	<i>S.delphini</i>	<i>S.schleiferi</i> <i>ssp.coagulans</i>
Hemolitik Aktivite	+	+	+	+	+
Clumping Faktör	+	Değişken	Değişken	-	-
Tüp Koagülaz	+	+	+	+	+
VP	+	Zayıf	-	-	+
DNaz	+	+	+	Zayıf	+
Trehaloz	+	+	+	-	-
Laktoz	+	Değişken	+	+	-
Mannitol	+	-	-	+	Değişken

1.2.6.9.4. *S. pseudintermedius*

Staphylococcus pseudintermedius ilk olarak 2005 yılında köpeklerde pyoderma, otitis eksterna, üriner sistem infeksiyonları ve fırsatçı infeksiyonlara yol açan; *S. intermedius*'tan farklı bir *Koagülaz Pozitif Stafilocok* türü olarak tanımlanmıştır. *S. pseudintermedius* kolonizasyonu köpeklerde yaygındır, sağlıklı köpeklerde %68'e kadar rapor edilmiştir (Rubin ve Trejo 2011). *S. pseudintermedius* köpeklerin deri ve mukoz membranlarında kommensal olarak bulunmakta ve köpeklerde piyoderma, endometritis, sistitis, otitis eksterna gibi çeşitli infeksiyonlara yol açmaktadır (Fitzgerald 2009).

S. pseudintermedius koloni morfolojisi ve standart fenotipik testler ile tanımlanabilmektedir. Koloniler koyun kanlı agarda; kabarık, pigmentsiz, küçük tek δ -hemoliz ya da tam bir hemoliz oluşturarak üremektedir (Fitzgerald 2009). Biyokimyasal olarak *S. pseudintermedius*, *S. aureus*'tan pigment ve kümeleştirici faktör aktivitesi yokluğu, zayıf ve geç mannitol fermentasyonu, pyrolidonyl arylamidase ve B-galaktosidaz pozitif olması ile ayrılmaktadır.

Fenotipik profilleri *S. intermedius* ve *S. delphini* türleriyle benzerlik göstermektedir. *S. pseudintermedius*; koagülaz, b-galaktosidaz, polimiksin B direnci, D mannitol asiti ve aseton üretimi gibi fenotipik testler ile diğer Stafilocok türlerinden ayrılmaktadır (Guardabassi ve ark 2004). Ancak *S. delphini* ile fenotipik ayrımı oldukça zordur (Jones ve ark 2007). Bu nedenle *S. pseudintermedius*, çeşitli ticari test kiti ve PCR yöntemleriyle daha doğru bir şekilde belirlenmektedir. *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi subsp. coagulans*, *S. hyicus*, *S. lutrae*, *S. delphini* ve *S. pseudintermedius* bakterilerinden başka koagülaz pozitif altı Stafilocok türü daha vardır (Oliveira ve ark 2008).

S. hyicus ve *S. lutrae* dışındaki diğer dört türün 16S rRNA gen sekans benzerliği %99 birbirleriyle aynıdır (Murray ve ark 2007, Petrov ve ark 2013). *S. delphini* ilk olarak 1988 yılında yunus balıklarından, *S. pseudintermedius* da 2005 yılında kedi, köpek, at ve papağandan izole edilen türlerdir (Oliveira ve ark 2008). Bu iki bakteri, izolasyonlarının ardından *S. intermedius* ile ilişkilendirilmiştir. Bazı araştırmacılar farklı kaynaklardan izole ettikleri *S. intermedius* suşlarının genotipik ve fenotipik olarak birbirinden ayrı olduklarını bildirmişlerdir. Bu da heterojen biyotipli *S. intermedius* suşlarının *S. delphini* ve *S. pseudintermedius* türlerini içerebileceğini kanıtlar niteliktedir (Bannoehr ve ark 2009). Sasaki ve ark (2005) tarafından yapılan bir çalışmada *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* ve *S. delphini* parçalı *sodA* ve *hsp60* gen sekans baz alınarak filogenetik moleküler analizlerle ayrılmıştır. *S. intermedius* ve *S. delphini* ile biyokimyasal benzerliklerinden dolayı ancak moleküler testlerle ayrımı yapılabilmektedir (Bannoehr ve ark 2009).

Çizelge 1.5. *S. pseudintermedius*'u diğer Stafilokoklardan ayıran özellikleri (Devriese ve ark 2009)

	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. schleiferi</i>	<i>S. delphini</i>
Katalaz	+	+	+	+	+	+
Pigment	-	+	-	-	-	-
Koagülaz	+	+	+	D-	-	+
Clumping faktör	-	+	D	-	+	-
DNAaz	+	+	+	+	+	-
B-Hemolizin	+	D	+	-	+	ND
Asetoin	+	+	W	-	+	-
Pyrolidinyl arylamidaz	+	-	+	-	+	ND
Maltoz	+	+	-; W	-	-	+
Sakkaroz	+	+	+	+	-	+
D-Trehaloz	+	+	+	D+	D	-
D-Ksiloz	-	-	-	-	-	-
Akriflavin (8µg/ml)	S	R	S	S	S	S
Polimiksin E (10 µg)	R	R	S	R	S	S

+: Pozitif

-: Negatif

D: Türe bağlı

D+: Genellikle pozitif

D-: Genellikle negatif

ND:Hakkında bilgiler net değil

W: Zayıf

R: Dirençli

S: Duyarlı

S. pseudintermedius Stafilokoklar içinde en virulent ve patojen tür olan *S. aureus*'un tipik karakteristik özelliklerini göstermektedir (Ruscher ve ark 2008). *S. pseudintermedius* koagülaz, proteaz, termonukleaz gibi enzimler, hemolizinler, eksfoliyatif toksin ve enterotoksinleri üretmektedir (Zubeir ve ark 2007). Ayrıca Luk-I olarak bilinen lökotoxin de üretmektedir. Luk-I *S. aureus* tarafından üretilen PVL ile oldukça benzerdir (Guardabassi ve ark 2004).

S. pseudintermedius bakterisinin vertikal, horizontal ve türler arası geçiş yapabileceği bilinmektedir. Vertikal geçiş; *S. pseudintermedius*'un dişi köpeklerden yeni doğan yavrulara kolonize olmasıyla gerçekleşmektedir. Bu nedenle söz konusu bakteri, yeni doğanlarda doğumdan bir gün sonra deri ve mukoz membranlarından izole edilebilmektedir. Yetişkin köpekler arasında horizontal geçişe ilişkin çok az literatür yer almaktadır. Yapılan çalışmalarda enfekte köpeklerin, sağlıklı olanlara söz konusu organizmayı bulaştırdıkları gözlenmektedir. Türler arası geçiş ise enfekte köpekler ile sahiplerinin temasları sonucu olmaktadır. *S. pseudintermedius* son yıllarda metisiline olan direnci, vertikal ve türler arası geçişleriyle önemli Stafilokok türleri arasında yer

almaktadır. Bu nedenle günümüzde en çok çalışılan Stafilokok türlerindendir (Udegbunam ve ark 2014).

1.3. İnsanlarda *S. pseudintermedius*'un Zoonotik Önemi

Stafilokoklar, yarısı insanlara özgü olmak üzere 38 tür ve 17 alttüre bölünmektedir. Fenotipik olarak *S. intermedius* olarak identifiye edilen izolatlar *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* ve *S. delphini* olarak üç farklı türü içerir ve *S. intermedius* grup (SIG) olarak adlandırılırlar. *S. pseudintermedius* son zamanlarda hayvanlara özgü yeni bir koagülaz pozitif tür olarak tanımlanmıştır. *S. intermedius*'tan ziyade *S. pseudintermedius* fırsatçı türdür ve sıklıkla kedi ve köpeklerde kolonize olarak infeksiyonlara sebep olur. Bununla birlikte *S. pseudintermedius* infekte veya kolonize petlerden insanlara geçebilmekte ve artan bir halk sağlığı problemi haline gelmektedir (Hoovals ve ark 2006).

İnsanda rastlanan *S. pseudintermedius*' a ait ilk klinik rapor 2005 yılında Belçika'da bildirilmiştir. 60 yaşında bir erkek hastaya Haziran 2004'te implante cardioverter-defibrilatör (ICD) takılmış Ağustos 2005 yılında hasta, ICD aletinin yerinden oynadığı şikayetiyle hastaneye başvurmuştur. Klinik muayenede ICD cebinde perforasyon ve infeksiyon olduğu tesbit edilmiştir. İnfekte ICD cerrahi müdahale ile çıkarılmış ve kültüre gönderilmiştir. Kültür ve biyokimyasal testler sonucu etkenin bir Stafilokok türü olduğu tesbit edilmiştir. Ardından Real Time Multiplex PCR (RT-PCRs) ve son olarak 16S rRNA gen dizisi analizi yapılarak *S. pseudintermedius* olduğu tesbit edilmiştir. Hastanın herhangi bir pet besleyip beslemediği bilinmediği için infeksiyonun kaynağı bilinmemektedir (Hoovals ve ark 2006).

