



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİK-YL-2014-004

**SAĞLIKLI VE OTİTİS EKSTERNALI KÖPEKLERDEN
İZOLE EDİLEN *STAPHYLOCOCCUS INTERMEDIUS* 'UN
EKSFOLIATİF TOKSİNİNİN BELİRLENMESİ**

Biyolog Özgenur YILMAZ

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Serap SAVAŞAN**

AYDIN-2014

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİK-YL-2014-004**

**SAĞLIKLI VE OTİTİS EKSTERNALI KÖPEKLERDEN
İZOLE EDİLEN *STAPHYLOCOCCUS INTERMEDIUS* 'UN
EKSFOLIATİF TOKSİNİNİN BELİRLENMESİ**

Biyolog Özgenur YILMAZ

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Serap SAVAŞAN**

AYDIN-2014

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

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Biyolog Özgenur YILMAZ tarafından hazırlanan “SAĞLIKLI VE OTİTİS EKSTERNALI KÖPEKLERDEN İZOLE EDİLEN *STAPHYLOCOCCUS INTERMEDIUS*’UN EKSFOLİYATİF TOKSİNİNİN BELİRLENMESİ” başlıklı tez, 04/07/2014 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi :

İmzası:

1- Prof. Dr. Osman KAYA

ADÜ, Veteriner Fakültesi

.....
.....

2- Prof. Dr. Ergün Ö. GÖKSOY

ADÜ, Veteriner Fakültesi

.....
.....

3- Doç. Dr. Serap SAVAŞAN

ADÜ, Veteriner Fakültesi

.....
.....

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

Prof. Dr. Sacide KARAKAŞ
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

Otitis, köpeklerde özellikle küçük hayvan kliniklerinde yaygın olarak karşılaşılan hastalıklardandır. Otitis eksterna, dış kulak yolunun akut ya da kronik yangısı olarak tanımlanan, multifaktöriyel etiyojolojiye sahip ve köpeklerde hastalıkların %5-20'sini oluşturan inatçı, kronik olgularda tedavisi güç bir hastalıktır.

Otitis eksterna hastalığının hazırlayıcı sebepleri arasında; ısı, rutubet, kulak kirliliği, yaş, cinsiyet, ırk, travma, aşırı duyarlılık, otoimmün hastalıklar, anatomik yapı, pH, kulak akarları ve yabancı cisimler yer almaktadır. Çoğu olgularda bakteriyel infeksiyonlar sekonder olarak gelişmektedir. Otitis eksterna vakalarında en sık rastlanılan bakteriyel etkenler; *Staphylococcus intermedius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella spp.*, *Bacillus spp.*, *Serratia spp.*, *Corynebacterium spp.* ve *Escherichia coli*'dir.

Staphylococcus intermedius, otitis eksterna ve piyodermalı köpeklerden çoğunlukla izole edilen stafilokok türleri arasında yer almaktadır. Ayrıca sağlıklı köpeklerin ağız, kulak, burun, farenks ve anüslerinden de izole edilebilirler.

Son yıllarda *S. intermedius*'un nozokomiyal ve toplum kökenli infeksiyon etkenleri arasındaki önemi gün geçtikçe artmaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalarda toksin üretimi, süperantijen olma özelliği ile zoonotik öneme sahip bir mikroorganizma olduğu bildirilmiştir. *S. intermedius*'un ürettiği toksinlerden en önemlisi, epidermolitik bir toksin olan eksfoliyatif toksin (SIET) dir.

Yapılan çeşitli çalışmalarda otitis eksternalı köpeklerden izole edilen *S. intermedius* suşları, PZR metoduyla genotipik olarak araştırıldığında; eksfoliyatif toksini kodlayan *siet* geninin varlığının klinik semptomlarda rolü olduğu bildirilmiştir. Ayrıca araştırmacılar, sağlıklı köpeklerden izole edilen *S. intermedius* suşlarında da eksfoliyatif toksini kodlayan *siet* genini tespit etmişlerdir.

Araştırmamızda *S. intermedius*'un *siet* geninin PZR tekniğiyle belirlenmesi, eksfoliyatif toksinin sağlıklı köpeklerle, otitis eksternalı köpekler arasındaki oranının karşılaştırılması, söz konusu etkenle mücadelede araştırmacılara önemli bilgiler sunacağı düşünülmektedir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY SAYFASI	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ÇİZELGELER	vii
ŞEKİLLER	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	2
1.1.1. Otitis Eksterna	2
1.2. Otitis Eksterna Hastalığında Sık İzole Edilen Bakteriyel Etkenler	5
1.2.1. <i>Pseudomonas spp.</i> Türleri	5
1.2.2. <i>Corynebacterium spp.</i> Türleri	6
1.2.3. <i>Escherichia coli</i>	7
1.2.4. <i>Klebsiella spp.</i> Türleri	8
1.2.5. <i>Proteus spp.</i> Türleri	8
1.2.6. Stafilokoklar	8
1.2.6.1. Genel Bilgiler	8
1.2.6.2. Tarihçe	9
1.2.6.3. Sınıflandırma	9
1.2.6.4. Morfolojik ve Kimyasal Özellikleri	11
1.2.6.4.1. Görünüm ve Boyanma	11
1.2.6.4.2. Üreme ve Kültür Özellikleri	11
1.2.6.4.3. Biyokimyasal Özellikleri	11
1.2.6.4.4. Genom Yapısı	12
1.2.6.5. Virulans ve Patojeniteleri	12
1.2.6.5.1. Kapsül	12
1.2.6.5.2. Hücre Duvarı	13
1.2.6.5.2.1. Peptidoglikan Tabaka	13
1.2.6.5.2.2. Teikoik Asit	13
1.2.6.5.2.3. Yüzey Proteinleri	14
1.2.6.5.3. Toksinler	14
1.2.6.5.3.1. Sitolitik Toksinler	14

1.2.6.5.3.1.1. Hemolizinler	15
1.2.6.5.3.1.2. Lökosidin (Panton-Valentine Toksin)	15
1.2.6.5.3.2. Enterotoksin	16
1.2.6.5.3.3. Eksfoliatif Toksin (Eksfoliatin)	16
1.2.6.5.3.4. Toksik Şok Sendromu Toksini-1 (TSST-1)	16
1.2.6.5.4. Enzimler	16
1.2.6.5.4.1. Katalaz	16
1.2.6.5.4.2. Koagulaz	17
1.2.6.5.4.3. Lipaz	17
1.2.6.5.4.4. Hiyalüronidaz	17
1.2.6.5.4.5. Fibrinolizin (Stafilokinaz)	17
1.2.6.5.4.6. Deoksiribonükleaz	18
1.2.6.5.4.7. Beta-laktamaz (Penisilinaz)	18
1.2.6.5.4.8. Slime Faktör	18
1.2.6.6. Epidemiyoloji	18
1.2.6.7. Stafilokokların Neden Olduğu İnfeksiyonlar	18
1.2.6.8. Stafilokoklarda Metisilin Direnci	21
1.2.6.8.1. Metisilin Direncini Etkileyen İnternal Faktörler	22
1.2.6.8.1.1. Belirli Uzunluktaki Glikan Zincirleri	22
1.2.6.8.1.2. Normal Peptid Konfigürasyonu İçin Gerekli Kök Peptidler	23
1.2.6.8.1.3. İntakt Olmak İçin Gerekli Pentaglisin Çapraz Köprüleri	23
1.2.6.9. Otitis Eksterna Vakalarına Neden Olan Stafilokok Türleri	23
1.2.6.9.1. <i>S. aureus</i>	23
1.2.6.9.2. <i>S. schleiferi subsp. schleiferi</i> ve <i>S. schleiferi subsp. coagulans</i>	25
1.2.6.9.3. <i>S. pseudintermedius</i>	25
1.2.6.9.4. <i>S. intermedius</i>	27
1.3. Sağlıklı Köpeklerin Dış Kulak Yollarından İzole Edilen Bakteriler	30
1.3.1. <i>Staphylococcus spp.</i>	30
1.3.2. Koagulaz Pozitif Stafilokoklar	31
1.3.3. Koagulaz Negatif Stafilokoklar	31
1.3.4. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	31
1.3.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
1.3.6. <i>Streptococcus spp.</i>	32
2. GEREÇ VE YÖNTEM	33

2.1. Örneklerin Toplanması	33
2.2. Stafilokok Şüpheli Bakterilerin Belirlenmesi	34
2.3. <i>S. intermedius</i> ' un PZR Metoduyla İdentifikasyonu	34
2.3.1. Stafilokokal DNA Ekstraksiyonu	34
2.3.2. Primerler	35
2.3.3. Standart Suş	35
2.3.4. PZR Karışımı	35
2.3.5. Amplifikasyon Koşulları	35
2.3.6. DNA Agaroz Jel Elektroforezi	36
2.4. <i>S. intermedius</i> 'un Eksfoliatif Toksinin PZR Metoduyla Belirlenmesi	36
2.4.1. Primerler	36
2.4.2. Standart Suş	36
2.4.3. PZR Karışımı	36
2.4.4. Amplifikasyon Koşulları	37
2.4.5. DNA Agaroz Jel Elektroforezi	37
3. BULGULAR	38
3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	38
3.2. PZR Sonuçları	40
4. TARTIŞMA	42
5. SONUÇ	45
ÖZET	47
SUMMARY	48
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	64
TEŞEKKÜR	65

SİMGELER VE KISALTMALAR

EMB Agar:	(Eosin Methylene Blue Agar)
XLD Agar:	(Xylose Lysine Deoxycholate Agar)
TSI Agar:	(Triple Sugar Iron Agar)
KNS:	(Koagulaz Negatif Stafilokoklar)
KPS:	(Koagulaz Pozitif Stafilokoklar)
PZR:	(Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
NAG:	(N-Asetil Glukozamin)
NAMA:	(N-Asetil Muramik Asit)
PBP:	Penisilin Bağlayıcı Protein
cAMP:	Siklik Adenozin Monofosfat
IL:	İnterlökin
Ig:	İmmunoglobulin
Luk-I:	Leucotoksin-I
MRSA:	Metisilin Dirençli <i>S. aureus</i>
MSS:	Metisiline Hassas Stafilokok
STSS:	Stafilokokal Toksik Şok Sendromu
SSSS:	Stafilokokal Haşlanmış Deri Sendromu
TSST-1:	Toksik Şok Sendromu Toksin-1
ETEC:	Enterotoksijenik <i>E. coli</i>
EPEC:	Enteropatojenik <i>E. coli</i>
EHEC:	Enterohemorajik <i>E. coli</i>
EIEC:	Enteroinvaziv <i>E. coli</i>
SIG:	<i>S. intermedius</i> grup
SPA:	Staphylokokkal Protein A
SCC:	Staphylococcal Chromosomal Cassette (Stafilokokkal Kaset Kromozomu)
PVL:	Panton-Valentine Lökosidin

ÇİZELGELER

		Sayfa
Çizelge 1.	Koagulaz pozitif stafilocoklar ve klinik önemleri	19
Çizelge 2.	Hayvanlardan izole edilen koagulaz negatif stafilocoklar	20
Çizelge 3.	Köpek ve kedilerden izole edilen koagulaz pozitif stafilocok türlerinin fenotipik identifikasyonu	28
Çizelge 4.	<i>S. intermedius</i> <i>nuc3</i> ve <i>nuc4</i> genleri 431 bp'lik segmentlerini spesifik olarak amplifiye eden primerler	35
Çizelge 5.	<i>S. intermedius</i> 'un <i>siet1</i> ve <i>siet2</i> genleri 145 bp'lik segmentlerini spesifik olarak amplifiye eden primerler	36
Çizelge 6.	Otitis eksterna ve sağlıklı köpeklerden izole edilen suşlarda izolasyon bulguları	39
Çizelge 7.	Otitis eksterna ve sağlıklı köpeklerden izole edilen suşlarda identifikasyon bulguları	39

ŞEKİLLER

		Sayfa
Şekil 1.	<i>S. intermedius</i> 'un köpeklerde sıklıkla izole edildiği yerler	27
Şekil 2.	Otitis eksternalı ve sağlıklı köpeklerin belirlenmesi	33
Şekil 3.	Örneklerin alınması	33
Şekil 4.	<i>S. intermedius nuc</i> genleri 431 bp'lik segmentlerini spesifik olarak amplifiye eden primerler kullanılarak yapılan PZR ürünü görüntüsü	40
Şekil 5.	<i>S. intermedius siet</i> genleri 145 bp'lik segmentlerini spesifik olarak amplifiye eden primerler kullanılarak yapılan PZR ürünü görüntüsü	41

1. GİRİŞ

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: *S. aureus*, *S. schleiferi*, *S. epidermidis*, *S. hyicus*, *S. xylosus*, *S. simulans* ve *S. intermedius* türleridir (Sasaki ve ark 2005, Öztürk ve ark 2010, Bond ve Loeffler 2012, Cristina ve Degi 2013, Udegbumam ve ark 2014).

Otitis, köpeklerde özellikle küçük hayvan kliniklerinde yaygın olarak karşılaşılan hastalıklardandır. Otitis eksterna; dış kulak yolunun akut ya da kronik yangısı olarak tanımlanan ve multifaktöriyel etiyojolojiye sahip bir hastalıktır. Yapılan çeşitli araştırmalarda köpeklerde otitis eksterna prevalansının %5 ile %20 arasında olduğu bildirilmiştir (Samsar ve Akın 2006, Petrov ve ark 2013).

Staphylococcus intermedius otitis eksterna ve piyodermalı köpeklerden çoğunlukla izole edilen hastalık etkenidir. Bu mikroorganizma güvercin, köpek, vizon ve atların çeşitli hastalıklarında tespit edilmiş ve yeni bir tür olarak 1976 yılında tanımlanmıştır (Hajek 1976). *S. intermedius* bakterisinin çoğunlukla sağlıklı hayvanların; kulak, oral, nasal ve anüs bölgelerinde bulunduğu bilinmektedir (Petrov ve ark 2013).