S. pseudintermedius zaman zaman insanlarda özellikle de petlerle yakın ilişkisi olan veteriner hekimler ve pet sahiplerinde oluşan ciddi infeksiyonlardan izole edilmektedir. Son zamanlarda tüm dünyada metisilin dirençli *S. pseudintermedius* (MRSP) ortaya çıkmış ve özellikle Avrupa'da insanlardaki vaka raporlarında artış gözlenmiştir (Hoovals ve ark 2006).

1.4. Stafilokoklarda Metisilin, Mupirosin ve Vankomisin Dirençliliği

Bakteriler ve diğer patojen mikroorganizmalarla oluşan infeksiyonların önlenmesi ve tedavisinde kullanılan etkili ajanların keşfi modern tıbbın en önemli gelişmelerinden

biri olmakla birlikte, antienfektif potansiyele sahip maddeler aslında binlerce yıldır kullanılmaktadır. Günümüzden 2500 yıl önce Çinliler küflenmiş soya fasulyesinin çeşitli cilt infeksiyonlarındaki tedavi edici etkisini biliyorlardı. Çok eski tarihlerden beri dünyanın değişik yerlerindeki pek çok uygarlıkları kurmuş olan insanlar bitkilerden yapılmış ilaçlarla yüzeysel ve sistemik infeksiyonları tedavi etmeye çalışmışlardır. Arsenik ve bizmut gibi ağır metaller 1900'li yıllarda sifiliz dahil bazı infeksiyonların tedavisinde kullanılmıştır. Modern kemoterapi çağı 1936 yılında sülfonamidlerin keşfi ve klinik kullanıma girmesiyle başladı. Penisilinin klinikte kullanılmaya başlandığı 1944 yılına kadar değişik sülfonamid preparatları antibakteriyel tedavinin seçkin ilaçları olmuştur. 1940'lı yıllarda penisilinin tedavide kullanılmaya başlanmasıyla birlikte, Stafilokokal infeksiyonlara bağlı mortalite oranı hızla azalma göstermiştir. Ancak kısa bir süre sonra, *S. aureus* suşları penisilinaz enzimi üretmeye başlayarak penisiline direnç geliştirmiş ve bu dirençli suşlar hızla yayılmıştır. Direnç ilk kez 1944'te tanımlanmıştır. 1950'lerin sonlarında suşların yaklaşık %50'si penisiline dirençli hale gelmiştir. Aynı tarihlerde tetrasiklin, kloramfenikol ve eritromisine karşı çoklu direnç gösteren *S. aureus* suşları bildirilmiştir (Stegmann ve ark 2010).

Metisilin (2,6-dimetoksifenilpenisilin), Stafilokokal β -laktamaz enziminin hidrolizine dirençli penisilin grubu antibiyotikler içerisinde ilk elde edilen ve ilk klinik kullanıma girendir. Bu grupta bulunan antibiyotikler, penisilinaza dirençli penisilinler veya antistafilokokal penisilinler olarak adlandırılmaktadır. İki yıl sonra, 1961 yılında, ilk metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatları İngiltere'den bildirilmiş ve sonradan 1960'lı yıllarda Avrupa'da ve 1970'li yıllarda ABD'de bir problem haline gelmiştir (Hoovals ve ark 2006). Antibiyotiklere çoklu direnç gösteren MRSA suşları 1980'lerin sonlarında ve 1990'lı yıllarda tüm dünyaya yayılmıştır (Stegmann ve ark 2010). ABD'de MRSA izolatlarının oranı 1975'te %2 iken, 1996'da %35'e yükselmiştir. Japonya'da 1992-1993 yıllarında çeşitli coğrafik bölgelerdeki hastalardan izole edilen yaklaşık 7000 suşun analizi, *S. aureus* izolatlarının %60'ının metisiline dirençli olduğunu göstermiştir. MRSA halen tüm dünyada çeşitli büyüklükteki hastanelerde en sık rastlanan nozokomiyal patojenler arasındadır (Paul ve ark 2011).

1956 yılında Endonezya ve Hindistan topraklarından alınan örneklerden üretilen *Streptomyces orientalis* kültürlerinde antibiyotik özellikleri gösteren yeni bir madde saptanmış ve vankomisin olarak adlandırılmıştır. Vankomisin Gram pozitif bakterilere,

özellikle dirençli *S. aureus*'a karşı güçlü aktivitesi ile dikkat çekmiştir. Kimyasal yapı bakımından diğer antibiyotiklerden farklı olup, glikopeptid yapısındadır. Vankomisin ilk olarak 1956'da klinik kullanıma girmesine rağmen, ilk yıllarda kullanılan preparatların saf olmaması ve yan etkilerinin sıklığı nedeniyle metisilin kullanıma girdikten sonra önemini yitirmiş, son yıllarda metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'un ortaya çıkışıyla birlikte yeniden önem kazanmıştır. Koagülaz negatif Stafilokokların klinik izolatlarında vankomisin direnci 1987'de bildirilmiştir. 1990 yılında *S. aureus* infeksiyonlarının teikoplanin ile tedavisi sonrası, teikoplanine dirençli izolatların seleksiyonuna bağlı klinik başarısızlıklar bildirilmiştir. 1997 yılında Japonya, ABD, Fransa, Hong Kong ve Kore'de vankomisine azalmış duyarlılık gösteren MRSA izolatlarının ortaya çıkması çok endişe vericidir. Bu suşlar diğer antimikrobiyal ajanların da çoğuna dirençli olup vankomisin tedavisine cevap vermeyen hastalardan izole edilmiştir. Haziran 2002'de ise Amerika Birleşik Devletleri'nin Michigan eyaletinden, 40 yaşında diyalize giren bir erkek hastanın kateter ucundan ilk vankomisine dirençli *Staphylococcus aureus* (VRSA) suşunun izole edilmesi, gelecekte bu dirençli bakterilerle oluşan infeksiyonların önemli bir problem haline gelebileceğini göstermesi açısından önemlidir. Bugüne kadar, tüm dünyada VRSA enfeksiyonunun görüldüğü 11 olgu mevcuttur. Bunlardan 9'u ABD'den (Michigan 7, Pennsylvania 1, New York 1 olgu), 2'si ise İran ve Hindistan'dan bildirilmiştir. Bu olguların hepsinde PCR ile *vanA* geni gösterilmiştir. VRSA'larda görülen direnç, *vanA* geni varlığına bağlıdır. Bu genin vankomisine dirençli enterokoklardan *S. aureus*'lara aktarıldığı düşünülmektedir (Paul ve ark 2011).

İnteritisyel nefrite yol açması nedeniyle, metisilin günümüzde klinik olarak kullanımda değildir. Sadece laboratuvarlarda Stafilokoklardaki beta laktam direncinin saptanmasında kullanılmaktadır (Paul ve ark 2011).

Metisilin dirençli Stafilokoklar, metisilin duyarlı Stafilokoklardan farklı olarak *mecA* genine sahiptirler. Bu gen bir penisilin bağlayan protein (PBP2a) sentezlenmesinden sorumludur. PBP2a'nın beta laktam antibiyotiklere afinitesi düşüktür. Bu nedenle metisilin dirençli bir Stafilokok beta laktam antibiyotiklerle karşılaştığında, PBP2a düşük afinite nedeni ile beta laktam antibiyotiği bağlayamaz, hücre duvar sentez fonksiyonunu sürdürür. MRSA suşları morbidite ve mortalitesi yüksek infeksiyonlara yol açmaları ve bu infeksiyonlarda tedavi seçeneklerinin de sınırlı olması nedenleri ile önemlidirler (Paul ve ark 2011).

Staphylococcal Cassette Chromosome (SCC) olarak adlandırılan hareketli bir genetik element tarafından taşınan metisilin direnci belirleyicisi *mecA* geni, *S. aureus*'a benzer şekilde *S. pseudintermedius*'ta da bulunur. Metisilin dirençli Stafilokokları (MRS) tesbit etmek için oxacillin kullanılır ve oxacillin dirençli türler metisilin dirençli olarak kabul edilir. Bunun yanında oxacillin veya metisiline dirençli olanların amoksisilin-klavulonik asit ve sefalosporinler gibi diğer B-laktam antimikrobiyallere de dirençli olduğu düşünülmelidir. Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) laboratuvarlardan antibiyotik duyarlılık testi ne olursa olsun bütün diğer B-laktam grubu antimikrobiyallere dirençli *mecA* pozitif MRS'leri rapor etmelerini istemiştir. 2008 yılında CLSI MRSP'nin invitro antimikrobiyal dirençliliğini belirten yeni bir döküman yayınlamıştır. Bu rehber gere MRSP izolatlarında oxacillin için yeni kriter *S. aureus*'a benzer şekilde; agar ve broth dilüsyon için ≥ 4 mg/L ve disk diffüzyon testi için ≤ 10 mm'dir. Akay ve ark (1984)'nın çalışmasına göre köpeklerin deri infeksiyonlarından elde edilen izolatlar fenotipik olarak tanımlanmış olduğunda 41 Stafilokokal izolatın 35'i (%85,4) *S. intermedius*, 4'ü (%9,8) *S. aureus* ve 2'si (%4,8) farklı türler (*S. chromogenes* ve *S. capitis*) olarak bulunmuştur. PCR-RFLP sonuçlarına göre; daha önce fenotipik olarak *S. intermedius* olarak tanımlanmış 35 izolatın 33'ü (%94,2) *S. pseudintermedius* olarak tanımlanmıştır. *S. pseudintermedius* izolatlarında chromogenic chrom ID MRSA agarda inkübasyon sonrası metisilin direnci 11/33 (%33,3) olarak bulunmuştur. Disk diffüzyon metoduna göre *S. pseudintermedius*'un oxacillin direnci 11/33 (%33,3) olarak bulunmuştur. *S. pseudintermedius* izolatlarında *mecA* geni de 11/33 (%33,3) bulunmuştur (Akay ve ark 1984).

Hayvanlarda ilk MRSA izolatı 1972 yılında mastitisli sığırlardan izole edilirken, bunu 1988 yılında kedi ve 1989 yılında köpek izolatları izlemiştir. Daha sonra dünyanın pek çok yerinde izolat sayısının artması ile MRSA infeksiyonlarının hayvanlarda da problem olmaya başladığı görülmüştür (Kaynarca ve Türkyılmaz 2010).

16S rRNA gen sekansı 1980'li yıllardan beri bakterilerin sınıflandırılmasında ve genotipik analizleri için beşeri hekimlikte kullanılmaktadır. Artık sekansa dayalı moleküler tanımlama veteriner klinik sahada karşılaşılan bakterilerin tanımlanmasında da kullanılmaya başlanmıştır. Metisilin dirençli suşların doğru bir şekilde belirlenmesi için kullanılan pek çok yöntem bulunmaktadır (Kaynarca ve Türkyılmaz 2010).

Metisiline dirençli Stafilokok suşları, 1960' tan bu yana, tüm dünyada giderek artan oranda hastane infeksiyonu etkeni haline gelmişlerdir. Metisilin dirençli Stafilokokların yanlış olarak duyarlı saptanması tedavi başarısızlıklarına neden olur. Benzer şekilde metisiline duyarlı Stafilokokların da dirençli tanımlanması gereksiz yere glikopeptid antibiyotiklerin kullanılmasına yol açmaktadır. Son yıllarda vankomisin intermediate *S.aureus* (VISA) suşlarının ve vankomisin resistant *S.aureus* (VRSA) suşlarının da rapor edilmeye başlanması, bu konunun önemini giderek artırmaktadır. VISA terimi vankomisin için minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) değeri 8 µgr/ml olan suşlar için, VRSA terimi MIC değerleri 32 µgr/ml'nin üzerinde tespit edilen suşlar için kullanılmaktadır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında Stafilokokların metisilin direncini saptamak için disk diffüzyon, tüp dilüsyon veya mikrodilüsyon, agar tarama, agar dilüsyon, otomatize duyarlılık testleri, DNA hibridizasyon teknikleri ve polimeraz zincir reaksiyonu kullanılmaktadır (Hasbek ve ark 2002).

MRSA'lara hala etkili birkaç antibakteriyel ajandan birisi de mupirosindir. Mupirosin, *Pseudomonas fluorescens* tarafından üretilen doğal bir antibakteriyel ajandır. 1985 yılında klinik kullanıma girmesinden iki yıl sonra ilk dirençli olgu bildirilmiştir. Mupirosin, izolözil-tRNA sentetaz inhibisyonu yoluyla bakteriyel protein sentezini önleyerek etki göstermektedir. Oral ve parenteral uygulandığında iyi absorbe olmakla birlikte metabolik yıkımının hızlı olması nedeniyle topikal kullanımı tercih edilmektedir. Mupirosin özellikle *S.aureus* burun taşıyıcılığının ve deri kolonizasyonunun eradikasyonu için kullanılan, klinik olarak bilinen en etkili antibiyotiktir. Özellikle postoperatif MRSA infeksiyonlarının önlenmesi amacıyla cerrahi öncesi nazal mupirosin uygulamalarının profilaktik olarak faydalı olduğunu ortaya koyan çalışmalar olmakla birlikte, mupirosinin yaygın kullanımı sonucunda dirençte artış izlendiğini bildiren yayınlar da bulunmaktadır (Yiğit ve ark 2008).

1.5. *S. pseudintermedius*'un Moleküler Tanısı

1.5.1. Multiplex PCR

Multiplex PCR, birden fazla primer çifti kullanılarak tek reaksiyonda birçok hedef bölgenin aynı anda çoğaltılması işlemidir. Klasik veya Real-Time PCR'ın modifikasyonu ile iki veya daha fazla farklı PCR amplifikasyonunun aynı reaksiyonda gerçekleştirilmesine dayanır. Klasik PCR ile aynı basamaklarda gerçekleşir fakat her bir

reaksiyonda çoklu primer setleri kullanılır. Multiplex PCR ile daha az zamanda daha çok hedef bölge amplifikasyonu gerçekleştirildiğinden kullanışlı bir inceleme yöntemidir. Fakat önemli derecede optimizasyon gerektirir. Değişik hedeflerin aynı reaksiyon şartlarında amplifikasyonunu sağlamak için kullanılacak primerlerin dikkatli seçilmesi, annealing ısılarının birbirine uygun olması, birbirleriyle dimerizasyona girmemeleri gibi bazı önemli şartların gerçekleştirilmesi gereklidir. Farklı primer çiftlerinin en iyi konsantrasyonlarının seçimi ve non spesifik amplifikasyonların önlenmesi birçok deneme gerektirir (Solyman ve ark 2013).

1.5.2. Multilokus Dizi Tipleme (Multilocus Sequence Typing, MLST)

MLST, moleküler biyolojide kullanımı giderek artan ve mikroorganizmaya ait birden çok lokusun tiplendirilmesinde kullanılan bir tekniktir. Yöntem ilk olarak 1990 yılında Prof. Dr. Brian Spratt, Martin Maiden, Dominique Caugant, Ian Feavers ve Mark Achtman tarafından geliştirilmiştir. MLST, temel metabolik fonksiyonu kodlayan “house-keeping” genlerdeki değişikliğin DNA dizi analizi ile gösterilmesidir. Yedi “housekeeping” genin yaklaşık 450-500 baz çiftlik fragmentlerinin dizi analizi çıkarılmaktadır. Örneğin *S. aureus* için bu genler ve kodladığı proteinler; *arcC*, karbamat kinaz; *aroE*, shikimate dehydrogenase; *glp*, gliserol kinaz; *gmk*, guanilat kinaz; *pta*, fosfat asetiltransferaz; *tpi*, triosephosphate isomerase ve *yqiL*, asetil koenzim A asetiltransferaz’dır (Maiden ve ark 1998). Hedef gene ait her bir lokus için, her farklı dizilim farklı bir allel numarası ile gösterilmekte ve böylece suşa ait bir allelik profil tanımlanmaktadır. Tanımlanan allelik profiller, dizi tipi (sequence type=ST) olarak ifade edilmektedir. Belirlenen allelik profiller, MLST veri bankasındaki bilinen allellerle kıyaslanarak, tespit edilen allel profilinin diğer ülkelerdeki yaygınlık derecesi hakkında bilgi edinmek mümkün olabilmektedir. Elektronik ortamda saklanabilir verilerin oluşturulabilmesi MLST’nin en önemli avantajlarından birisidir. Bu sayede yeni izolatlar daha öncekilerle kolay bir şekilde karşılaştırılabilmekte ve verilerin daha kolay paylaşımı mümkün olabilmektedir (Maiden ve ark 1998).