Yapılan çeşitli çalışmalarda, *S. intermedius*'un köpeklerde piyodermaya sebep olan virulans faktörlerinden eksfoliatif toksin ürettiği bildirilmiştir (Terauchi ve ark 2003). Eksfoliatif toksin; epidermolitik bir toksin olup, stafilokokal infeksiyonların veziküler ve eksfoliatif deri lezyonlarından sorumludur. Hasta ve sağlıklı köpeklere ait örneklerden izole edilen koagulaz pozitif stafilokoklar: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) metoduyla fenotipik ve genotipik olarak araştırıldığında, *S. intermedius* suşlarının eksfoliatif toksini kodlayan *siet* genin varlığının klinik semptomlarda rolü olabileceği belirtilmiştir (Lautz ve ark 2006).

S. intermedius; toksin üretimi, süperantijen olma özelliği ile zoonotik öneme sahip son derece önemli bir mikroorganizmadır. Bu nedenle son yıllarda yapılan nozokomiyal ve toplum kökenli infeksiyon etkenleri çalışmalarında yer aldığı görülmektedir (Cristina ve Degi 2013, Petrov ve ark 2013, Udegbumam ve ark 2014).

İnsanlarda yapılan çeşitli çalışmalarda *S. intermedius*'un; köpek ısırması sonucu yaralarda, beyin abselerinde, otitis eksterna vakalarında, kateterizasyon ile şekillenen bakteriyemide, koroner bypass operasyonu sonrası şekillenen pnemonide rol oynadığı gözlenmiştir (Vandenesch ve ark 1995, Gerstadt ve ark 1999, Tanner ve ark 2000).

Söz konusu bakteri ile enfekte köpekler ve temas halde olan kişilerde yapılan çalışmalar günümüzde hız kazanmaktadır. Yapılan çalışmalarda söz konusu etkenin insanlarda görülmesi, enfekte hayvanlardan insanlara geçişin mümkün olduğunu kanıtlar niteliktedir (Teraucki ve ark 2003, Boost ve ark 2008, Fitzgerald 2009, Bond ve Loeffler 2012, Cristina ve Degi 2013, Udegbumam ve ark 2014).

S. intermedius türünün köpeklerde hastalıklara yol açan mikroorganizmalar arasında yer alması, zoonoz olması ve infeksiyon-kolonizasyon ayrımı yapmada, direnç paternlerini değerlendirmede hekimleri zor durumda bırakması toksijenik potansiyellerinin araştırılmasını zorunlu kılmaktadır. Söz konusu nedenlerden dolayı, yapılan bu çalışmada otitis eksternalı ve sağlıklı köpeklerden izole edilen, *S. intermedius* suşlarında eksfoliatif toksini kodlayan *siet* genin varlığı PZR metoduyla fenotipik ve genotipik olarak araştırılmıştır.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. Otitis Eksterna

Otitis eksterna; dış kulak yolunun akut ya da kronik yangısını tanımlayan genel bir terimdir. Yapılan birçok araştırmaya göre; köpeklerde otitis eksterna prevalansının %5 ile %20 arasında olduğu rapor edilmiştir (Samsar ve Akın 2006). Özellikle küçük hayvan kliniklerinde yaygın olarak karşılaşılan ve multifaktöriyel etiyojolojiye sahip bir hastalıktır (Petrov ve ark 2013).

Köpeklerde dış kulak yolu, meatus akustikus eksternustan membrana timpaniye kadar olup huni şeklinde bir yapıdır. Köpek yavruları yeni doğduklarında dış kulak kapalı durumdadır. Histolojik olarak sağlıklı köpeklerin dış kulak yolunda, yüzlek dermis katında pek çok sebaceoz bez, derin dermiste ise birkaç adet apokrin bez bulunmaktadır. Dış kulak yolu annular kıkırdak, skutiform kıkırdak ve aurikular kıkırdak olmak üzere üç adet elastik kıkırdaktan oluşmaktadır (Samsar ve Akın 2006).

Köpeklerde kulak ile ilgili problemler kedilere oranla daha fazla görülmektedir (Cole 2003). Bunun nedeni kulağın anatomik yapısının farklılığıdır. Kedilerde kısa ve düz olan kulak kanalı, köpeklerde uzun ve dirsekli bir yapıdadır. Kulak salgılarının akışı zor olduğu gibi, pisi otu ve benzeri yabancı cisimlerin kanaldan geçmesi durumundada erişilmesi bir o kadar zor olmaktadır.

Köpeklerde ırklara göre farklı kulak şekilleri görülmektedir. Dik kulaklı, sarkık kulaklı, küçük veya büyük kulaklı ırklar yanında, kulak kepçesi tüylerle kaplı olanlar veya tüysüz olanlar gibi yüzlerce ırk söz konusudur. Özellikle otitis eksternaya yakalanma oranı sarkık kulaklı köpek ırklarında, melez ya da diğer ırklara göre daha fazladır. Kulak hastalıkları Cocker gibi uzun kulaklı köpeklerde bir ırk hastalığı olarak görülebilmektedir. Bazı ırklarda kulak kanalının ventilasyon yetersizliği dışında kulak hastalıklarına yatkınlıkta söz konusu olabilmektedir. Örneğin Golden retriever, Dalmatian ve İngiliz buldog ırkı köpeklerde allerjik bünyelerine bağlı olarak dış kulak yolu yangıları daha sık görülmektedir. Ayrıca otitis eksternaya sık yakalanan: Labrador retriever, Springer spaniel, Spaniel cocker, Greyhounds ve melez ırkları da örnek verilebilir (Petrov ve ark 2013).

Otitis eksternanın en belirgin semptomu kaşıntı ve ağrıdır. Köpeklerde kulağı kaşıma isteği, kulaklarını sallama, başın hasta kulak tarafına doğru eğik tutulması dikkati çeken unsurlardır. Kulak kaidesine doğru yapılan palpasyonlarda, hayvanın şiddetli ağrı duyduğu saptanmaktadır (Cristina ve Degi 2013).

Otitis eksterna ile ilgili yapılan birçok araştırmaya göre hastalığın hazırlayıcı sebepleri arasında; ısı, rutubet, kulak kirliliği, yaş, cinsiyet, ırk, travma, aşırı duyarlılık, otoimmün hastalıklar, anatomik yapı, pH, kulak akarları ve yabancı cisimler olduğu bildirilmiştir (Keskin ve ark 1999, Blanco ve ark 2000, Oliveira ve ark 2008).

Otitis eksterna'nın patogenezi, predispoze faktörler, primer faktörler ve kronik faktörlere bağlı olarak farklı şekillerde gelişebilmektedir. Klinik hekimlikte kulak hastalıklarının patogenezinin belirlenememesi nedeniyle, hastalıkla mücadelede tedavi ve koruyucu önlemlerin bilinmesi önem arz etmektedir. Özellikle primer ve predispoze faktörlerin tam olarak belirlenememesi kronik kulak hastalıklarının en önemli sebebi olmaktadır (Samsar ve Akın 2006).

Otitis eksterna primer faktörlerin mevcut olması ile gerçekleşmektedir. Dış kulak yolu hastalıklarının altında genelde dermatolojik bir hastalık yatmaktadır. En sık karşılaşılan

primer faktörler hipersensitivite, parazitler, yabancı cisimler ve travmalardır (Logas 1994). Hipersensitivite; kronik otitis eksterna hastalığında görülen yüksek insidensli atopiye yol açması sebebiyle başlıca nedenlerden biridir. Ayrıca kulak hastalıkları, gıda alerjisi görülen köpeklerin %80'inde rastlanmaktadır. Kontakt hipersensitivite ise otitis eksterna hastalığına yol açan nadir etkenlerden biridir ve genellikle iatrojenik nedenlere bağlıdır. Primer idiopatik seborea ve hipotiroidizmin primer seruminoz otitis eksternaya yol açmaktadır. Bazı predispoze faktörler dış kulak kanalının florasını değiştirerek, infeksiyonların meydana gelmesine neden olmaktadır. Stenotik kulak kanalı, uzun kulak kepçesi, dış kulak kanalında kıl birikimi, kulak yolunun sık yıkanması, mekanik travmalar, pamuk başlı svapların kullanılması en sık görülen predispoze faktörler arasında yer almaktadır (Scott ve Miller 1999, Scott ve ark 2001).

Bakteriyel otitis eksternada tanı kesin olmamakla beraber, çoğu olgularda bakteriyel infeksiyonlar sekonder olarak gelişmektedir. Otitis eksterna vakalarında en sık izole edilen bakteriyel etkenler: *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella spp.*, *Bacillus spp.*, *Serratia spp.*, *Corynebacterium spp.* ve *Escherichia coli*'dir. Kulağın normal florasında koagulaz pozitif , koagulaz negatif *Staphylococcus spp.*, β -haemolytic *Streptococcus spp.*, *Proteus mirabilis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* bakterileri bulunur. Yapılan çeşitli çalışmalarda, sağlıklı köpeklerin kulak kanalından *Pasteurella multocida* bakterisinin de izole edilebileceği bildirilmiştir. Bu bakterilerden başka *M. pachidermatis*, *Microsporum canis* ve *Otodectes cynoti* 'da klinik belirtiler vermeden hastalık etkeni olarak izole edilebilmektedir. Bu nedenle söz konusu bakteriler ve mayalar otitis eksterna vakalarına yol açan fırsatçı ajanlar olarak değerlendirilmektedirler (Scott ve ark 2001, Rosser 2004, Cristina ve Degi 2013, Petrov ve ark 2013).

İnfeksiyon etkeni olan bakteriler kulak yolunda daima bulunmaktadır. Ancak bu bakterilerin infeksiyona neden olması için uygun ortamı bulmaları gerekmektedir. Bu durum ise kulakta ventilasyonun yetersiz oluşuyla doğrudan ilgilidir. Örneğin pisi otu, buğday başakları, kıymık vb. yabancı cisimler kulak kanalında öncelikle irkiltiye neden olmaktadır. Daha sonra oluşan kaşıntı, tahriş ve doku hasarı kanalda yangısal olayları başlatmaktadır. Yangıya bağlı olarak oluşan döküntüler, kulak salgısı ve kirler yabancı cisimle birleşerek kanalın tıkanmasına neden olmaktadır. Bu ortam bakterilerin üremesine olanak verdiği için infeksiyonun başlamasını kolaylaştırmaktadır (Cristina ve Degi 2013, Petrov ve ark 2013).

1.2. Otitis Eksterna Hastalığında Sık İzole Edilen Bakteriyel Etkenler

1.2.1. *Pseudomonas spp.* Türleri

Pseudomonas aeruginosa; gram negatif, 1,5-3 mikron boyutlarına da, 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 üzümü 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 her hangi 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 bakteriyozini bulunmaktadır. *P. aeruginosa* ekzotoksin, enterotoksin, endotoksin, proteaz, elastaz ve hemolizin gibi çok sayıda ekstrasellüler maddeler sentezleyebilmektedir (Aydın ve ark 2006).

P. aeruginosa; yaygın olarak su, toprak ve bitkiler üzerinde bulunan, çevresel kaynaklı saprofitik bir etkidir. Ayrıca sağlıklı hayvanların deri, mukoz membran ve dışkılarında da yaşayabilmektedir. Pek çok hayvan türünde (sığır, koyun, keçi, domuz, at, köpek, kedi, mink, çinçila, sürüngenler gibi) çoğunlukla irinli ve bazen de akut sistemik infeksiyonlara neden olan fırsatçı patojen bir bakteridir. Özellikle mink ve çinçilalarda epidemik septisemilere neden olurken, diğer hayvan türlerinde sporadik olarak seyretmektedir. Sığırlarda *P. aeruginosa* infeksiyonları çoğunlukla mastitise neden olmakta ve buna bağlı sistemik infeksiyonlar gelişmektedir. Etken solunum sisteminde ve intestinal sistemde de infeksiyona neden olabilmektedir (Arda ve ark 1997). Etken, değişik yaş gruplarındaki köpeklerde yaygın olarak otitis eksterna olgularına yol açmaktadır. Özellikle etkenin proteolitik enzimlerinden elastazlar, otitis eksterna olgularında doku hasarı sonucu lezyonların şiddetlenmesine neden olmaktadır. Ayrıca *P. aeruginosa*, otitis eksterna tedavilerine direnç göstererek nükseden kulak infeksiyonlarına neden olmakta ve enfeksiyon zamanında tedavi edilmediğinde orta kulak ve iç kulağa kadar yayılarak sağırılık, denge bozuklukları ve yürüyüş bozuklukları gibi ciddi problemlere neden olabilmektedir (Aydın ve ark 2006).

P. aeruginosa, insanlarda septisemi, endokarditis, solunum sistemi infeksiyonları, dış ve orta kulak yangıları, korneal ülserler, menenjit, bağırsak, kemik ve üriner sistem infeksiyonlarına yol açmaktadır. Hastane infeksiyonlarına sebep olarak yüksek mortalite ve morbiditeye neden olmalarından dolayı önemli patojenler içinde yer almaktadır. *P. aeruginosa* yaygın olarak kullanılan pek çok antibiyotiğe dirençli olduğundan gerek insanlarda gerekse hayvanlarda tedavi açısından sorunlar yaşanmaktadır (Martin ve ark 2001, Ceylan ve ark 2002, Turner 2008).

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 m uzunlukta pleomorfik görünümlü, sporsuz, kapsülsüz, aerobik veya fakültatif anaerobik bakterilerdir. Düzensiz boyanan granüllere (metakromatik) sahip olan etken boyalı preparatlarda çin alfabesi şeklinde görülmektedir (Jones ve ark 1986). Patojenik korinebakteri türleri hareketsizdir. Glukoz, galaktoz, maltoz ve mannozu gaz oluşturmaksızın fermente eder, katalaz ve üreaz aktiviteleri pozitifdir (Muckle ve ark 1992).

Korinebakterilerin birçoğu fırsatçı patojen bakterilerdir. *C. bovis* dışındaki tüm korinebakteriler değişik organ ve dokularda irinli yangılara neden olmaktadır. Diğer türlerinin bazıları hayvanlarda çeşitli hastalıklara neden olan piyojenlerdir. Lipid tabakasıyla birlikte salgılanan ekzotoksin, 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 akıntuların 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.* türünü 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*

Escherichia coli gram negatif, çomak şeklinde, 2-6 µm boyutlarında, sporsuz, fakültatif anaerobik bir bakteridir. Peritrik flagellaya sahip olduklarından hareketlidirler ancak hareketsiz türleri de bulunmaktadır. Jenerasyon süresi oldukça kısa olan bir etkidir. 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 oluşturmaktadır. 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 röfleli koloniler oluşturmaktadır (Keskin ve ark 1999).