Bir MLST çalışması için öncelikle kültür veya numunenin hazırlanması gerekmektedir. Sonra sırası ile DNA izolasyonu, MLST genlerinin PCR ile amplifikasyonu, PCR ürünlerinin saflaştırılması, dizi analizi ve sonuçların bilgisayar ortamında sorgulanması gerekmektedir. MLST çok fazla avantaja sahip olmasına rağmen

çeşitli zorluklara da sahiptir. Bu zorlukların başında 7 allel üzerinde çok düşük hata oranına sahip dizi analizi yapma zorunluluğu gelmektedir. Çoğu laboratuvar için bunları sağlayabilmek oldukça pahalı ve zaman alan bir süreçtir. Dizi analiz cihazları sıklıkla otomatize sistemlerdir ve bu sebeple pahalıdırlar (Maiden ve ark 1998).

1.5.3. PCR- Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

Bannoehr ve ark (2009), PCR-restriction fragment length polymorphism ile *S. pseudintermedius*'un identifikasyonunu ilk kez rapor etmişlerdir. Bu metod, *S. pseudintermedius*'un, *Staphylococcus intermedius* gruptaki benzer üyelerden ve insan ve hayvanlarda hastalık oluşturabilen diğer önemli Stafilokoklardan ayırma olarak sağlamaktadır. Sasaki ve ark (2005) *S. intermedius*'u diğer SIG türlerinden biyokimyasal olarak ayırt edebilmiş fakat *S. pseudintermedius*'u *S. delphini*'den ayırt etmeye yarayacak fenotipik belirleyicileri bulamamıştır ve bu yüzden DNA gen dizilimine gerek duyulmuştur. *S. pseudintermedius*'un izolatlarının klinik olarak ayırma için yeni bir metod ihtiyacı olduğundan Bannoehr ve ark (2009), farklı ülkelerdeki laboratuvarlarca onaylanmış hızlı, basit ve güçlü bir PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) metodu geliştirmiştir. Daha önceki SIG izolatlarında yapılan genetik çalışmalar 104 izolat içinde 5 gen lokusundaki dizilim farkını araştırmışlardır.

Yapılan son çalışmalarda fosfoasetiltransferaz enzimini kodlayan *pta* geninin fragmentinin dizilim analizlerinde tüm *S. pseudintermedius* izolatlarında *MboI* fragmentinin bulunduğu, *S. intermedius* ve *S. delphini* izolatlarında ise bulunmadığı gözlenmiştir. Buna dayalı olarak basit ve ekonomik bir PCR-RFLP testi dizayn edilmiştir (Bannoehr ve ark 2009).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Örneklerin Toplanması

İzmir'in Selçuk ilçesinden farklı yaş, ırk ve cinsiyetteki köpeklerin kulak muayeneleri yapılarak sağlıklı ve otitis eksterna olduğu düşünülen 100 köpekten kulak swabı alındı. Alınan örnekler Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına soğuk zincirde getirildi. Swap örnekleri ekim yapılmaya kadar +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

2.2. Stafilokok Şüpheli Bakterilerin Belirlenmesi

Laboratuvara getirilen örnekler %5 koyun kanlı agara ekim yapılarak 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda üreyen bakterilerin oluşturdukları kolonilerin yapısı ve hemoliz özellikleri de incelenerek Stafilokok şüpheli kolonilerden gram boyama yapıldı.

Gram pozitif, kok şekilli koloniler tekrar %5 koyun kanlı agara ekilip inkübasyona bırakılarak saflaştırma yapıldı. Saflaştırılmış bakterilere katalaz testi yapıldı. Bu test için besiyerinde üreyen kolonilerden steril öze ile alınıp temiz bir lam üzerine aktarıldıktan sonra üzerine 1-2 damla %3'lük H₂O₂ damlatıldı. Katalaz enzimi oluşturan bakteriler H₂O₂'i su ve oksijene ayırdığı için ortamdaki oksijen çıkışı kabarcık oluşumu ile belirlendi. Bu nedenle test sonucu kabarcıklar meydana geldiğinde katalaz pozitif, kabarcıklar oluşmadığında ise katalaz negatif olarak değerlendirildi. *Streptococcus spp.* katalaz negatif, *Micrococcaceae* familyasındaki *Micrococcus spp.* ve *Staphylococcus spp.* ise katalaz pozitifdir (Murray, 2007).

Katalaz testi pozitif olan bakterilere koagülaz testi uygulandı. Temiz bir lam üzerine bir damla tavşan plazması damlatıldıktan sonra besiyerindeki kolonilerden steril öze ile alınıp ezildi. Kümeleşme ve pıhtı oluşumu pozitif olarak değerlendirildi. Toplanan materyallerden izole edilen Stafilokok şüpheli koloniler, makroskopik ve mikroskopik morfolojileri ve biyokimyasal özellikleri değerlendirilerek *Koagülaz Pozitif Stafilokoklar* belirlendi.

2.3. *S. pseudintermedius*'un PCR-RFLP Metoduyla İdentifikasyonu

2.3.1. Stafilocokal DNA Ekstraksiyonu

İzole edilen *Koagulaz Pozitif Stafilokok* suşlarında DNA izolasyonu için kaynatma yönteminden yararlanıldı. Bir öze dolusu saf koloni alınarak, 500 mikrolitrelik DNase-RNase free ependorf tüpünde deiyonize su ile süspanse edildi. Süspansiyon 100°C'de 10 dk kaynatıldıktan sonra 10 000 rpm de 10 dk santrifüj edildi. Üstte kalan sıvıdan 300 mikrolitre alınarak PCR amplifikasyonunda hedef DNA olarak kullanılmak amacı ile -20°C'de bekletilmiştir.

2.3.2. Primerler

pta_forward primer: AAA GAC AAA CTT TCA GGT AA

pta_reverse primer: GCA TAA ACA AGC ATT GTA CCG

213 bp ve 107 bp bantları *S. pseudintermedius* için pozitifdir.

2.3.3. Standart Suş

Staphylococcus pseudintermedius pozitif suşlar Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından temin edilmiştir.

2.3.4. PCR Karışımı

PCR 50 µl'lik final hacimde, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 U *Taq* DNA Polymerase, her bir dNTP'den 200 µM, 5 µl PCR buffer (1×), 4 µl template DNA and f1 ve r1 primerlerin herbirinden 0.2 µM (pta_f1, AAA GAC AAA CTT TCA GGT AA, and pta_r1, GCA TAA ACA AGC ATT GTA CCG) olacak şekilde eklenerek pta geninin 320 bp'lik fragmentini amplifiye etmek için kullanılacak PCR karışımı hazırlandı.

2.3.5. Amplifikasyon Koşulları

PCR amplifikasyon koşulları: 95°C'de 2 dk başlangıç denatürasyonu, ardından 95°C'de 1 dk, 53°C'de 1 dk, 72°C'de 1 dk olmak üzere 30 siklusu ve 72°C'de 7 dk final ekstensiyon aşamasını içermektedir.

2.3.6. RFLP

S. pseudintermedius'un identifikasyonuna spesifik pta geninin 213 bp ve 107 bp'lik iki fragmentini belirlemek için, amplifiye edilen PCR ürünü 5 U *MboI* enzimi ile 37°C'de 2 saat kesildi.

2.3.7. DNA Agaroz Jel Elektroforezi

Örnekler 20 cm'lik %1.5'luk agaroz jelde, 50 Volt'ta 1 saat elektroforez edildi.

2.4. Disk Difüzyon Metodu ile Antibiyotik Duyarlılığının Belirlenmesi

Bakterilerin metisilin, mupirosin ve vankomisine karşı duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon tekniği ile Mueller Hinton agarda araştırıldı. *S. pseudintermedius* suşlarının %5 koyun kanlı agardan sıvı besiyerine pasajları yapılarak 0,5 McFarland'a uygun süspansiyonlar hazırlandı. Bakteri süspansiyonu steril eküvyon ile besiyerinin yüzeyine yayıldı. Antibiyotik diskleri yerleştirildi ve inkübasyona bırakıldı. Zon çapları ölçülerek antibiyotik duyarlılıkları değerlendirildi. Antibiyotik diski olarak Oxoid® Methicillin 5 mg, Oxoid® Mupirosin 200 mg ve Oxoid® Vancomycin 5 mg kullanıldı.

3. BULGULAR

3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

S. pseudintermedius izolasyonu için, İzmir ili Selçuk ilçesindeki farklı ırk, yaş ve cinsiyetteki köpeklerin kulakları muayene edilip, sağlıklı ve otitis eksterna olduğu düşünülen köpeklerin sağ ve sol kulaklarından jelli svaplar ile toplam 100 adet örnek alındı. Bu örnekler Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Rutin Teşhis Laboratuvarında incelendi. Besi yerlerine ekimleri yapıldıktan sonra 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılarak izole edilen Stafilokok şüpheli kolonilerin identifikasyonu için Gram boyama ve katalaz testi yapıldı. Gram pozitif kok şekilli ve katalaz pozitif olarak değerlendirilen suşlara koagülaz testi uygulanarak *Koagülaz Pozitif Stafilokoklar* belirlendi. Bu suşlar saflaştırılarak PCR’da kullanılmak üzere kaldırıldı. Sağlıklı ve otitis eksternalı köpeklerin kulaklarında üreyen Stafilokok türü bakterilerin lezyon bulunup bulunmamasına göre değerlendirilmesi Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Sağlıklı ve otitis eksternalı köpeklerden izole edilen suşlarda identifikasyon bulguları

	Deri örnekleri	
	Sağlıklı (58 örnek)	Otitis eksternalı (42 örnek)
<i>Staphylococcus spp.</i>	24	18
<i>Koagülaz pozitif Staphylococcus sp.</i>	15	4

Çalışma için toplanan 100 örneğin; 58 tanesi otitis eksternalı, 42 tanesi ise sağlıklı köpeklerin kulaklarına aittir. Yapılan ekimler sonucunda; otitis eksternaya ait 58 suştan 3 tanesinde *Proteus spp.* gözlenirken, 18 tanesinde mantar/maya etkeni gözlenmiştir. 42 sağlıklı köpeğin kulaklarına ait suşlarda ise; 34 tanesinde bakteriyolojik üreme gözlenirken, diğer 8 tanesinde üreme olmadığı saptanmıştır.

Sonuç olarak çalışmada toplam 100 örnekte 74 bakteriyolojik üreme gözlenmiştir. Bakteriyolojik üreme gözlenen 74 örnekte yapılan fiziksel ve biyokimyasal testler sonucunda; 42’sinin Gram (+) kok ve katalaz (+), diğer 32 tanesinin ise Gram (-) bakteriler olduğu tespit edilmiştir. 58 tanesi sağlıklı ve 42 tanesi otitis eksternalı köpeklerden

toplanan 100 adet örneğin 42 tanesi *Staphylococcus sp.* olarak izole edilmiştir. Stafilocok olduğu belirlenen 42 örnekten 19 tanesi koagulaz testi ile pozitif bulunmuştur. Sağlıklı hayvanlardan toplam izole edilen 24 adet örneğe karşılık lezyonlu kulak örneklerinden toplam 18 adet Stafilocok izole edilmiştir. 24 örnekten 15 tane ve 18 örnekten ise 4 tane olmak üzere toplam 19 adet *Koagulaz Pozitif Staphylococcus spp.* gözlenmiştir. Bu verilere dayanılarak sağlıklı köpek kulaklarından izole edilebilen *Koagülaz Pozitif Stafilocok* sayısının otitis eksternalı köpek kulaklarından izole edilebilen *Koagülaz Pozitif Stafilocok* sayısından 3.75 kat fazla olduğu gözlenmiştir. Sağlıklı hayvanlardan daha fazla *Koagülaz Pozitif Stafilocok* izole edilebildiği anlaşılmıştır.

3.1.2. PCR-RFLP Sonuçları

Şüpheli Stafilocok suşlarında *pta* genini amplifiye eden primerler kullanılarak elde edilen PCR ürününün *MboI* enzimiyle kesilerek yapılan PCR-RFLP sonucunda 19 adet *Stafilocok* suşunun 6 tanesi *S. pseudintermedius* olarak bulundu. Otitis eksternalı köpeklerden elde edilen örneklerden bir tanesinde *S. pseudintermedius* tesbit edilirken sağlıklı kulak örneklerinden 9 tanesi *S. pseudintermedius* pozitif bulunmuştur.

Bu çalışmada toplam 100 örnekten 6 tanesi *S. pseudintermedius* pozitif bulunmuştur. *S. pseudintermedius* pozitif olanların 5 tanesi sağlıklı köpekte, bir tanesi ise otitis eksternalı köpekte saptanmıştır.

3.2. Antibiyogram Sonuçları

PCR-RFLP sonucu *S. pseudintermedius* olarak tanımlanan 6 suşa Kirby-Bauer disk difüzyon tekniği kullanılarak antibiyotik duyarlılık testi yapıldı. Zon çapları ölçülerek CLSI standartlarına göre değerlendirildi. CLSI standartlarına göre metisilin için ≥ 14 mm zon çapı duyarlı, 10-13 mm zon çapı orta duyarlı, ≤ 9 mm zon çapı dirençli olarak kabul edildi. Mupirosin için ≥ 14 mm zon çapı duyarlı, ≤ 13 mm zon çapı dirençli olarak kabul edildi. Vankomisin için ise ≥ 15 mm duyarlı olarak kabul edilmiştir. İzole edilen 6 suşun (%100) metisiline ve mupirosine duyarlı olduğu, 6 suştan 3'ünün (%50) vankomisine dirençli olduğu gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. *S. pseudintermedius* suşlarına ait antibiyotik duyarlılık testi sonuçları

	Metisilin	Mupirosin	Vankomisin
Duyarlı	6 (%100)	6 (%100)	3 (%50)
Dirençli	0 (%0)	0 (%0)	3 (%50)

4. TARTIŞMA

S. pseudintermedius köpeklerin deri ve mukoz membranlarında kommensal olarak bulunmakta ve köpeklerde piyoderma, endometritis, sistitis, otitis eksterna gibi çeşitli infeksiyonlara yol açmaktadır. *S. pseudintermedius*, *S. intermedius*'tan farklı bir *Koagülaz Pozitif Stafilokok* türü olarak tanımlanmıştır. Son zamanlara kadar canine otitis eksterna ve pyoderma vakalarının çoğundan *S. intermedius*'un sorumlu olduğu düşünülmekteydi. Son yıllarda gen teknolojisi kullanılarak yapılan çalışmalar *S. intermedius* olarak identifiye edilen izolatların aslında *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* ve *S. delphini* olmak üzere üç farklı türden oluştuğunu göstermiştir ve *S. intermedius* grup (SIG) olarak adlandırılmıştır. Böylece canine pyoderma ve canine otitis eksternalarının yaygın patojeninin aslında *S. intermedius* değil *S. pseudintermedius* olduğu ortaya çıkmıştır.

Sasaki ve ark (2005), *S. intermedius*'u biyokimyasal metodlarla diğer SIG üyelerinden ayırmış ancak *S. pseudintermedius* ve *S. delphini* ayrımını yapmak için gerekli fenotipik belirleyicileri tanımlayamamışlardır.

Hariharan ve ark (2014), 66 köpek piyoderma vakasından toplam 116 bakteriyel izolat elde etmişlerdir. Her bir vakadan alınan izolatların sayısı saf bir koloniden 4 farklı koloni tipine kadar değişiklik göstermiştir. 66 vakadan 21'ini (%31.8) saf kültür olarak elde etmişlerdir. Toplam 116 izolattan 62'si (%53.5) Gram pozitif ve 54'ü (%46.5) Gram negatiftir. Yaptıkları çalışmaya göre en fazla izole edilen Gram pozitif bakteri Stafilokoklardır. 43 Stafilokok infeksiyonundan 18 tanesini (%41.9) saf kültür olarak 25 tanesini ise (%58.1) mix infeksiyonlar şeklinde izole etmişlerdir. API strips ile 29 tane olarak buldukları *S. pseudintermedius* izolatlarını Multiplex PCR ile tekrar test ettiklerinde 27 tanesinin *S. pseudintermedius*, 1 tanesinin *S. aureus* ve 1 tanesinin de *S. schleiferi subsp. coagulans* olduğunu keşfetmişlerdir. Fenotipik olarak daha önce *S. intermedius* olarak bulunan ancak M-PCR ile *S. aureus* olduğu bulunan suşa *rpoB* gen dizilimi yöntemi uygulanmış ve aslında *S. pseudintermedius* olduğunu gözlemlemişlerdir. Metisilin direncine rastlamamışlardır. Daha önceden tetrasiklin tedavisi uygulanmış bir suşta tetrasiklin direnci tesbit etmişler, diğer antibiyotiklere karşı direnç gözlememişlerdir.

Bannoehr ve ark (2009), *S. pseudintermedius*'un identifikasyonunda ilk kez PCR-RFLP yöntemini geliştirmişlerdir. *MboI* enzimi ile 213 bp ve 107 bp'lik *pta* geninin *MboI*

fragmentini keserek PCR ile amplifiye etmişlerdir. Blaiotta ve ark (2005), *katA* gen lokusu ile PCR-RFLP kullanmışlardır.