Normal bağırsak flora etkeni olan *E. coli*'ler dışkı ile çevreye yayılmaktadır. Bulaşmaları fekal-oral yol ile olmaktadır. Hayvanlarda pek çok hastalığa neden olmaktadır. Bu hastalıklar farklı *E. coli* patotiplerince oluşturulmaktadır. *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 kapsüller K antijeni ve fimbrial antijenleri (F) sayesinde olmaktadır. EPEC'ler toksin üretmezler ancak bağırsakta tipik lezyonlara yol açmaktadır. EHEC suşları ise kanlı ishallerine neden olmaktadır. EHEC prototipi *E. coli* O157:H7'dir (Keskin ve ark 1999).

E. coli'nin köpeklerde otitis eksterna, koliseptisemisi, piyometra 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, Sarierler ve Kırkan 2004).

1.2.4. *Klebsiella spp.* Türleri

Klebsiella cinsi: *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).

Deneyisel olarak farelerde deri lezyonlarına neden olan, klebsiella türlerinin K1, K2, K4 ve K5 serotipleri, belirtilen diğer kapsül tiplerinden daha virü lent olduğu bildirilmektedir (Simoons ve ark 1984).

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 spp.* türünü ise yalnızca bir suşta izole ettiklerini bildirmişlerdir (Kumar ve Attrey 1998, Kihyang ve ark 1999, Chaudhary ve ark 2003, Sarierler ve Kırkan 2004).

1.2.5. *Proteus spp.* Türleri

Gram negatif çomak tarzında, pleomorfik özellik gösterebilen bu etkenler; hareketli olup kanlı agar da hemoliz meydana getirmezler ve laktozu fermente etmezler. En önemli türleri: *P. mirabilis*, *P. vulgaris* ve *P. myxofaciens*'tir (Aydın ve ark 2006).

Yapılan çeşitli araştırmalarda *Proteus spp.* türlerinin otitis eksterna vakalarına yol açtığı gözlemlenmiştir. Araştırmacılar otitis eksternalı köpekteğe 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 spp.* 'e ait olduğunu bildirmişlerdir (Kumar ve ark 2002, Vikas ve ark 2003, Chaudhary ve ark 2003, Kalorey ve ark 2004, Nair 2004).

1.2.6. Stafilokoklar

1.2.6.1. Genel Bilgiler

Stafilokoklar *Micrococcaceae* ailesi içerisinde yer alan, doğada yaygın olarak bulunan gram pozitif koklardır. İnsan ve hayvanların deri ve mukoz membranlarında, normal flora

elemanları olarak bulunmaktadırlar. Stafilocoklar genelde buldukları yerde konakla iyi huylu ve simbiyotik bir ilişkiye sahiptirler, ancak deri ve mukozal travma, enjeksiyon veya cerrahi müdahaleler ile dokuya girmesi sonucu patojen olabilmektedirler (Bannerman 2003, Cristina ve Degi 2013, Petrov ve ark 2013, Udegbumam ve ark 2014).

1.2.6.2. Tarihçe

1878 yılında ilk olarak Robert Koch tarafından ışık mikroskopunda tanımlanmış olan stafilocoklar, 1880 yılında ise Pasteur tarafından sıvı besiyerinde üretilmiştir. 1881 yılında İskoçyalı cerrah Alexander Ogston, stafilocokların fareler ve kobaylar için patojen olduğunu göstermiş ve üremeleri sırasında birbirlerinden ayrılmayıp, üzüm salkımına benzeyen düzensiz kümeler oluşturmaları sonucu '*Staphylococcus*' (*Staphyle*: üzüm salkımı) adını vermiştir. 1884 yılında Rosenbach stafilocokları ilk kez insandan izole etmiştir (Maltezou ve Giamarellou 2006).

Alexander Fleming'in 1928'de penisilini bulması ve 1940'da Florey ve Chain tarafından penisilin üretiminin başarılması ile stafilocok infeksiyonlarının tedavisinde yeni yöntemler kaydedilmiştir (Maltezou ve Giamarellou 2006).

1.2.6.3. Sınıflandırma

Stafilocoklar: *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Macrooccus*, *Nosocomiicoccus* ve *Salinicoccus* cinslerini de kapsayan *Staphylococcaceae* familyasında yer almaktadırlar. *Staphylococcus* genusu, *Eubacteriales* takımının, *Micrococcaceae* familyasına ait mikroorganizmalardır (Maltezou ve Giamarellou 2006). DNA dizi analizi, DNA-rRNA hibridizasyonu, 16S rRNA'nın karşılaştırmalı oligonükleotid kataloglaması *Staphylococcus* ve *Microoccus* türlerinin yakın ilişkili olmadığını göstermektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda *Staphylococcus* türleri aynı zamanda *Bacillus*, *Brochothrix*, *Gemella*, *Listeria* ve *Planococcus* ile de nispeten yakın ilişkili bulunmuştur. Bu türler geçici olarak stafilocoklar ile *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* kümesinin *Bacillaceae* ailesindeki diğer türler ile birlikte sınıflandırılmıştır (Bannerman 2003 ve Peacock 2005). Yapılan çalışmalarda, mikrokokların oksidaz pozitif olduğunu, G+C oranının (%63-73 mol) yüksek olduğunu, laboratuvar koşullarında stafilocokların tersine furazolidon (100 mg/ml) ve lizostafine (200

mg/ml) dirençli iken, basitrasine (0.04 mg/ml) duyarlı olduklarını göstermiştir (Koneman ve ark 2006, Ben Zakour ve ark 2012).

Stafilokoklar içerisinde en patojen tür olan *S. aureus* infeksiyonlarda ilk sırada yer almaktadır. *S. aureus* dışında ki tüm stafilokok türleri genel olarak KPS'lar adı altında anılmaktadır. KPS'lar içerisinde klinik örneklerden en sık izole edilen türlerden biri *S. intermedius* 'dur (Koneman ve ark 2006, Ben Zakour ve ark 2012, Bond ve Loeffler 2012, Cristina ve Degi 2013, Petrov ve ark 2013, Udegbunam ve ark 2014).

Stafilokok türleri fenotipik özelliklerine göre en az dört grup altında toplanabilirler. Birinci grupta (*Staphylococcus epidermidis* grubunda): *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* ve *S. saccharolyticus* türleri, ikinci grupta (*Staphylococcus saprophyticus* grubunda): *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus* türleri, üçüncü grupta (*Staphylococcus simulans* grubunda): *S. simulans*, *S. carnosus* türleri, dördüncü grupta (*Staphylococcus sciure* grubunda): *S. sciure*, *S. lentus* türleri yer almaktadır. *S. aureus*, *S. auricularis*, *S. intermedius*, *S. hyicus* ve *S. caseolyticus* herhangi bir gruba sokulamamıştır. Fırsatçı patojenlerden *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* sıklıkla, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. saccharolyticus*, *S. cohnii* ve *S. simulans* ise nadir olarak infeksiyonlara neden olmaktadır (Bilgehan 2004, Koneman ve ark 2006, Ben Zakour ve ark 2012, Bond ve Loeffler 2012).

Stafilokoklar: *S. arlettae*, *S. aureus* subsp. *aureus*, *S. aureus* subsp. *anaerobius*, *S. auricularis*, *S. capitis* subsp. *capitis*, *S. capitis* subsp. *urealyticus*, *S. caprae*, *S. carnosus* subsp. *carnosus*, *S. carnosus* subsp. *utilis*, *S. caseolyticus*, *S. chromogenes*, *S. cohnii* subsp. *cohnii*, *S. cohnii* subsp. *urealyticus*, *S. condimenti*, *S. delphini*, *S. epidermidis*, *S. equorum* subsp. *equorum*, *S. equorum* subsp. *linens*, *S. felis*, *S. fleuretti*, *S. gallinarum*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* subsp. *hominis*, *S. hominis* subsp. *novobiosepticus*, *S. hyicus* subsp. *chromogenes*, *S. hyicus* subsp. *hyicus*, *S. intermedius*, *S. kloosii*, *S. lentus*, *S. lugdenensis*, *S. lutrae*, *S. muscae*, *S. nepalensis*, *S. pasteurii*, *S. pettenkoferi*, *S. piscifermentans*, *S. pseudintermedius*, *S. pulvereri*, *S. saccharolyticus*, *S. saprophyticus* subsp. *bovis*, *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*, *S. sciuri* subsp. *carnaticus*, *S. sciuri* subsp. *lentus*, *S. sciuri* subsp. *rodentium*, *S. sciuri* subsp. *sciuri*, *S. simiae*, *S. simulans*, *S. succinus* subsp. *casei*, *S. succinus* subsp. *succinus*, *S. vitulinus*, *S. warneri* ve *S. xylosus* olmak üzere 41 tür, 24 alttür içermektedir (Koneman ve ark 2006, Gülay 2008).

1.2.6.4. Morfolojik ve Kimyasal Özellikleri

1.2.6.4.1. Görünüm ve Boyanma

Stafilokoklar; gram pozitif, 0.5 – 1.5 µm çapında yuvarlak şekilli, çoğunlukla düzensiz kümeler şeklinde, hareketsiz bakterilerdir. Zorunlu anaerop olan *S. saccharolyticus* ve *S. aureus subsp. anaerobius* dışında fakültatif anaerop olup çoğunlukla aerop üremeyi tercih etmektedirler. Genellikle katalaz pozitif (*S. saccharolyticus* ve *S. aureus subsp. anaerobius* hariç), oksidaz negatif (*S. sciuri*, *S. lentus* ve *S. vitulinus* hariç), kapsülsüz mikroorganizmalardır. Morfolojik olarak benzer yapıda olan *Micrococcus* soyunun üyelerinden anaerobik olarak üremesi ve obligat aerobik mikrokoklardan farklı fermentasyon ve solunum metabolizmasına sahip olmaları sebebiyle ayrılmaktadırlar. Kimyasal ve biyokimyasal karakteristikleri, DNA Guanin ve Sitozin içerikleri ve hücre duvarı yapıları birbirlerinden oldukça farklıdır (Bannerman 2003).

1.2.6.4.2. Üreme ve Kültür Özellikleri

Kanlı agar, nutrient agar, triptik soy agar veya beyin kalp infüzyon agar gibi besiyerlerinde üreyebilirler. Stafilocok 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).

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 stafilocoklar, katalaz testinin pozitif olması ile ayırt edilebilmektedir (Peacock 2005, Koneman ve ark 2006).

1.2.6.4.3. Biyokimyasal Özellikleri

Stafilokokların sınıflandırılmasında koagulaz üretimi önemli biyokimyasal özellikleri arasında yer almaktadır. *S. aureus* suşları koagulaz pozitifdir. Koagulaz pozitif olan diğer stafilocoklar: *S. intermedius*, *S. lugdunensis*, *S. hyicus*, *S. delphini*, *S. lutrae* ve *S. schleiferi*

subsp. dir. Stafilocoklar glukozu fermentatif olarak parçalar ve son ürün olarak laktik asit oluştururlar (Cengiz 1999, Moreillon ve ark 2005).

Stafilocoklara plazma koagulaz, kümeleştirici faktör (clumping factor) gibi in vitro testler uygulanabilmektedir. Stafilocoklar, 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. Stafilocok türleri 60 °C'de ancak yarım saatte, % 2'lik fenolde 15 dakikada inaktive olup, %9'luk sodyum klorüre ve sakkarozaya direnç gösterebilmektedir. Kuarterner amonyum klorür bileşikleriyle etkin bir şekilde dezenfekte edilebilir ayrıca alkol ve iyot gibi antiseptiklere de oldukça duyarlıdır (Koneman ve ark 2006).

1.2.6.4.4. Genom Yapısı

Genomu yaklaşık 2000-3000 kbp bir kromozom ile profajlar, plazmidler ve transpozonlardan oluşmaktadır. Stafilocokal 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 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).

1.2.6.5. Virulans ve Patojeniteleri

1.2.6.5.1. Kapsül

S. aureus' un özellikle mukoid türlerinde polisakkarid yapıda bir mikrokapsül bulunmaktadır. Bunlar elektron mikroskop incelemelerle infekte kalp pillerinde, periton ve intravenöz kateterlerde gösterilmiştir. Bu ekzopolisakkarit, bakteriyi fagositozdan korur ve konak hücrelerine özellikle de kateterler gibi yabancı cisimlere adherensini

kolaylaştırmaktadır. Stafilocoklarda 11 mikrokapsüler polisakkarit serotipi tanımlanmıştır (Moreillon ve ark 2005, Koneman ve ark 2006).

1.2.6.5.2. Hücre Duvarı

1.2.6.5.2.1. Peptidoglikan Tabaka

Hücre duvarı peptidoglikan, teikoik asit ve proteinlerden oluşmuştur. Bu komponentlerden proteinler ökaryotik hücrelere bağlanma ve adezyon için önemli fibronektin, fibrinojen, laminin ve kolagen içermektedirler. Bakterinin tutunmasında adezyon proteinleri önemlidir (Ünal 2004).

Stafilocoklarda peptidoglikan tabaka, hücre duvarı kuru ağırlığının yaklaşık %50-60'ını oluşturmaktadır. Bu tabaka üç bölümden oluşmaktadır. Bunların ilki β 1-4 glikozid bağları ile bağlanan N-asetil glukozamin (NAG) ve N-asetil muramik asit (NAMA) alt gruplarından oluşan disakkarid yapısıdır. İkinci tabaka N-asetil muramik asite bağlı D ve L aminoasitlerinden oluşmuş pentapeptid zincirdir. NAMA de bağlanan pentapeptid yapısı sırası ile: L-alanin, D-glutamik asit, L-lizin, D-alanin, D-alanin şeklindedir. Son tabaka da ise NAMA'ye bağlı olan pentapeptid yan zincirleri, pentaglisin köprüleri ile bir zincirde D-alanin ile diğer zincirdeki L-lizin arasında olacak şekilde birbirlerine çapraz bağlanmaktadır. Çapraz bağlar hücre duvarının sağlamlılığı ile yakından ilişkilidir ve bu bağların yapısı türler arasında farklılık göstermektedir (Lodise ve McKinnon 2005).

Stafilocokların peptidoglikan tabakası; makrofajlardan sitokin salınımını uyarmakta, komplemanın aktivasyonuna yol açmakta ve trombosit agregasyonuna neden olmaktadır. Ayrıca monositlerden IL-1 salınımını uyararak polimorfonükleer lökositlerin infeksiyon bölgesine toplanmalarına ve sonuçta apse oluşumuna da yol açmaktadır (Ünal 2004, Lodise ve McKinnon 2005).

1.2.6.5.2.2. Teikoik Asit

Teikoik asit; suda eriyebilen, fosfodiester bağları ile bağlanarak uzun zincirler oluşturan şeker-alkol-fosfat polimerleridir. Ribitol teikoik asit ve gliserol teikoik asit olmak

üzere iki tiptir. Peptidoglikan tabakasındaki N-asetil muramik asit molekülüne fosfodiester bağlarıyla kovalent olarak bağlanmıştır. Hücre duvarı kuru ağırlığının yaklaşık olarak %30-50'sini oluşturmaktadır. Sadece gram pozitif bakterilerin hücre duvarında bulunan bu yapı hücre yüzeyine negatif yük vererek, çeşitli metal iyonlarının, katyonların lokalizasyonunda ve otolitik enzimlerin aktivasyonunda rol oynamaktadır. Fibronektin, fibrinojen, laminin, trombospondin, vitronektin, elastin, sialoprotein ve kollojen gibi özgül reseptörleri ile birleşerek stafilokokların konağa adherensini sağlamaktadır (Tünger 2004, Moreillon ve ark 2005).

1.2.6.5.2.3. Yüzey Proteinleri

Protein A ilk olarak 1940 yılında Wervey tarafından tanımlanmıştır. 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.

Protein A; elastin, kollajen, fibronektin bağlayan proteinler ve kümeleşme faktörü (clumping faktör) kimyasal yapıları ve hücre duvarı yerleşimleri birbirlerine benzeyen stafilokoksik yüzey proteinleridir. Bu proteinler stafilokokların konak dokularında kolonize olmasında en önemli faktörlerdir (Cengiz 1999, Tünger 2004).

1.2.6.5.3. Toksinler

1.2.6.5.3.1. Sitolitik Toksinler

Stafilokoklar çok sayıda ekstrasellüler toksin üretebilmektedir. Bu toksinler konak hücre morfolojisini ve fonksiyonunu etkilemektedir. Böylece yoğun inflamatuvar yanıt olan bölgelerde üremelerini sürdürebilirler. En iyi bilinen ekstrasellüler toksinler; hemolizinler ve lökosidindir (Cengiz 1999).

1.2.6.5.3.1.1. Hemolizinler

Hemolizinler; çeşitli hayvan eritrositleri üzerinde hemolitik etki yapıp yapmamalarına, hemoliz için gerekli ısı derecesi ve zamana, toksisite derecelerine bağlı olarak ayrımlar göstermektedir. Bu toksinler dört tiptir (Cengiz 1999, Moreillon ve ark 2005).

Alfa hemolizin (Alfa toksin): En güçlü membran hasar proteini. Hemolitik, dermonekrotik ve sitolitik etkileri vardır. Bakteriyel kromozomlarda ve plazmidlerde kodlanmaktadır. Tavşan eritrositleri için hemolitik aktivitesi yüksektir. İnsan makrofaj ve trombosit hücre membranları üzerinde litik etkiye sahiptir fakat monositlere etkisizdir.

Beta hemolizin (Beta toksin): Stafilokokal sfingomyelinaz olup 35 kDa ağırlığındadır. En önemli özelliği sıcak-soğuk lizis yapabilme yeteneğidir. Eritrositler üzerindeki etkisi soğukla artmaktadır. Fibroblast ve lökosit hücrelerine de toksik etki göstermektedir. En iyi koyun eritrositlerine, daha az olarak da insan ve tavşan eritrositlerine litik etki göstermektedir.

Gama hemolizin (Gama toksin): İnsan eritrositlerini orta derecede etkilemektedir. Tavşan ve koyun eritrositleri duyarlıdır.

Delta hemolizin (Delta toksin): Hücre membran bütünlüğünü bozarak adenilat siklazı aktive edip cAMP salınımına neden olmaktadır. Stafilokoksik Toksik Şok Sendromu (STSS) ve stafilokokal besin zehirlenmesinde rol oynamaktadır. İnsan, tavşan ve maymun eritrositlerine etkili olmakla beraber lökosit, makrofaj, lenfosit ve trombositlerini de hasara uğratmaktadır.

1.2.6.5.3.1.2. Lökosidin (Panton-Valentine Toksin)

Birbirlerini sinerjik olarak etkileyen F (fast) ve S (slow) olmak üzere iki protein komponentinden oluşmuş bir ekzotoksindir. Lökosidin; hücre zarında potasyum ve diğer katyonlara karşı geçirgenliği artırıcı gözeneklerin açılmasını sağlayarak etkili olur. Lökositler ve makrofajlar üzerine litik etkisi vardır. Lökositler tarafından fagosite edilseler de lökosidin üreten stafilokoklar hücre içerisinde üremeye devam ederler. Bu toksini bulunduran türlerin infeksiyonlarında hızlı ilerleme, kanama ve nekrotizan pnömoni tablosu görülmektedir (Koneman ve ark 2006).

1.2.6.5.3.2. Enterotoksin

Isıya dirençli olup polipeptid yapıdadırlar. Sekiz immünolojik tipi vardır. Bunlar: A, B, C1, C2, C3, D, E ve F 'dir. Makrofaj ve yardımcı T hücrelerinden, sırasıyla IL-1 ve IL-2 salınımını uyarıp, sindirim kanalında bir süper antijen olarak davranırlar. A ve D besin zehirlenmelerinde sık karşılaşılan toksinlerdendir (Moreillon ve ark 2005, Koneman ve ark 2006).

1.2.6.5.3.3. Eksfoliatif Toksin (Eksfoliatin)

Stafilokokal infeksiyonların veziküler ve eksfoliatif deri lezyonlarından sorumlu olan epidermolitik bir toksindir. Eksfoliatif toksin antijenik ve biyokimyasal özelliklerine göre iki tipe ayrılmaktadır. Eksfoliatif toksin A; ısıya duyarlı ve plazmid orjinlidir, eksfoliatif toksin B ise ısıya dirençli ve yapısal geni kromozomaldır. Bu iki protein yapısal olarak farklı olmasına rağmen benzer biyolojik aktiviteye sahiptir. Stafilokokal Haşlanmış Deri Sendromu (SSSS)'ndan sorumludur (Moreillon ve ark 2005, Koneman ve ark 2006).

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

Süper antijen olarak, sistemik şekilde salınır ve toksik şok sendromuna neden olmaktadır. T lenfosit proliferasyonu ve monositlerden IL-1 salınımını uyarmaktadırlar (Dinges ve ark 2000, Moreillon ve ark 2005, Koneman ve ark 2006).

1.2.6.5.4. Enzimler

1.2.6.5.4.1. Katalaz

Tüm stafilokoklar (*S. saccharolyticus* ve *S. aureus subsp. anaerobius* hariç) tarafından üretilen toksik hidrojen peroksidi (H_2O_2), toksik olmayan oksijen ve suya ayrıştırır bir enzimdir. Bakteriler, bu enzim sayesinde fagositlerin içinde toksik oksijen radikalleri tarafından öldürülmeye direnç kazanmaktadır (Koneman ve ark 2006).

1.2.6.5.4.2. Koagulaz

Plazma pıhtılaşma proteini olup stafilokoklar tarafından üretilmektedir. Serbest koagulaz ve bağlı (clumping factor) koagulaz olmak üzere iki tipi vardır. Yapılan çeşitli çalışmalarda koagulaz pozitif stafilokokların üzerinde oluşan kalın fibrin tabakasının, mikroorganizmayı fagositoza karşı koruyarak, patojenliğe katkı sağladığı bildirilmiştir (Cengiz 1999, Koneman ve ark 2006).

1.2.6.5.4.3. Lipaz

KNS'ların yaklaşık %30'undan fazlası lipaz enzimi üretmektedir. Lipaz, yağları hidrolize ederek vücudun lipid içeren bölgelerinde stafilokokların yaşamasını sağlamakta ve yüzeyel dokuları invaze ederek fronkül ve karbonkül gibi infeksiyonlarının gelişimine neden olmaktadır (Cengiz 1999, Koneman ve ark 2006).

1.2.6.5.4.4. Hiyalüronidaz

Antijenik özelliğe sahip bir enzim olup, konak bağ dokusu matriksinde asit mukopolisakkaritlerden olan hiyalüronik asiti parçalayarak mikroorganizmanın kolayca yayılmasını sağlamaktadır (Cengiz 1999, Koneman ve ark 2006).

1.2.6.5.4.5. Fibrinolizin (Stafilokinaz)

Plazmada bulunan plazminojeni aktive ederek plazmin oluşturmakta ve fibrinolitik etki ile fibrini parçalayarak organizmanın yayılmasına yardımcı olmaktadır (Koneman ve ark 2006).

1.2.6.5.4.6. Deoksiribonükleaz

Isıya dirençli bir enzim olup, DNAz enzimleri endo ve ekzonükleaz aktivitesine sahip, nükleik asitleri 3'- fosfomononükleotidlere parçalayan fosfodiesterazlardır (Koneman ve ark 2006).

1.2.6.5.4.7. Beta-laktamaz (Penisilinaz)

Stafilokoklar salgıladıkları beta-laktamaz enzimi ile penisilin grubu antibiyotiklerdeki beta-laktam halkasının hidroksil grubunu parçalayarak etkisizleştirmektedirler. Genetik taşınma ise plazmid ve transpozonlarla sağlanmaktadır (Hill ve ark 2006, Koneman ve ark 2006, Devriese ve ark 2009).

1.2.6.5.4.8. Slime Faktör

Kuvvetli bir antijenik yapıya sahiptir. Slime maddesi amorf kapsül yapısında, glikokaliks materyali olup %40 karbonhidrat, %27 protein içermektedir. Slime pozitif stafilokok suşlarının daha virülan ve antibiyotiklere daha dirençli olduğu yapılan çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Koneman ve ark 2006).

1.2.6.6. 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 etkenin aktive olmasına neden olmaktadır (Bilgehan 2002, Bond ve Loeffler 2012).

1.2.6.7. Stafilocokların Neden Olduğu İnfeksiyonlar

Hayvanlarda stafilocoklardan ileri gelen başlıca infeksiyonlar; dermatitis, mastitis, botriyomikozis, enzootik piyemi, artrit, göz infeksiyonları ve gıda zehirlenmeleridir. Çeşitli

infeksiyonlardan (solunum sistemi infeksiyonları, endokarditis, tromboflebitis, besin zehirlenmesi, septik artrit, otitis, osteomyelitis, meningitis, sepsis, bakteriyemi) ve birçok vücut bölgesindeki bakteriyel yangılardan da sıklıkla izole edilmektedirler (çizelge 1) (Kireççi 2009, Quinn ve ark 2011, Bond ve Loeffler 2012, Udegbumam ve ark 2014).

Çizelge 1. Koagülaz pozitif stafilokoklar ve klinik önemleri (Quinn ve ark 2011)

TÜRLER	KONAKLAR	HASTALIKLAR / İZOLE EDİLEN YERLER
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sığır	Mastitis, impetigo
	Koyun	Mastitis, dermatitis, kene piyemisi, beningn folikülitis
	Keçi	Mastitis, dermatitis
	Domuz	Meme bezlerinde botriyomikoziz 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 pyojenik 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. schleiferisubsp. coagulans</i>	Köpek	Otitis eksterna

Çizelge 2. Hayvanlardan izole edilen koagulaz negatif stafilokoklar (Quinn ve ark 2011)

TÜR	KONAK/İZOLE EDİLEN BÖLGE
<i>S. arlettae</i>	Keçi/Burun - Kümes Hayvanları/Deri
<i>S. capitis</i>	Sığır/Süt
<i>S. caprae</i>	Keçi/Deri
<i>S. chromogenes</i>	Sığır/Süt - Domuz-Kümes Hayvanları/Deri
<i>S. cohnii</i>	Sığır/Süt
<i>S. epidermidis</i>	Sığır/Süt
<i>S. equorum</i>	At/Deri
<i>S. felis</i>	Kedi/Otitis eksterna, deri
<i>S. gallinarum</i>	Kümes Hayvanları/Deri
<i>S. haemolyticus</i>	Sığır/Süt
<i>S. hominis</i>	Sığır/Süt
<i>S. lentus</i>	Domuz, Koyun, Keçi/Deri
<i>S. nepalensis</i>	Keçi/Solunum kanalı
<i>S. saprophyticus</i>	Kedi/Deri - Sığır/Burun
<i>S. sciuri</i>	Kedi ve diğer hayvanlar/Deri
<i>S. simiae</i>	Maymun/Gastrointestinal kanal
<i>S. simulans</i>	Sığır/Süt - Kedi, Köpek, Domuz/Deri
<i>S. vitulinus</i>	Sığır, Koyun, Domuz/Deri
<i>S. warneri</i>	Sığır/Süt
<i>S. xylosus</i>	Sığır, Koyun/Süt - Kedi, Kümes hayvanları, Domuz, At/Deri

Stafilokokkal patojenlerden: *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi*, *S. delphini*, *S. epidermidis*, *S. hyicus*, *S. sciuri* ve *S. chromogenes* türleri sıklıkla ruminant mastitis vakalarında karşılaşılan etkenlerdendir. *S. hyicus* domuzlarda görülen eksüdatif dermatitiden, *S. delphini* ise at, vizon, inek, yunus ve güvercinlerin deri lezyonlarından izole edilebilmektedir (Boyle-Vavra 2007).

Yapılan çeşitli çalışmalarda otitis eksterna vakalarına yol açan ve sık karşılaşılan bakteriler: *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus spp.*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* ve *Corynebacterium spp.* 'dir (Ben Zakour ve ark 2012, Bond ve Loeffler 2012, Cristina ve Degi 2013).