Sasaki ve ark (2005), *nuc* gen lokusunu hedefleyen M-PCR metodunu kullanarak başarıyla *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi subsp. coagulans*, *S. delphini* group A, *S. hyicus*, *S. pseudintermedius* ve *S. delphini* group B'yi birbirinden ayırt edebilmişlerdir.

S. pseudintermedius kolonizasyonu köpeklerde yaygındır. Bununla birlikte *S. pseudintermedius* infekte veya kolonize petlerden insanlara geçebilmektedir. *S. pseudintermedius* son yıllarda metisiline olan direnci, vertikal ve türler arası geçişleriyle önemli Stafilokok türleri arasında yer almaktadır. İnsanlarda SIG infeksiyonları nadiren görülmektedir.

Hoovals ve ark (2006), bir insanda *S. pseudintermedius*'a ait ilk klinik raporu yayınlamıştır. Fenotipik testlerle Stafilokok olarak tanımladığı suşa *nuc* ve koagülaz genleri için PCR uygulamış ve negatif çıkmıştır. PCR'da *S. aureus*'a spesifik *tuf* geni bulunmuştur. Ardından 16S rRNA gen dizilimi analizi yaptığında *S. pseudintermedius* olduğunu keşfetmiştir. Bu suşu *mecA* geni bakımından negatif bulmuştur. Chuang ve ark (2010), bir köpek sahibinde kateterleme ile ilişkili bakteremiden *S. pseudintermedius* izole etmiştir. Stegmann ve ark (2010), köpeği, kedisi ve atı olan bir insanda operasyon sonrası operasyon yarasında oluşan purulent infeksiyondan *S. pseudintermedius* izole etmiştir. Riegel ve ark (2011), köpeklerle yakın ilişkisi olan bir insanda kalp pili ile ilişkili purulent endokarditisten *S. pseudintermedius* izole etmiştir.

Özgüneş ve ark (2002), agar tarama, agar dilüsyon, disk difüzyon ve API staph ATB (bioMérieux) yöntemlerini metisilin direncini saptama yönünden birbirleri ile karşılaştırmışlar ve yöntemler arasında metisilin direncini saptama oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamamışlardır. Sünbül ve ark (1998), ise disk difüzyon testinin duyarlılık, özgüllük ve temel uyumunu diğer testlere göre daha yüksek bulmuşlardır.

Diler ve ark (1998), mikrodilüsyon ve agar tarama yöntemini %100 uyumlu bulurken, disk difüzyon testinin iki yöneme göre duyarlılığını %100, özgüllüğünü ise %97,5 olarak saptamışlardır.

Hasbek ve ark (2002), metisilin direnci dikkate alınmaksızın yapılan değerlendirmede en yüksek direnç oranını penisilin G’de (%82,6) gözlemişler ve vankomisine dirençli suş saptamamışlardır. Yiğit ve ark (2008), Stafilokok suşlarında mupirosin direncine rastlamamışlardır.

Çalışmamızda İzmir ili Selçuk ilçesinde sağlıklı ve otitis eksternalı köpeklerden izole ettiğimiz suşlardan fenotipik olarak Stafilokok olarak identifiye ettiğimiz 19 suştan PCR-RFLP sonucu 6 tanesinin *S. pseudintermedius* olduğunu gözlemledik. Toplam 6 örnekten 5 tanesinin sağlıklı köpeklerden alınmış olması *S. pseudintermedius*’un daha çok sağlıklı köpeklerin kulaklarında bulunduğunu göstermektedir. Metisilin ve mupirosin direncine rastlanmazken vankomisin direnci gözlenmiştir.

5. SONUÇ

S. pseudintermedius köpeklerin deri ve mukoz membranlarında kommensal olarak bulunmakta ve köpeklerde piyoderma, endometritis, sistitis, otitis eksterna gibi çeşitli infeksiyonlara yol açmaktadır. *S. pseudintermedius* zaman zaman insanlarda özellikle de petlerle yakın ilişkisi olan veteriner hekimler ve pet sahiplerinde oluşan ciddi infeksiyonlardan izole edilmektedir. *S. pseudintermedius* son yıllarda metisiline olan direnci, vertikal ve türler arası geçişleriyle önemli Stafilokok türleri arasında yer almaktadır. *S. pseudintermedius*'un fenotipik profilleri *S. intermedius* ve *S. delphini* türleriyle benzerlik göstermektedir. *S. pseudintermedius*; koagülaz, b-galaktosidaz, polimiksin B direnci, D mannitol asiti ve asetoin üretimi gibi fenotipik testler ile diğer Stafilokok türlerinden ayrılmaktadır ancak *S. delphini* ile fenotipik ayrımı oldukça zordur. Bu nedenle *S. pseudintermedius*, çeşitli ticari test kitleri ve PCR yöntemleriyle daha doğru bir şekilde belirlenmektedir.

Sonuç olarak çalışmada toplam 100 örnekte 74 bakteriyolojik üreme gözlenmiştir. Bakteriyolojik üreme gözlenen 74 örnekte yapılan fiziksel ve biyokimyasal testler sonucunda; 42'sinin Gram (+) kok ve katalaz (+), diğer 32 tanesinin ise Gram (-) bakteriler olduğu tespit edilmiştir. 58 tanesi sağlıklı ve 42 tanesi otitis eksternalı köpeklerden toplanan 100 adet örneğin 42 tanesi *Staphylococcus spp.* olarak izole edilmiştir. Stafilokok olduğu belirlenen 42 örnekten 19 tanesi koagülaz pozitif bulunmuştur. Sağlıklı hayvanlardan toplam izole edilen 24 adet örneğe karşılık lezyonlu kulak örneklerinden toplam 18 adet Stafilokok izole edilmiştir. 24 örnekten 15 tane ve 18 örnekten ise 4 tane olmak üzere toplam 19 adet *Koagülaz Pozitif Staphylococcus spp.* gözlenmiştir. Bu verilere dayanılarak sağlıklı köpek kulaklarından izole edilebilen *Koagülaz Pozitif Stafilokok* sayısının otitis eksternalı köpek kulaklarından izole edilebilen *Koagülaz Pozitif Stafilokok* sayısından 3.75 kat fazla olduğu gözlenmiştir.

Bu çalışmayla sağlıklı hayvanlarda *Koagülaz Pozitif Stafilokok* yaygınlığının daha fazla olduğu, PCR-RFLP metodu ile *S. pseudintermedius* identifikasyonunun spesifik olarak yapılabildiği, bölgemizde *S. pseudintermedius*'un çok fazla görülmediği ve henüz mupirosin ve metisilin direncinin yaygın olmadığı anlaşılmıştır.

ÖZET

Sağlıklı ve Otitis Eksternalı Köpeklerden *Staphylococcus pseudintermedius* İzolasyonu ve Antibiyotik Dirençliliğinin Belirlenmesi

Stafilokoklar, doğada, insan ve hayvanların derisinde ve muköz dokularında yaygın olarak bulunmaktadır. Fırsatçı patojendirler. Hayvanların ve insanların çeşitli infeksiyonlarından sorumludurlar.

S. pseudintermedius Stafilokoklarla pek çok yönden aynı özelliklere sahiptir. Özellikle köpeklerin kulak kanalında bulunmaktadır. Köpeklerde pyoderma ve otitis eksterna vakalarının çoğundan *S. pseudintermedius* sorumludur. Köpeklerden ve diğer hayvanlardan insanlara geçiş söz konusudur. Nadiren de olsa ciddi hastane infeksiyonlarından izole edilmiştir. Son yıllarda artan metisilin direnci nedeniyle halk sağlığı açısından önemli bir bakteridir.

Çalışmamızda, farklı ırk, yaş ve cinsiyetteki toplam 100 adet sağlıklı ve otitis eksterna olduğu düşünülen köpeklerin kulaklarından *S. pseudintermedius*'un izolasyonu ve identifikasyonunun yapılması, metisilin, mupirosin ve vankomisin direncinin belirlenmesi amaçlanmıştır. İzolasyonu yapılan Stafilokok suşlarına PCR-RFLP yöntemi uygulanarak 19 *Koagulaz Pozitif Stafilokok* suşundan 6 tane *S. pseudintermedius* suşu identifiye edilmiştir. *S. pseudintermedius* pozitif bulunan suşlara antibiyotik duyarlılık testi yapılmıştır. Vankomisin direncine rastlanırken metisilin ve mupirosin direnci gözlenmemiştir. *S. pseudintermedius*'un özellikle sağlıklı köpeklerde bulunduğu anlaşılmıştır.