Otitisli köpeklerde yapılan çeşitli araştırmalarda *Staphylococcus spp.* toplam izolatların içinde sırasıyla: %75 , %26, %48, %69.31 ve %80 oranlarında bulunmuştur (Kumar ve Attrey 1998, Kumar ve ark 2002, Vikas ve ark 2003, Kalorey ve ark 2004, Nair ve ark 2004). Mhatre (2005) tarafından 27 kulak problemlili köpekle yapılan bir araştırmada, izolatların %56 oranında KPS'a ait olduğu, Klein ve Muller (1999) araştırmacılarının yapmış oldukları başka bir çalışmada ise bu oranın %34 olduğu bildirilmiştir.

1.2.6.8. Stafilokoklarda Metisilin Direnci

Evlerde beslenen kedi, köpek gibi pet hayvanlarının insanlardaki stafilokokkal infeksiyonlar için bir kaynak olabileceği bilinmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda pet hayvanlarından metisilin direncine sahip: *S. intermedius*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. hominis*, *S. xylosus*, *S. haemolyticus*, *S. lentus*, *S. sciuri*, *S. warneri* izolasyonları rapor edilmiştir (Gortel ve ark 1999, Van Duijkeren ve ark 2004, Bagcigil ve ark 2007). Meucci ve ark (2010) köpeklerden izole ettikleri 136 *S. intermedius* suşlarında metisilin direncini araştırmış, yapılan PZR tekniğiyle *mecA* pozitif suşların metisiline dirençli olduğunu saptamışlardır.

İnsanlarda birçok yere kolonize olabilmesine karşın, yapılan çeşitli çalışmalarda *S. aureus* için en sık taşıyıcılık yeri burnun ön boşluğu olduğu bildirilmiştir. Bunun dışında deri, perineum, farenkste etken lokalize olabilmektedir. Pet hayvanlarında da *S. aureus*, *S. intermedius* gibi patojen türler burun, deri ve anal bölgelerden izole edilmektedir ve etkenlerin özellikle burun ve ağızdan deri ya da diğer bölgelere geçtiği düşünölmektedir (Wertheim ve ark 2005, Boost ve ark 2008).

Koagulaz negatif stafilokoklar sağlıklı hayvanların florasında bulunabildikleri gibi bazı türleri hayvanlarda infeksiyonlara neden olmaktadır. *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* özellikle cerrahi girişimlerle ilişkili olan insan izolatları olarak bilinmektedirler. Bununla beraber *S. haemolyticus*'un bazı hayvan türlerinin doğal florasında da bulunduğu saptanmıştır. *S. hominis* ise özellikle insanlarda kolonize olan bir türdür. *S. hominis* türleri, diğer türlere oranla birkaç ay gibi daha kısa süreler için deride kolonize olmaktadırlar. Koagulaz negatif stafilokok türleri arasında *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. hominis* sağlıklı insan deri örneklerinden sıklıkla izole edilen türlerdir (Nagase ve ark 2002, Kitao 2003, Bagcigil ve ark 2007, Loeffler ve ark 2007).

Son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar çeşitli hayvan türlerinden ve bu hayvanlarla ilgilenen veteriner hekim ya da bakıcılarından izole edilen MRSA'ların genetik olarak ilişkili oldukları ya da benzer olduklarını ortaya çıkarmıştır (Loeffler ve ark 2005, Weese ve ark 2005). Ayrıca kontamine çevrenin de ortak kullanımı stafilocokların kross-kontaminasyonu ile sonuçlandığı vurgulanmaktadır (Duquette ve Nuttall 2004, Moodley ve Guardabassi 2009). Ancak bunun yanında bu hayvanların da özellikle MRSA'yı yine insanlardan ya da insanlar tarafından kontamine edilmiş çevrelerden aldıkları da belirtilmektedir (Boost ve ark 2008, Morgan 2008, Loeffler ve ark 2010).

Metisilin, oksasilin, kloksasilin gibi yarısentetik penisilinler, β -laktamazlar tarafından hidrolize olmayan β -laktam halkaları içermektedir. Metisiline direnç, bakterinin hücre duvarında bulunan ve penisiline düşük oranda eğilimi olan 78 kd ağırlıktaki modifiye Penisilin Bağlayıcı Protein (PBP2a)'e bağlı olarak gelişmektedir. MRSA suşlarında Metisiline Hassas Stafilocok (MSS) suşlarından farklı olarak ek bir Penisilin Bağlayıcı Protein (PBP) vardır ve PBP2a olarak adlandırılmaktadır. PBP2a'nın beta-laktam antibiyotiklere afinitesi diğer PBP'lerden daha düşüktür. PBP2a, 2 kb'lik DNA segmentine lokalize bir gen olan *mecA* geni tarafından kodlanmaktadır. Bazen bu gen indüklenebilir ve transdüksiyon ile dirençli suşlardan duyarlı suşlara aktarılabilmektedir. *mecA* geni regülasyonunu sağlayan *mecI* (represör gen) ve *mecRI* (sinyal dönüştürücü gen) genleriyle beraber Stafilocokkal Kaset Kromozomu (Staphylococcal Chromosomal Cassette-SCC) ismi verilen genetik yapının üstünde taşınır. *mecRI* ve *mecI*'nin plazmid aracılı stafilocokkal beta laktamaz geni olan *blaZ*'nin ekspresyonunda rolü olan *blaRI* ve *blaI* ile protein sekans homolojisi yüksektir. Bu da *mecA*'nın regülatör genlerini, *blaZ* sisteminden aldığını düşündürmektedir (Duquette ve Nuttall 2004, Ünal 2004, Kwon ve ark 2006, Epstein ve ark 2009).

1.2.6.8.1. Metisilin Direncini Etkileyen İnternal Faktörler

1.2.6.8.1.1. Belirli Uzunluktaki Glikan Zincirleri

PBP2a, PBP2'nin transglikozilaz aktivitesine bağımlıdır. Transglikozilaz domain'inin inaktivasyonunu daha kısa olan glikan zincirlerin sayısında artışa ve metisilin direncinde belirgin azalmaya neden olmaktadır (Ünal 2004).

1.2.6.8.1.2. Normal Peptid Konfigürasyonu İçin Gerekli Kök Peptidler

Ortama glisin konulduğunda, peptidoglikan zincirinin sonunda normal koşullarda olması gereken iki alanin rezidüsünün yerini, iki glisin rezidüsünün almasının metisilin direncinde azalmaya ve homojen fenotipin heterojen fenotipe dönüşmesine neden olduğu bilinmektedir. UDP-N-asetil tripeptid sentatazı kodlayan gen olan *murE*'nin inaktivasyonu sonucunda da metisilin direncinde azalma olmaktadır. Bunun sebebi hücre duvarı öncülleri havuzundaki UDP-bağlı muramil pentapeptidlerin azalması ve UDP-bağlı seride peptid elde edilmesi için kök peptidlerine ihtiyaç olduğuna işaret etmektedir (Ünal 2004).

1.2.6.8.1.3. İntakt Olmak İçin Gerekli Pentaglisin Çapraz Köprüleri

Glikan zincirlerini birbirine bağlayan pentaglisin çapraz köprülerinin yapımından *femA*, *femB* ve *femX* sorumludur. *femX* birinci glisini, *femA* ikinci ve üçüncü glisinleri ve *femB* de dördüncü ve beşinci glisinleri köprüye sokmaktadır. *femA* ve *femB* arasında değişme olmadığından bu proteinlerden herhangi birini kodlayan genlerin inaktivasyonu sonucu mono veya tri-glisinli çapraz köprüler oluşmaktadır. *femA* ve *femB* genlerinin herhangi birinin inaktivasyonu bakteri için letal olduğundan, *femA* ve *femB* proteinleri ilaç çalışmalarının yeni hedefleridir (Ünal 2004).

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 oportunistik olarak sekonder infeksiyonlara yol açmaktadır. *S. aureus* virulansı en yüksek olan stafilokok türlerindedir. Bu özelliklerinden dolayı da insanlar ve hayvanlarda önemli infeksiyonlara neden olmaktadır (Leonard ve ark 2006, Briscoe ve ark 2008).

S. aureus infeksiyonları: Deri ve yumuşak doku infeksiyonları (İmpetigo, follikülit, fronkül, karbonkül ve hidradenitis süpurativa gibi), dolaşım sistemi infeksiyonları

(bakteriyemi, endokardit ve perikardit), solunum sistemi, kas ve iskelet, santral sinir sistemi, üriner sistem infeksiyonlarının yanısıra toksinlere bağlı olarak gelişen: Haşlanmış deri sendromu, toksik şok sendromu besin zehirlenmeleri gibi infeksiyonlarla karakterize edilebilmektedirler (Manian 2003, Zubeir ve ark 2007).

S. aureus genomu: 2800 kbp uzunluğunda tek bir kromozomdan oluşup, G+C içeriği yaklaşık %32 moldür. *S. aureus*'un özellikle mukoid türlerinde polisakkarid yapıda bir mikrokapsül bulunmaktadır (Koneman ve ark 2006).

S. aureus suşların çoğunluğunun üzerinde bulunan protein A fagositoz için opsonizasyon derecesini sınırlandırarak immunglobulinlere Fc kısımları ile bağlanmaktadır. Protein A antifagositik, kemotaktik ve mitojenik etkiler göstermektedir. Protein A'nın saptanması, *S. aureus* için spesifik bir identifikasyon testi olarak da kullanılabilir. Çoğu *S. aureus*'un yüzeyi peptidoglikan tabakasına ya da stoplazmik membrana bağlanan protein A ile kaplanmıştır. İmmunglobulin (Ig) G1, IgG2 ve IgG4'ün Fc reseptörlerine bağlanarak, organizmanın antikor aracılı immun klirensini etkili bir şekilde önlemesini sağlamaktadır (Muray ve ark 2005).

Çoğu *S. aureus* suşunun en dış yüzeyinde önemli bir virulans faktör olan, clumping faktör (bağlı koagulaz) bulunmaktadır. Clumping faktör, fibrinojene bağlanarak fibrine dönüştürür ve stafilokokların kümeleşmesine sebep olmaktadır.

S. aureus, konak hücre morfolojisini ve fonksiyonunu etkileyen çok sayıda ekstraselluler toksin üretebilmektedir. Bunlardan bir kısmı toksik etkilerini enzimatik aktivite ile gösterirken, diğerleri süperantijen özellikleri nedeniyle sitokin salınımını indüklemektedir. *S. aureus* beş sitolitik veya membran hasarlayıcı toksin (alfa, beta, delta, gama ve Panton-Valentin (P-V) lökosidin), iki eksofoliyatif toksin (A ve B), sekiz enterotoksin (A, B, C, D, E, G, H ve I) ve Toksik Şok Sendromu Toksin-1 (TSST-1)'i içeren çok sayıda virulans faktörü üretmektedir (Muray ve ark 2005).

S. aureus köpeklerde otitis eksternaya sebep olmaktadır. Normal flora etkeni olmakla beraber hastalığın çeşitli hazırlayıcı sebepleriyle patojen etken durumuna geçtiği yapılan çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. 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 izolattan *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. Yapılmış olan bu araştırmalarda, *S. aureus* türünün otitis eksternalı köpeklerden farklı oranlarda izole edilmesi, hastalık etkenleri arasında olduğunu kanıtlar niteliktedir.

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

Yapılan çalışmalar *S. schleiferi* 'nin köpek ve kedilerdeki infeksiyonlarının sınırlı olduğunu, en fazla piyoderma ve otitis vakalarında rastlandığını bildirmektedir. Koagülaz negatif stafilokokların sık sık tür seviyesinde tanımlanamamasından dolayı; koagülaz 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 tanımlanmıştır (Leung ve ark 1999, Calvo ve ark 2000, Zdobc ve ark 2004).

Yapılan çeşitli çalışmalarda: *S. schleiferi subsp. schleiferi* köpekte süperfisial piyodermada, *S. schleiferi subsp. coagulans* ise 21 otitis eksternalı köpeğe ait suşlardan *S. intermedius*'dan sonra sık izole edilen ikinci etken olduğu rapor edilmiştir (İgimi ve ark 1990, Yamashita ve ark 2005).

1.2.6.9.3. *S. pseudintermedius*

Staphylococcus pseudintermedius ilk olarak 2005 yılında kedi, köpek, at ve papağanlardan alınan örneklerden izole edilerek tanımlanmıştır (Sasaki ve ark 2005). *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 agarada; kabarık, pigmentsiz, küçük tek δ -hemoliz ya da tam bir hemoliz oluşturarak üremektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda bu türün geniş çaplı a-hemoliz oluşturduğu gözlenmemiştir (Fitzgerald 2009).

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 (Guardabassi ve ark 2004). Ancak *S. delphini* ile fenotipik ayrımı oldukça zordur (Jones ve ark 2007). Bu nedenle *S. pseudintermedius*, çeşitli ticari test kitleri ve PZR yöntemleriyle daha doğru bir şekilde belirlenmektedir (Sing ve ark 2008, Ben Zakour 2012).

S. pseudintermedius, *S. aureus* türünün virulans faktörlerine benzer çeşitli virulans faktörlere sahiptir (Ruscher ve ark 2008, Van ve ark 2008). Bu virulans faktörleri; bakterinin konağa kolonizasyonunu, beslenme ve yayılmasını sağlayan işlemlerin hemen hemen hepsini içermektedir. *S. pseudintermedius* koagulaz, proteaz, termonukleaz gibi enzimler, hemolizinler, eksfoliyatif toksin ve enterotoksinleri üretmektedir (Zubeir ve ark 2007, Ruscher ve ark 2008). Ayrıca Luk-I olarak bilinen leucotoksin 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* bakterisinin dişi köpeklerden yeni doğan yavrulara kolonize olmasıyla gerçekleşmektedir (Epstein ve ark 2009).