Anahtar sözcükler: Stafilokok, *S. pseudintermedius*, PCR-RFLP

SUMMARY

Isolation of *Staphylococcus pseudintermedius* from Healthy and Dogs with Otitis Externa and Determination of Antibiotic Resistance

Staphylococci are widely found in nature, skin and mucous membrane of human and animals. They are opportunistic pathogens. They are responsible for various infections of animals and human.

S. pseudintermedius has almost same characteristics with Staphylococci. Especially they are found in the ear canal of dogs. *S. pseudintermedius* is responsible for most of pyoderma and otitis externa cases in dogs. Spreading from dogs and other animals to human is presented. It has been isolated from serious hospital infections rarely. Because of increasing metisilin resistance in recent years, it is an important bacteria for public health.

In our study, it is aimed to detect isolation and identification of *S. pseudintermedius* from ear of dogs, totally 100, in different breed, age and sex, healthy and considered with otitis externa, and aimed to detect methicillin, mupirocin and vancomycin resistance. PCR-RFLP method is applied to isolated Staphylococci and six *S. pseudintermedius* strains identified from nineteen *Koagulaz Positive Staphylococci* strains. Antibiotic sensitivity test applied to the strains which are *S. pseudintermedius* positive. We found vancomycin resistance but no methicillin and mupirocin resistance. It has been conclusived that *S. pseudintermedius* is found in especially healthy dogs.

Keywords: Staphylococci, *S. pseudintermedius*, PCR-RFLP

KAYNAKLAR

- Abbott SL. Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae. Manual of Clinical Microbiology 2007;9:698-711.
- Ahmed LN. Medical and surgical management of canine otitis externa. Iraqi Journal of Veterinary Sciences 2000;13:403-408.
- Akay O, Aslanbey D, Arda M, Candas A, Aydin N, Izgur M, Diker S. Identification and antibiotic sensitivity of microorganisms isolated from dogs with otitis externa. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 1984;31:452-462.
- Aydın N, İzgür M, Diker KS, Yardımcı H, Esendal Ö, Paracıkoğlu J, Akan M. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). Ankara: İlke-Emek Yayınları. 2006;5-13.
- Baba T, Takeuchi F, Kuroda M. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. Lancet 2002; 359: 1819-1827.
- Bannerman TL. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase positive cocci that grow aerobically. In Manual of Clinical Microbiology 2003;8: 384-404.
- Bannoehr J, Franco A, Iurescia M, Battisti A, Fitzgerald J. Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. Journal of Clinical Microbiology 2009;47(2):469-471.
- Bien J, Sokolova O, Bozko P. Characterization of virulence factors of *Staphylococcus aureus*: Novel function of known virulence factors that are implicated in activation of airway epithelial proinflammatory response. Journal of Pathogens 2011;13
- Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 3.Baskı. İzmir: Barış Yayınları; 2002;35.
- Blaiotta G, Casaburi A, Villani F. Identification and differentiation of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus simulans* by species-specific PZR assays of *sodA* genes. Systematic and Applied Microbiology 2005;28(6):519-526.
- Bond R, Loeffler A. What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multidrug resistance. Journal of Small Animal Practice 2012;53: 147-154.
- Briscoe JA, Morris DO, Rankin SC, Hendrick MJ, Rosenthal KL. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* associated dermatitis in a congo african grey parrot (*psittacus erithacus erithacus*). Journal of Avian Medicine and Surgery 2008;22(4):336-343.
- Cengiz AT. *Staphylococcus spp.* Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabı. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999;339-346.

- Chaudhary M, Mirakhur K. K, Jand S. K. Antibigram and microbiological patterns of external ear canal of dogs with reference to otitis. Indian Veterinary Journal 2003;80(9):951-952.
- Chuang C, Yang Y, Huseh P. Catheterrelated bacteremia caused by *Staphylococcus pseudintermedius* refractory to antibiotic-lack therapy in a hemophilic child with dog exposure. Journal of Clinical Microbiology 2010;48:1497-8.
- Devriese LA, Hermans K, Baele M, Haesebrouck F. *Staphylococcus pseudintermedius* versus *staphylococcus intermedius*. Veterinary Microbiology 2009;133(1-2):206-207.
- Diler M, Kocabeyoğlu O, Birinci İ, Erdemoğlu A, Özbek A. Vankomisin ve teikoplaninin metisiline dirençli 252 Stafilokok suşuna etkinliğinin mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılması. ANKEM Dergisi 1998;12:437.
- Ducha SJ, Goszaler C, Rodriguer JF, Moure AD. Infectious otitis in dogs, review and a survey of pathogens involved. Hygia percoris 1981;3:27-35.
- Fitzgerald RJ. The *Staphylococcus intermedius* group of bacterial pathogens: species re-classification, pathogenesis and the emergence of meticillin resistance. Veterinary Dermatology 2009;20:490-495.
- Griffin CE. Otitis Externa. Bonagura JD, Twedt CD, Griffin CE. Kirk's Current Veterinary Therapy XIV. Saunders Elsevier, USAİ;2009:432-453.
- Guardabassi L, Loeber ME, Jacobson A. Transmission of multiple antimicrobial resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. Veterinary Microbiology 2004;98(1):23-27.
- Hasbek M, Hakgüdener Y, Kaya S, Bakıcı MZ. Stafilokoklarda metisilin direncinin farklı yöntemlerle belirlenmesi ve çoğul antibiyotik direnci. C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi 2002;24(4):179 – 184.
- Hariharan H, Gibson K, Peterson R, Frankie M, Matthew V, Daniels J, Martin NA, Andrews L. *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* Subspecies *coagulans* from Canine Pyoderma Cases in Grenada, West Indies, and Their Susceptibility to Beta-Lactam Drugs. Veterinary Medicine International 2014;7-14.
- Hoovels VL, Vankeerberghen A, Boel A. First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human. Journal of Clinic Microbiology 2006;44:4609-12.
- Jacobson LS. Diagnosis and medical treatment of otitis externa in the dog and cat. Journal of the South African Veterinary Association 2002;73(4):162-170.
- Janer ER, Castro C. Prevalence of the different agents of canine otitis externa. Aales de la Facultad de Veterinaria del Uruguay 1984;18-20:115-121.
- Jones D, Collins MD. Irregular, nonsporing Gram-positive rods. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1986.

Jones RD, Kania SA, Rohrbach BW, Frank LA, Bemis DA. Prevalence of oxacillin and multidrug resistant staphylococci in clinical samples from dogs: 1,772 samples (2001-2005). Journal of the American Veterinary Medical Association 2007;230(2):221-227.

Kaynarca S, Türkyılmaz S. Sığır mastitislerinden izole edilen Stafilokoklarda metisilin direnci ve slaym pozitifliği. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2010;16(4):567-572.

Keskin O, Kökçü L, Akan M. Otitis eksternalı köpeklerden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 1999;46:163-168.

Kihyang K, Choi W, Kim K H. Microflora of the ear canal in healthy dogs and dogs with otitis externa. Korean Journal of Veterinary Research 1999;3:566-574.

Kireççi E. Evcil hayvanlarda MRSA taşıyıcılığı. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2009;16(4):45-49.

Koneman E, Winn W, Allen S, Janda W, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5. Editions. Lippincott Williams & Wilkins; 2006.p.625-648.

Kumar A and Attrey DP. Bacterial isolation and antibiotic sensitivity pattern of isolates from cases of otitis. Journal Remount Veterinary Corps 1998;37:11-14.

Kumar A, Singh K, Sharma A. Prevalence of *Malassezia pachydermatis* and other organisms in healthy and infected dogs ears. Israel Journal of Veterinary Medicine 2002; 57(4):399-401.

Leonard FC, Abbott Y, Rossney A, Quinn PJ. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from a veterinary surgeon and five dogs in one practice. Veterinary Record 2006;158(5):155-159.

Leung MJ, Nuttall N, Mazur M, Taddei TL, McComish M, Pearman JW. Case of *Staphylococcus schleiferi* endocarditis and a simple scheme to identify clumping factor positive staphylococci. Journal of Clinical Microbiology 1999;37(10):3353-3356.

Lilenbaum W, Veras M, Blum E, Souza GN. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from otitis externa in dogs. Letters in Applied Microbiology 2000; 31(1):42-45.

Loeffler A, Boag AK, Sung J, Lindsay JA, Guardabassi L, Dalsgaard A, Smith H, Stevns KB, Lloyd DH. Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2005;56(4):692-697.

Loeffler A, Linek M, Moodley A, Guardabassi L, Sung JM, Winkler M, Weiss R, Lloyd DH. First report of multiresistant, *mecA*-positive *Staphylococcus intermedius* in europe:12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in germany. Veterinary Dermatology 2007;18(6):412-421.