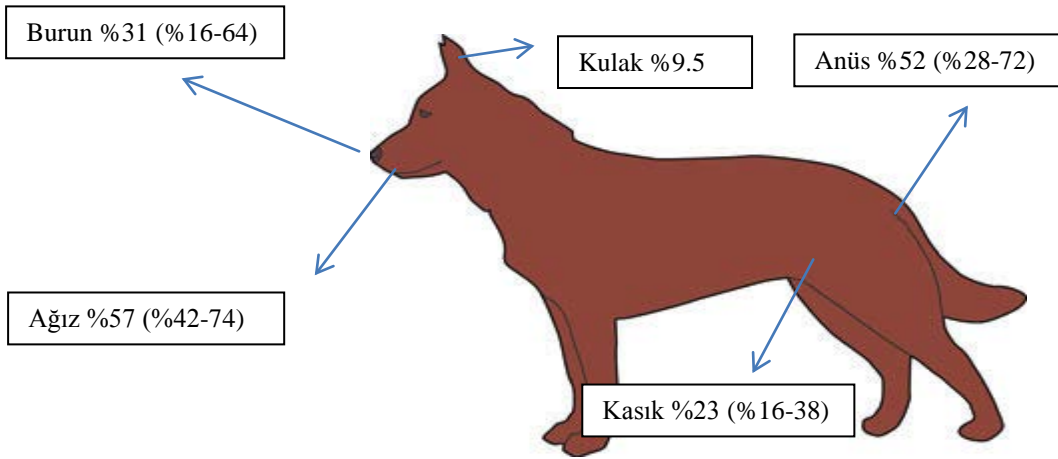
Bu nedenle söz konusu bakteri, yeni doğanlarda doğumdan bir gün sonra deri ve mukoz membranlarından izole edilebilmektedir. Yetişkin köpekler arasında horizontal geçişe ilişkin çok az literatür yer almaktadır. Yapılan çalışmalarda enfekte köpeklerin, sağlıklı olanlara söz konusu organizmayı bulaştırdıkları gözlenmektedir. Türler arası geçiş ise enfekte köpekler ile sahiplerinin temasları arasında olmaktadır (Kluytmans ve ark 1998, Yugueros ve ark 2000, Woo ve ark 2001, Wakita ve ark 2002, Van ve ark 2004, Couzinet ve ark 2005, Heikens ve ark 2005).

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 (Bond ve Loeffler 2012, Cristina ve Degi 2013, Udegbumam ve ark 2014).

1.2.6.9.4. *S. intermedius*

S. intermedius konakçılarının köpek, güvercin, vizon ve at olduğu bildirilen infeksiyonlardan ilk defa 1976 yılında Hajek tarafından tanımlanmıştır. Ardından Devriese ve Van de Kerckove'nin yapmış oldukları genotipik çalışmalar, Hajek'in araştırmalarıyla paralellik göstermiş ve tür doğrulanmıştır (Hajek 1976, Meyer ve Schleifer 1978, Biberstein ve ark 1984, Chesneau ve ark 2000, Bannoehr ve ark 2009).

S. intermedius, çoğunlukla hem sağlıklı hem de lezyonlu köpeklerden izole edilen bir mikroorganizmadır. Sağlıklı köpeklerin mukoz membranlarında kommensal olarak buldukları için ağız, kulak, burun, farenks ve anüslerinden izole edilebilirler (Şekil 1) (Hartmann ve ark 2005, Fitzgerald 2009, Bond ve Loeffler 2012, Petrov ve ark 2013).



Şekil 1. *Staphylococcus intermedius*'un köpeklerde sıklıkla izole edildiği yerler (Hartmann ve ark 2005, Fitzgerald 2009, Bond ve Loeffler 2012, Petrov ve ark 2013)

S. intermedius, *S. intermedius* grup (SIG) içinde yer almaktadır. Ayrıca *S. intermedius* grup (SIG) *S. pseudintermedius* ve *S. delphini* türlerini de kapsamaktadır (Fitzgerald 2009). *S. intermedius* kolonileri 2-4 mm çapında, opak, beyaz, düzgün kenarlı ve çok konveks değildir. Çoğunlukla kanlı agar da tam bir hemoliz oluştururlar. 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. Bu nedenle çeşitli ticari test kitleri ve PZR yöntemleriyle türler belirlenmektedir (Çizelge 3) (Gandra ve ark 2005, Jones ve ark 2007, Sing ve ark 2008, Fitzgerald 2009, Petrov ve ark 2013).

Çizelge 3. Köpek ve kedilerden izole edilen koagülaz pozitif stafilokok 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 ssp.coagulans</i>
Hemolitik Aktivite	+	+	+	+	+
Clumping Faktör	+	Değişken	Değişken	-	-
Tüp Koagülaz	+	+	+	+	+
VP	+	Zayıf	-	-	+
DNaz	+	+	+	Zayıf	+
Trehaloz	+	+	+	-	-
Laktoz	+	Değişken	+	+	-
Mannitol	+	-	-	+	Değişken

S. aureus, *S. intermedius*, *S. schleiferi subsp. coagulans*, *S. hyicus*, *S. lutrae*, *S. delphini* ve *S. pseudintermedius* bakterilerinden başka koagülaz pozitif altı stafilokok türü daha vardır (May ve ark 2005, 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, Oliveira ve ark 2008, Fitzgerald 2009, 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 (Aarestrup 2001, 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 (Manian 2003, Bannoehr ve ark 2009, Fitzgerald 2009).

Sasaki ve ark (2005) tarafından yapılan bir çalışmada *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* ve *S. delphini* parçalı *sod A* ve *hsp60* gen sekans baz alınarak filogenetik moleküler analizlerle ayrılmıştır.

Yapılan pekçok araştırmaya göre köpeklerden izole edilen en yaygın koagülaz pozitif stafilok türü *S. intermedius*'tur (Medleau ve ark 1986, Lilenbaum ve ark 2000, Hartmann ve ark 2005, Fitzgerald 2009, Bond ve Loeffler 2012, Petrov ve ark 2013).

Metisiline dirençli *S. intermedius* köpek ve kedilerde çoğunlukla piyoderma, otitis eksterna, mastitis, endometrit, sistit, osteomyelit ve deri infeksiyonlarına neden olmaktadır (Frank ve ark 2003, Guardabassi ve ark 2004, Weese ve ark 2006). Ayrıca, operasyonlar sonrası bazı dokularda sekonder infeksiyonlara da sebep olan fırsatçı bir etkindir (Morris ve ark 2006, Griffeth ve ark 2008).

S. intermedius *S. aureus*' a benzer bir takım virulans faktör üretirler. Bunlar proteaz, koagulaz, clumping faktör, enterotoksin, eksfoliyatif toksin, leukotoksin, alfa ve beta hemolizinlerdir. Yapılan çalışmalarda enterotoksin ve leukotoksin üreten suşların daha çok köpeğe ait olduğu bildirilmiştir. Bu virulans faktörler, bakterinin konağa kolonizasyonunu, beslenme ve yayılmasını sağlayan işlemlerin hemen hemen hepsini içermektedir. Bu özelliklerde bakterinin patojen bir organizma olmasına katkı sağlamaktadır (Scott ve ark 2001, Bes ve ark 2002, Hill ve ark 2006, Devriese ve ark 2009, Fitzgerald 2009, Bond ve Loeffler 2012, Petrov ve ark 2013).

S. intermedius'un ürettiği toksinlerden en önemlisi, veziküler ve eksfoliyatif deri lezyonlarından sorumlu epidermolitik bir toksin olan eksfoliyatif toksindir. SSSS ve piyodermadaki benzer klinik bulgulardan yola çıkarak bir takım araştırmacılar *S. intermedius*'un ürettiği toksininin *S. aureus* 'un eksfoliyatif toksinine benzer olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Terauchi ve ark (2003)'nın yapmış oldukları bir çalışmada *S. intermedius* 'un eksfoliyatif toksinini (SIET) izole etmiş ve serolojik olarak ETA, ETB, ETC 'den farklı olduğunu tespit etmişlerdir. Şimdiye kadar ki yapılan pek çok çalışmada: *S. intermedius*'un sadece köpeklerden izole edilen izolatlarının, *S. chromogenes* ve *S. hyicus* 'un ise domuzlardan izole edilen izolatlarının eksfoliyatif toksin ürettiği gözlemlenmiştir (Blaiotta ve ark 2005, Devriese ve ark 2009, Fitzgerald 2009, Bond ve Loeffler 2012, Petrov ve ark 2013).

S. intermedius, *S. aureus*'a benzer olarak Stafylokokkal Protein A (SPA) olarak adlandırılan immunoglobulin bağlayıcı protein de üretmektedir (Vitale ve ark 2006). Çoğu stafilokok gibi, bazı *S. intermedius* suçları da biofilm oluşturabilmektedir (Kikuchi ve ark 2004).

Köpek gibi pet hayvanlarının insanlardaki stafilokokkal infeksiyonlar için bir kaynak olabileceği çok uzun zamandır bilinmektedir. İnsanlarda yapılan çeşitli çalışmalarda *S. intermedius* infeksiyonlarının; köpek ısırıklarının oluşturduğu yaralarda (Lee 1998), kateterizasyon ile şekillenen bakteriyemide (Vandenesch ve ark 1995), bypass operasyonu

sonrası şekillenen pneumonide (Gerstadt ve ark 1999) ve otitis eksterna vakalarında (Tanner ve ark 2000) rol oynadığı gözlenmiştir.

Yapılan çeşitli çalışmalar kontamine çevrenin ortak kullanımını *S. intermedius*'un kross-kontaminasyonu ile sonuçlandığını vurgulanmaktadır (Duquette ve Nuttall 2004, Fitzgerald 2009, Moodley ve Guardabassi 2009, Bond ve Loeffler 2012, Cristina ve Degi 2013, Petrov ve ark 2013). Ayrıca bu hayvanların da *S. intermedius*'u yine insanlardan ya da insanlar tarafından kontamine edilmiş çevrelerden aldıkları da belirtilmektedir (Duquette ve Nuttall, 2004, Boost ve ark 2008, Morgan 2008, Loeffler ve ark 2010).

1.3. Sağlıklı Köpeklerin Dış Kulak Yollarından İzole Edilen Bakteriler

S. aureus, *S. schleiferi*, *S. epidermidis*, *S. hyicus*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. intermedius* ve *S. pseudintermedius* sağlıklı köpeklerden izole edilen stafilokok türlerindedir (Medleau ve ark 1986, Frank ve ark 2003, May ve ark 2005, Sasaki ve ark 2005, Petrov ve ark 2013).

Ayrıca *P. aeruginosa* ve *Streptococcus spp.* de izole edilen diğer bakteriler arasında yer almaktadır. Bu bakteriler flora etkeni olmalarından dolayı, kulak yolundaki yangısal değişikliklerde sekonder infeksiyonlara yol açmaktadır. Köpeklerin mukoz membranlarında kommensal olarak buldukları için çoğunlukla ağız, kulak, burun, farenks ve anüs bölgelerinden izole edilebilmektedirler (Terauchi ve ark 2003, Rosser 2004, Cristina ve Degi 2013).

1.3.1. *Staphylococcus spp.*

Kumar ve ark (2002)'nin yapmış oldukları çalışmada 200 sağlıklı köpeğin kulaklarından %99 oranla *Staphylococcus spp.* türlerini izole etmişlerdir. Yapılan başka bir çalışma da da *Staphylococcus spp.* oranı %68.3 oranında olup, sağlıklı köpeklerin dış kulaklarından stafilokok izolasyonunun diğer bakterilere göre yüksek olduğu gösterilmektedir (Yamashita ve ark 2005).

1.3.2. Koagulaz Pozitif Stafilokoklar

Koagulaz pozitif stafilokoklar içerisinde sağlıklı köpeklerin dış kulak yolundan izole edilen türler: *S. aureus* ve *S. intermedius* 'dur. Tejedor ve Martin (2002), Yoshida ve ark (2002) ,Yamashita ve ark (2005). Dickson ve Love (1983), Uchida ve ark (1994), Kumar ve ark (2002) tarafından yapılan çeşitli araştırmalar da stafilokok türlerinden *S. aureus* ve *S. intermedius* türlerinin sağlıklı köpeklerin kulak yollarında en fazla bulunan mikroorganizmalar olduklarını kanıtlar niteliktedir.

1.3.3. Koagulaz Negatif Stafilokoklar

Ozer ve ark (1999) sağlıklı köpeklerinin kulaklarında %62.5 oranında koagulaz negatif stafilokok izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bir diğer araştırmada ise Yoshida ve ark (2002) 77 örnekte yalnızca 17 izolatta koagulaz negatif stafilokok izole etmişlerdir.

1.3.4. *Staphylococcus epidermidis*

Chaudhary ve ark (2003)'nın yapmış oldukları bir çalışmada 77 kulak örneğinden 30 unda *S. epidermidis* bakterisine rastlamışlardır. Başka bir çalışmada Yamashita ve ark (2005) ise *S. epidermidis*' in köpeklerin normal florasında oldukça fazla olduğunu bildirmişlerdir.

1.3.5. *Pseudomonas aeruginosa*

Yapılan çeşitli çalışmalarda sağlıklı köpeklerin kulaklarında *P. aeruginosa* bakterisine az rastlanıldığı bildirilmiştir. Grono ve Frost (1969) yapmış oldukları çalışmada 124 örnekte *P. aeruginosa* türüne yalnızca %2.4 oranında rastlamıştır. Lorewnzini ve Sala (1983) ise söz konusu bakteriyi yalnızca bir izolatta izole etmişlerdir.

1.3.6. *Streptococcus spp.*

Kumar ve ark (2002) toplamda 200 sağlıklı köpeğin kulaklarına ait izolatlarda yalnızca iki örnekte *Streptococcus spp.* türüne rastlamışlardır. Chaudhary ve ark (2003) yapmış oldukları benzer bir çalışmada ise söz konusu bakterinin toplam örnek içinde %27.5 oranında olduğunu bildirmişlerdir. Yoshida ve ark (2002) da söz konusu bakterinin yalnızca üç izolatta rastladıklarını rapor etmişlerdir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Örneklerin Toplanması

Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi kliniklerinde ve Aydın ilinde hizmet veren özel bir köpek çiftliğinde bulunan 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 (Şekil 2,3).



Şekil 2. Otitis eksternalı ve sağlıklı köpeklerin belirlenmesi



Şekil 3. Örneklerin alınması

Alınan örnekler Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına soğuk zincirde getirilmiştir. Svap örnekleri ekim yapıncaya 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 yapıları ve hemoliz özellikleri de incelenerek stafilokok şüpheli kolonilerden gram boyama yapıldı.

Gram pozitif, kok bakterilere %30’luk H₂O₂ ile katalaz testi yapıldı. Katalaz testi pozitif olan bakterilere koagulaz testi uygulandı. Toplanan materyallerden izole edilen stafilokok şüpheli koloniler, makroskopik ve mikroskopik morfolojileri ve biyokimyasal özellikleri değerlendirilerek belirlendikten sonra kontaminasyonu önlemek ve saf koloniler elde etmek amacı ile kanlı besiyerlerine pasajları yapılarak inkübasyona bırakıldı. Bu suşlara daha sonra tavşan serumu ile koagulaz testi yapıldı. Lamda aglütinasyon gözlenen suşlar belirlendi. Yapılan biyokimyasal testlerden sonra koagulaz pozitif stafilokoklar belirlendi.

İdentifiye edilen koagulaz pozitif stafilokoklar içerisinde: *S. intermedius*’un aranması, ardından eksfoliatif toksin varlığının belirlenmesi amacıyla Tryptic Soy Agar(TSA)’a pasajları yapılanaya kadar +4°C’ de muhafaza edildi.

2.3. *S. intermedius*’ un PZR Metoduyla İdentifikasyonu

2.3.1. Stafilokokal DNA Ekstraksiyonu

İzole edilen koagulaz pozitif stafilokok suşlarında DNA izolasyonu için kaynatma yönteminden yararlanıldı. Bu amaçla suşlar Trypticase Soy Agar (TSA)’a ekilerek bir gece 37 °C’de üretildikten sonra biz öze dolusu saf koloni alınarak, 500 mikrolitrelik DNase-RNase free ependorf tüpünde fizyolojik tuzlu su ile süspanse edildi. Süspansiyen 100 derecede 10 dk kaynatıldıktan sonra 10 000 rpm de 10 dk santrifüj edildikten sonra üstte kalan sıvı alınarak PZR amplifikasyonunda hedef DNA olarak kullanılmak amacı ile -20 °C’de bekletilmiştir.

2.3.2. Primerler

S. intermedius nuc genleri 431 bp'lik segmentlerini spesifik olarak amplifiye eden primerler Çizelge 4'de gösterilmiştir.

Çizelge 4. *S. intermedius nuc* genleri 431 bp'lik segmentlerini spesifik olarak amplifiye eden primerler (Gandra ve ark 2005)

Gen	Primer	Sekans (5'-3')	PZR Ürünün Büyüklüğü (bp)	Referans
<i>nuc</i>	<i>nuc3</i>	CGCCGTTCTCTCTTTGG	431	Gandra ve ark 2005
	<i>nuc4</i>	CGCCTCTCACATCCG		

2.3.3. Standart Suş

nuc pozitif *S. intermedius* suşları Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim dalından temin edilmiştir.

2.3.4. PZR Karışımı

PZR Master Mix: 40 µl'lik final hacimde, final konsantrasyonları; her bir primer'den 1 µM (*nuc3* ve *nuc4*), 0.8 µM dNTP (200 µM), 10X PZR buffer'dan 4 µM, 2 mM MgCl₂ 'den 3.2 µM, 0,2 µl Taq polimeraz (1 U/µl), 24.8 µl steril distile su ve 5 µM örnek DNA olacak şekilde hazırlandı.

2.3.5. Amplifikasyon Koşulları

nuc3 ve *nuc4* için PZR amplifikasyon koşulları: 95°C'de 2 dk başlangıç denatürasyonu, 95°C'de 50 sn, 42°C'de 2 dk, 72°C' de 4 dk olmak üzere 40 siklusu ve 72°C'de 10 dk final ekstensiyon aşamasını içermektedir.

2.3.6. DNA Agaroz Jel Elektrofrez

Örnekler 20 cm'lik %1.5'luk agaroz jelde, 70 Volt'ta 1 saat elektroforez edildi.

2.4. *S. intermedius*'un Eksfoliatif Toksinin PZR Metoduyla Belirlenmesi

2.4.1. Primerler

S. intermedius'un *siet* genleri 145 bp'lik segmentlerini spesifik olarak amplifiye eden primerler çizelge 5'de gösterilmiştir.

Çizelge 5. *S. intermedius*'un *siet* genleri 145 bp'lik segmentlerini spesifik olarak amplifiye eden primerler (Sareyyüpoğlu ve ark 2013).

Gen	Primer	Sekans (5'-3')	PZR Ürünün Büyüklüğü (bp)	Referans
<i>siet</i>	<i>siet1</i>	AGCGTTAATAGTCCGGGTGG	145	Sareyyüpoğlu ve ark 2013
	<i>siet2</i>	CGGCTGGTGCTGAAATGTAG		

2.4.2. Standart Suş

siet pozitif *S. intermedius* suşları Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim dalından temin edilmiştir.

2.4.3. PZR Karışımı

PZR Master Mix: 25 µl'lik final hacimde, final konsantrasyonları: her bir primer'den 1 µM (10 pmol/ µM), 0.5 µl dNTP (10 mM), 10X PZR buffer'dan 2.5 µM, 2 mM MgCl₂ 'den 2

μM , 0.2 μl Taq polimeraz (5 U/ μl), 12.8 μl steril distile su ve 5 μM örnek DNA olacak şekilde hazırlandı.

2.4.4. Amplifikasyon Koşulları

siet1 ve *siet2* için PZR amplifikasyon koşulları: 94°C'de 3 dk başlangıç denatürasyonu, 94°C'de 30 sn, 54°C'de 30 sn, 72°C' de 30 sn olmak üzere 30 siklusu ve 72°C'de 3 dk final ekstensiyon aşamasını içermektedir.

2.4.5. DNA Agaroz Jel Elektrofrez

Örnekler 20 cm'lik % 1.5'luk agaroz jelde, 70 Volt'ta 1 saat elektrofrez edildi.

3. BULGULAR

3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

S. intermedius için, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi kliniklerinde ve Aydın ilinde hizmet veren özel bir köpek çiftliğinde bulunan 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 alınmıştır.

Laboratuvara getirilen örnekler %5'lik koyun kanlı agara ekim yapılarak 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda üreyen bakterilerin oluşturdukları kolonilerin yapıları ve hemoliz özellikleri de incelenerek stafilocok şüpheli kolonilerden gram boyama yapılmıştır.

Gram pozitif, kok bakterilere %30'luk H₂O₂ ile katalaz testi yapılmıştır. Katalaz testi pozitif olan bakterilere koagulaz testi uygulanmıştır. Toplanan materyallerden izole edilen stafilocok şüpheli koloniler, makroskopik ve mikroskopik morfolojileri ve biyokimyasal özellikleri değerlendirilerek, belirlendikten sonra kontaminasyonu önlemek ve saf koloniler elde etmek amacı ile kanlı besiyerlerine pasajları yapılarak inkübasyona bırakılmıştır. Bu suşlara daha sonra tavşan serumu ile koagulaz testi yapılmıştır. Yapılan biyokimyasal testlerden sonra suşların, koagulaz pozitif stafilocoklara ait olduğu belirlenmiştir.

Çalışma için toplanan 100 örneğin: 52 tanesi otitis eksternalı, 48 tanesi ise sağlıklı köpeklerin kulaklarına aittir. Yapılan ekimler sonucunda: 52 otitis eksternaya ait suşlardan 46 tanesinde bakteriyolojik üreme gözlenirken, diğer altı tanesinde *Candida spp.* gözlenmiştir. 48 sağlıklı köpeğin kulaklarına ait suşlarda ise: 32 tanesinde bakteriyolojik üreme gözlenirken, diğer 16 tanesinde üreme olmadığı saptanmıştır (Çizelge 6).

Sonuç olarak çalışmada toplam 100 örnekte 78'nin bakteriyolojik üremesi gözlenmiştir. 78 bakteriyolojik üreme gözlenen örnekte yapılan fiziksel ve biyokimyasal testler sonucunda: 39 'unun gr(+) kok ve katalaz(+), diğer 39 tanesinin ise gr(-) bakteriler olduğu tespit edilmiştir. Gr(+) kok olup katalaz(+) olan ve stafilocokların ayrımı içinde koagulaz testi yapılarak, 22 örnek koagulaz pozitif stafilocok olarak belirlenmiştir (Çizelge 7).

İdentifiye edilen koagulaz pozitif stafilokok suşlar: PZR tekniği uygulanarak *S. intermedius*' un *nuc* genlerinin belirlenerek, genotipik olarak saptanması ve ardından eksfoliatif toksin varlığının araştırılması için Tryptic Soy Agara pasajları yapılanaya kadar +4°C' de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 6. Otitis eksterna ve sağlıklı köpeklerden izole edilen suşlarda izolasyon bulguları

	İzole Edildiği Materyal	
	Otitis Eksternalı Köpekler	Sağlıklı Köpekler
Bakteri Üremesi Gözlenen	(n:46)	(n:32)
Bakteri Üremesi Gözlenmeyen	-	(n:16)
Mantar Üremesi Gözlenen	(n:6)	-
İncelenen Toplam Örnek Sayısı (n:100)	(n:52)	(n:48)

Çizelge 7. Otitis eksterna ve sağlıklı köpeklerden izole edilen suşlarda identifikasyon bulguları

				İncelenen Örnek Sayısı (n: 100)	
İzole Edilen Etiyolojik Etkenler				İzolatlar	İzolasyon Yüzdesi %
Gr(+) Stafilokok	Koagulaz Pozitif Stafilokoklar	<i>S. intermedius</i>	Otitis Eksternalı	4	4
			Sağlıklı	1	1
	Diğer KPS		17	17	
	Koagulaz Negatif Stafilokoklar		17	17	
Gr(-) Diğer Bakteriler				39	39
Bakteriyel Üreme Olmayan				16	16
Mantar/Maya				6	6
Toplam				100	100

Yapılan izolasyon ve identifikasyon çalışmalarına göre otitis eksternaya ait suşlardan 46, sağlıklı hayvanlardan izole edilen suşlardan ise 32 tanesinde bakteriyolojik üreme gözlenmiştir. 46 otitis eksternaya ait suştan 16 tane örneğin, 32 sağlıklı hayvanlara ait suştan

ise altı tanesinin koagulaz pozitif stafilokok olduğu belirlenmiştir. 22 koagulaz pozitif stafilokok suşundan; beş tanesinin *S. intermedius* olduğu, dört tanesinin otitis eksternalı köpeklerin kulaklarından ve bir tanesinin sağlıklı olanlardan izole edildiği tespit edilmiştir.

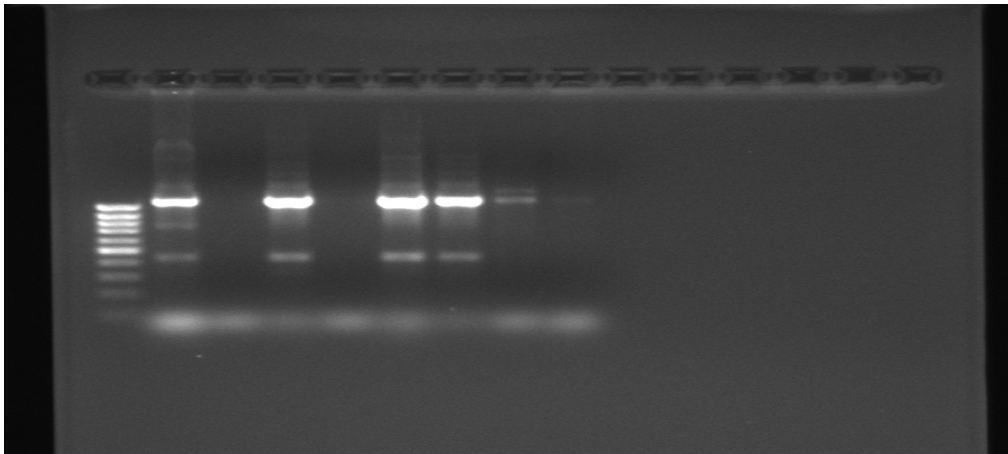
Bu durum *S. intermedius* bakterisinin otitis eksternaya yol açtığını, ayrıca sağlıklı köpeklerin kulaklarından izole edilebildiğini göstermektedir.

3.2. PZR Sonuçları

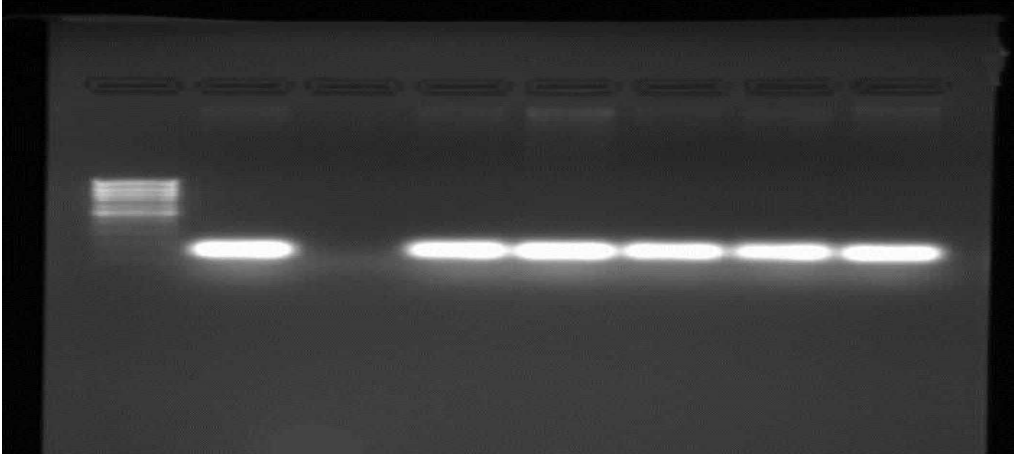
S. intermedius nuc genleri 431 bp'lik segmentlerini spesifik olarak amplifiye eden primerler kullanılarak yapılan PZR sonucunda; beş adet suş *S. intermedius* olarak bulunmuştur (Şekil. 4). *S. intermedius siet* genleri 145 bp'lik segmentlerini spesifik olarak amplifiye eden primerler kullanılarak yapılan PZR sonucunda; beş tanesi *siet* pozitif sonuç vermiştir. Sağlıklı hayvanlardan izole edilen bir suşa, PZR sonucunda *siet* pozitif gen saptanırken, otitis eksternaya ait örneklerde ise dört tanesinin *siet* pozitif olduğu saptanmıştır.