- Loeffler A, Pfeiffer DU, Lindsay JA, Soares-Magalhaes R, Lloyd DH. Lack of transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) between apparently healthy dogs in a rescue kennel. *Veterinary Microbiology* 2010;141(1-2):178-181.
- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95(6):3140-3145
- Manian FA. Asymptomatic nasal carriage of mupirocin resistant, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a pet dog associated with MRSA infection in household contacts. *Clinical Infectious Diseases* 2003;36(2):26-28.
- Morgan M. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008;62(6):1181-1187.
- Morris DO, Mauldin EA, O'Shea K, Shofer FS, Rankin SC. Clinical, microbiological, and molecular characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections of cats. *American Journal of Veterinary Research* 2006;67(8):1421-1425.
- Mhatre MD. Studies on etiopathology of bacterial and mycological infections of skin and ear in canines and their clinical management. Master of Veterinary Science Thesis. Anand Agricultural University, Anand. 2005.
- Muckle CA, Menzies PI, Hwang T, Wesenbeek M. Analysis of immunodominant antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Veterinary Microbiology* 1992;30:47-58.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller PA. Laboratory identification of significant isolates. *Medical Microbiology*. Philadelphia: Elsevier Press; 2005.p.203-212.
- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Antimicrobial susceptibility testing. *Manual of clinical microbiology*. Washington DC: ASM Press; 2007.p.390-411.
- Nagase N, Sasaki A, Yamashita K, Shimizu A, Wakita Y, Kitai S, Kawano J. Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. *Journal of Veterinary Medical Science* 2002;64(3):245-250.
- Nair S. Studies on clinico-etio-pathology and therapeutic management of various canine dermatoses. Thesis. Anand Agricultural University, Anand. Gujarat. 2004.
- Oliveira L.C, Medeiros C.M.O, Silva I.N.G, Monteiro A.J, Leite C.A.L, Carvalho C.B.M. Antimicrobial sensitivity of bacteria from otitis externa in dogs. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 2005;57(3):405-408.
- Oliveira LC, Leite CA, Brilhante RS, Carvalho CB. Comparative study of the microbial profile from bilateral canine otitis externa. *The Canadian Veterinary Journal* 2008; 49(8):785-788.

Özgüneş N, Ergen P, Ceylan N, Yazıcı S, Aksoy Y. Yatan hastalardan ve poliklinik hastalarından izole edilen Stafilokok suşlarında metisilin direnci ve dirençli suşlarda glikopeptid duyarlılığı, ANKEM Derg 16(No.4):423-426(2002).

Öztürk D, Avki S, Türütoğlu H, Yiğitarıslan K, Sağnak S. Methicillin resistance among coagulase positive staphylococci isolated from dogs with otitis externa, skin wounds and pyoderma. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2010;16(4):651-656.

Peacock SJ. *Staphylococcus spp.* Microbiology and Microbial Infections 2005;10: 771-832.

Pepin M, Pardon P, Lantier F, Marly J, Levieux D, Lamand M. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs: Kinetics of bacterial dissemination and inflammation. Veterinary Microbiology 1991;26:381-392.

Petrov V, Mihaylov G, Tsachev I, Zhelev G, Marutsov P, Koev K. Otitis externa in dogs microbiology and antimicrobial susceptibility. Revue de Médecine Vétérinaire 2013;164:18-22.

Paul NC, Moodley A, Ghibaudo G, Guardabassi L. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in small animal veterinarians: Indirect evidence of zoonotic Transmission. Zoonoses Public Health 2011;58:533-539.

Quin PJ, Markey BK, Leonard FC, Hartigan P, Fanning S, FitzPatrick ES. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Wiley-Blackwell 2011;2:118-123.

Riegel P, Jesel-Morel L, Laventie B. Coagulase-positive *Staphylococcus pseudintermedius*

from animals causing human endocarditis. International Journal of Medicine Microbiology 2011;301:237-9.

Rubin JE, Trejo MC. Prevalence, sites of colonization, and antimicrobial resistance among *Staphylococcus Pseudintermedius* isolated from healthy dogs in Saskatoon, Canada. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 2011;23: 351.

Ruscher C, Lubke-Becker A, Wleklinski CG, Soba A, Wieler LH, Walther B. Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from clinical samples of companion animals and equidae. Veterinary Microbiology 2008;31.

Sareyyüpoğlu B, Müştak HK, Cantekin Z, Diker KS. Molecular detection of exfoliative toxin in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs with pyoderma. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2013;60:15-19.

Sarıerler M, Kırcan Ş. Microbiological diagnosis and therapy of canine otitis externa. Veterinary Surgery Journal 2004;10(3/4):11-15.

Sasaki A, Shimizu A, Kawano J, Wakita Y, Hayashi T, Ootsuki S. Characteristics of *Staphylococcus intermedius* isolates from diseased and healthy dogs. The Journal of Veterinary Medical Science 2005;67:103-106.

Solyman SM, Black CC, Duim B, Perreten V, Van Duijkeren E, Wagenaar JA, Eberlein LC, Sadeghi LN, Videla R. Multilocus Sequence Typing for Characterization of *Staphylococcus Pseudintermedius*. Journal of Clinical Microbiology 2013;51:306–310.

Stegmann R, Burnens A, Maranta C. Human infection associated with methicillin- resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2010;65:2047-8.

Sünbül M, Eroğlu C, Çınar T, Hokelek M, Leblebicioğlu H. Stafilokok suşlarında vankomisin ve teikoplanin duyarlılığını belirlemede buyyonda mikrodilüsyon ve E-test yöntemlerinin karşılaştırılması, ANKEM Dergisi. 1998;12-483.

Todar K. Typing of *Staphylococcus*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1994.

Tünger A. *Staphylococcus aureus* Mikrobiyoloji, patogenezi ve epidemiyoloji. In: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Gram-Pozitif Bakteri Enfeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004.p.9-68.

Uchida Y, Nakade T, Otomo K, Yamane Y, Higashitsutsumi M. Efficacy of a pimaricin suspension for treating otitis externa associated with *M. pachydermatis*. Journal of Small Animal Practice 1994;35(10):521-523.

Udegbunam SO, Udegbunam RI, Anyanwu MU. Occurrence of Staphylococcal Ocular Infections of Food Producing Animals in Nsukka Southeast, Nigeria. Veterinary Medicine International 2014;52:80-84.

Vikas K, Pal D, Aggarwal A. Antibigram of microorganisms isolated from ears of dogs having otitis externa. Indian Veterinary Journal 2003;80(12):1316-1317.

Vitale CB, Gross TL, Weese JS. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in cat and owner. Emerging Infectious Diseases journal 2006;12(12):1998-2000.

Yamashita K, Shimizu A, Kawano J, Uchida E, Haruna A, Igimi S. Isolation and characterization of staphylococci from external auditory meatus of dogs with or without otitis externa with special reference to *Staphylococcus schleiferi subsp. coagulans* isolates. The Journal of Veterinary Medical Science 2005;67(3):263-268.

Yassin AF, Kroppenstedt RM, Ludwig W. *Corynebacterium ureicelerivorans* sp. nov., a lipophilic bacterium isolated from blood culture. International Journal of Systemic Evolution Microbiology 2003;53:705-9.

Yiğit N, Aktaş AE, Doğruman F. Klinik örneklerden izole edilen Stafilokokların metisilin, fusidik asit ve mupirosin direnci. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 2008;65(1):17-23.

Yoshida N, Naito F, Fukata T. Studies of certain factors affecting the microenvironment and microflora of the external ear of the dog in health and disease. The Journal of Veterinary Medical Science 2002;64:1145-1147.

Zubeir IE, Kanbar T, Alber J, Lammler C, Akineden O, Weiss R, Zschock M. Phenotypic and genotypic characteristics of methicillin/oxacillin resistant *Staphylococcus intermedius* isolated from clinical specimens during routine veterinary microbiological examinations. *Veterinary Microbiology* 2007;121(1-2):170-176.

ÖZGEÇMİŞ

1984’te Tire’de doğdu. 2002’de girdiği Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nden 2007’de mezun oldu. 2010’dan bu yana Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitimini sürdürmektedir. 2010 yılından bu yana İzmir ili Selçuk ilçesinde Efes Veteriner Kliniği’nde sorumlu veteriner hekim olarak mesleğini sürdürmektedir. Evli olup, yabancı dil olarak “İngilizce” bilmektedir.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca ilgi, yardım ve hoşgörülerini benden esirgemeyen ADÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi danışmanım Doç. Dr. Serap SAVAŞAN'a, Yrd. Doç. Dr. Uğur PARIN'a, Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine, beni destekleyen aileme ve eşim Ferhat KOCATEPE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.