Bu çalışmada toplam 100 örnekte beş tanesi *siet* pozitif bulunmuştur. *siet* pozitif olanların bir tanesi sağlıklı köpekte, dört tanesi ise otitis eksternalı köpekte saptanmıştır (Şekil.5).

Yapılan PZR çalışmaları sonucunda hem sağlıklı hem de otitis eksternalı köpeklere ait suşlarda eksfoliatif toksini kodlayan *siet* geni tespit edilmiştir.



Şekil 4. *S. intermedius nuc* genleri 431 bp'lik segmentlerini spesifik olarak amplifiye eden primerler kullanılarak yapılan PZR ürünü görüntüsü (%1.5 agaroz jelde yürütülmüş ve UV altında görüntülenmiştir).



Şekil 5. *S. intermedius siet* genleri 145 bp'lik segmentlerini spesifik olarak amplifiye eden primerler kullanılarak yapılan PZR ürünü görüntüsü (%1.5 agaroz jelde yürütülmüş ve UV altında görüntülenmiştir).

4. TARTIŞMA

Otitis eksterna kedi ve köpeklerin en sık görülen kulak kanalını da içine alan akut ya da kronik seyirli dış kulak yangısıdır (Rosser 2004, Saridomichelakis ve ark 2007, Schick ve ark 2007, Petrov ve ark 2013). Oluşumunda ektoparaziter etkenler, dermatolojik ve alerjik hastalıklar, endokrin bozukluklar, yabancı cisimler, anatomik yapı, rutubet, neoplasmlar, sistemik ve otoimmün hastalıklar etkilidir (Keskin ve ark 1999, Blanco ve ark 2000, Jacobsona 2002, Petrov ve ark 2013).

Otitis eksterna vakalarından sorumlu olan infeksiyöz etkenler başta bakteriler olmak üzere maya ve mantarlardır. Hastalık vakalarından çoğunlukla izole edilen bakteriler: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, β -hemolitik *Streptococcus spp.*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium spp.*, koagülaz negatif stafilokoklar, mayalar: *Malassezia pachydermatis* ve *Candida spp.* mantarlardan ise *Aspergillus spp.* ve *Microsporum spp.*'dir (Rosser 2004, Blanco ve ark 2007, Schick ve ark 2007, Petrov ve ark 2013).

Köpeklerde dış kulak yolunun bakteriyel ve fungal florası ile ilgili olarak dünyada birçok araştırma yapılmıştır (Oliveira ve ark 2008). Bakteriyel ve mantar enfeksiyonlarının kulak hastalıklarına sekonder olarak katıldığı ve kulak kanalında primer bir hasar oluştuğunda normal florada bulunan mikroorganizmaların sekonder enfeksiyonlara yol açtığı rapor edilmiştir (Hariharan ve ark 2006).

Yapılan çeşitli çalışmalarda otitisli ve sağlıklı köpeklerin kulak svap örneklerinden, en fazla *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Microsporum spp.* ve *Trichophyton spp.* türlerinin izole edildiği bildirilmiştir (Keskin ve ark 1999, Crespo ve ark 2000, Lyskova ve ark 2007, Kumar ve ark 2002).

Lyskova ve ark (2007) otitisli köpeklerden %3.1 oranında *Candida spp.* ve %2.1 oranında *Aspergillus fumigatus* izolasyonu yaptıklarını, sağlıklı köpeklerin dış kulak kanalından ise maya ve mantar türü izole edilmediğini bildirmişlerdir. Yoshida ve ark (2002) sağlıklı köpeklerin kulak kanalından %12.3 oranında maya izole edildiğini rapor etmişlerdir. Borum ve ark (2014) yapmış oldukları bir çalışmada 52 otitis eksternalı köpeklerden en çok izole edilen mikroorganizmaların; *S. aureus* (%55.76) ve *Malassezia pachydermatitis*

(%17.30) olduğunu bildirmişlerdir. Diğer mikroorganizmalar arasında bildirilen *Candida spp.* ise %11.53 oranında olup, az bulunmuştur.

Sarıerler ve Kırkan (2004) 234 otitis eksternalı köpekten %11.53 oranında *S. aureus*, %6.42 oranında *Corynebacterium spp.*, %5.12 oranında koagulaz negatif stafilokok, %12.82 *Candida albicans*, %7.69 *Aspergillus fumigatus* mantarlarını izole ettiklerini rapor etmişlerdir. Yapılan çalışmalara ilave olarak, bu çalışmada ise otitis eksternalı köpeğin altı tanesinde *Candida spp.* saptanmış ve toplam 52 otitis eksternaya ait örnek içerisinde oranının az olduğu tespit edilmiştir.

Köpeklerde otitis eksterna vakalarından en çok izole edilen mikroorganizmalar arasında *S. intermedius* ve *S. aureus* %30 -%50 oranlarında rapor edilmiştir (Bensignor ve ark 2000, Martin ve ark 2000, Tejedor ve ark 2002, May ve ark 2005).

Keskin ve ark (1999)'nın yapmış oldukları bir çalışmada, 81 otitisli köpeğin 79 (%97.5)undan izolasyon yapıldığını ve en yüksek oranda *S. aureus*, *S. intermedius* *Malassezia pachydermatitis* (%21.6), *Pseudomonas spp.* (%9.6), *E. coli* ve *Candida spp.* (%2.4) izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Petrov ve ark (2013) tarafından yapılan bir çalışmada otitis eksternalı 193 köpekten en fazla (%45.2) koagulaz pozitif stafilokok izole ettiklerini rapor etmişlerdir.

Kuyucuoğlu ve Sarıtaş (2010) sağlıklı köpek kulaklarından en yüksek oranda *S. aureus* (%31.5), sonra sırasıyla *Streptococcus spp.* (%16.4), *Bacillus spp.* (%12.3), *S. intermedius* (%9.5), *Proteus spp.* (%8.2), *P. aeruginosa* (%8.2), *E. coli* (%6.8), *Candida spp.* (%4.2) ve *Aspergillus spp.* (%3.5) izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Lyskova ve ark (2007) *S. intermedius*'un izolasyon oranının sağlıklı köpeklerde otitisli köpeklere göre daha düşük oranlarda (%24.2) olduğunu rapor etmişlerdir.

Pena ve ark (2010)'ları otitisli köpeklerden %14.3 oranında *S. intermedius* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada %31.5 *Staphylococcus spp.*, olmak üzere, %16.4 *Streptococcus spp.*, %8.2 *Proteus spp.* ve %6.8 *E. coli* izolasyonunu rapor etmişlerdir (Penna ve ark 2010). Yapılan çalışmalara paralel olarak, bu çalışmada ise 46 otitisli köpeklerden izole edilen suşlar içerisinde, dört tanesinde *S. intermedius* bakterisine rastlanmıştır.

Köpeklerin dış kulak kanalından izole edilen *S. intermedius*'un toksin üretimi ve süperantijen olma özelliği ile zoonotik öneme sahip bir bakteri türü olabileceği belirtilmektedir (Becker ve ark 2001, Hendricks ve ark 2002, Teraucki ve ark 2003).

Sasaki ve ark (2005)'nin hasta ve sağlıklı köpeklerden izole ettikleri *S. intermedius* suşlarının enterotoksin üretimleri değerlendirilmiş, hasta köpeklere ait suşlarda toksin üretimi diğerlerine oranla daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Lautz ve ark (2006)'nın yapmış oldukları bir çalışmada, hasta ve sağlıklı köpeklere ait örneklerden izole ettikleri koagülaz pozitif stafilokoklar, PZR metoduyla fenotipik ve genotipik olarak araştırılmış ve *S. intermedius* suşlarında eksfoliatif toksini kodlayan *siet* geninin varlığına bakılmıştır. Çalışmanın sonunda *S. intermedius* izolatlarında eksfoliatif geninin varlığının toksinin klinik semptomlarda rolü olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca söz konusu araştırmacılar *S. intermedius* türünün köpeklerde hastalıklara yol açan bakteri türlerinin başında geldiğini, *siet*-spesifik PZR metodunun *S. intermedius*'un toksijenik potansiyelini araştırmada kullanılabilir olduğunu rapor etmişlerdir.

Oliveira ve ark (2008) ise otitisli köpeklerden %54.8 oranında *S. intermedius* izole etmişlerdir. Yapılan çalışmalara paralel olarak, bu çalışmada da otitis eksternalı köpeklerde *S. intermedius* oranı toplam 46 örnek içinde dört tane saptanmış, diğer bir örneğin ise 32 sağlıklı köpeğe ait suşlar içerisinde bir tane olduğu ve bu oranın toplam sayı içinde az olduğu tespit edilmiştir.

Rich ve ark (2006)'nin yapmış oldukları çalışmada ev hayvanı sahibi insanlarda *S. intermedius* kolonizasyonu (%27), köpeklerde ise %14.3 olarak belirlenmiştir. Cristina ve Degi (2013) araştırmacılarının otitis eksternalı köpekler ve sahipleriyle yapmış oldukları bir çalışmada ise, otitisli köpeklerden izole edilen *S. intermedius* bakteriler hayvan sahiplerinden de izole edilmiştir. Hayvan sahiplerinde aynı bakteri türünün izolasyonu, enfekte köpeklerden temas yoluyla geçişini, yani türler arası yayılmanın varlığını göstermektedir.

Sonuç olarak, köpeklerin dış kulak kanalından izole edilen *S. intermedius*'un primer hasara bağlı olarak otitise sebep olabilecek mikroorganizmalar olduğu belirlenmiştir. Ayrıca sağlıklı köpeğe ait bir örnekte belirlenen eksfoliatif toksin, hastalığın asemptomatik seyrini göstermektedir. *S. intermedius*'un ürettiği eksfoliatif toksinin otitis eksternaya yol açan temel etken olduğu gözlenmiştir.

5. SONUÇ

Otitis eksterna; dış kulak yolunun akut ya da kronik yangısı olarak tanımlanan ve multifaktöriyel etiyojiye sahip bir hastalıktır. Oluşumunda ektoparaziter etkenler, dermatolojik ve alerjik hastalıklar, endokrin bozukluklar, yabancı cisimler, anatomik yapı, rutubet, neoplasmlar, sistemik ve otoimmün hastalıklar etkilidir.

S. intermedius otitis eksterna ve piyodermalı köpeklerden sık izole edilen bir mikroorganizmadır. Ayrıca, *S. intermedius* bakterisinin sağlıklı hayvanların; kulak, oral, nasal ve anüs bölgelerinde bulunduğu da bilinmektedir. *S. intermedius* bir takım virulans faktör üretmektedir. Bunlar; proteaz, koagulaz, clumping faktör, enterotoksin, eksfoliatif toksin, leukotoksin, alfa ve beta hemolizinlerdir. Ürettiği toksinlerden en önemlisi; epidermolitik bir toksin olup, stafilokokal infeksiyonların veziküler ve eksfoliatif deri lezyonlarından sorumlu olan eksfoliatif toksindir. Yapılan çeşitli çalışmalarda hasta ve sağlıklı köpeklerden izole edilen *S. intermedius* suşları: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) metoduyla fenotipik ve genotipik olarak araştırıldığında, eksfoliatif toksini kodlayan *siet* genin varlığının klinik semptomlarda rolü olabileceği belirtilmiştir.

S. intermedius; toksin üretimi, süperantijen olma özelliği ile zoonotik öneme sahip son derece önemli bir mikroorganizmadır. Bu nedenle son yıllarda yapılan nozokomiyal ve toplum kökenli infeksiyon etkenleri çalışmalarında yer aldığı görülmektedir.

S. intermedius türünün köpeklerde hastalıklara yol açan mikroorganizmalar arasında yer alması, zoonoz olması ve infeksiyon-kolonizasyon ayrımı yapmada, direnç paternlerini değerlendirmede hekimleri zor durumda bırakması toksijenik potansiyellerinin araştırılmasını zorunlu kılmaktadır. Söz konusu nedenlerden dolayı, yapılan bu çalışmada otitis eksternalı ve sağlıklı köpeklerden izole edilen, *S. intermedius* suşlarında eksfoliatif toksini kodlayan *siet* genin varlığı PZR metoduyla fenotipik ve genotipik olarak araştırılmıştır.

Bu çalışmada toplam 100 örnekte 78'nin bakteriyolojik üremesi gözlenmiştir. Yapılan izolasyon, identifikasyon ve PZR çalışmalarına göre otitis eksternaya ait suşlardan 22 örneğin koagulaz pozitif stafilokok olduğu belirlenmiştir. 22 koagulaz pozitif stafilokok suşundan: 16 tanesi otitis eksternalı köpeklerin kulaklarından, altı tanesi ise sağlıklı olanlardan izole edilmiştir. 22 koagulaz pozitif stafilokok içinden *nuc3* ve *nuc4* genlerinin PZR metoduyla

araştırılması sonucunda beş suşun *S. intermedius* olduğu tespit edilmiştir. Sonrasında, yapılan PZR çalışmalarıyla hem sağlıklı hem de otitis eksternalı köpeklerle ait suşlarda eksfoliatif toksini kodlayan *siet* genin varlığı araştırılmış, beş örnekten söz konusu gen bulunmuştur.

Yapılan bu çalışmada otitis eksternalı ve sağlıklı köpeklerden elde edilen suşlarda saptanan *siet* geninin varlığı; sağlıklı köpeklerde hastalığın asemptomatik seyriyle, hasta köpeklerde ise hastalık etkeni olmasıyla açıklanabilmektedir.

ÖZET

Sağlıklı ve otitis eksternalı köpeklerden izole edilen *Staphylococcus intermedius*'un eksfoliatif toksininin belirlenmesi

S. intermedius'un köpeklerde otitis eksternaya neden olan türler arasında yer aldığı ve sık izole edildiği bilinmektedir. Ayrıca sağlıklı köpeklerin mukoz membranlarında kommensal olarak buldukları için ağız, kulak, burun, farenks ve anüslerinden de izole edilebilirler. *S. intermedius*'un toksin üretimi ve süperantijen olma özelliği ile zoonotik öneme sahip bir bakteri türü olduğu bilinmektedir. *S. intermedius*'un ürettiği toksinlerden en önemlisi, epidermolitik bir toksin olan eksfoliatif toksindir.

Bu çalışmada, *S. intermedius*'un eksfoliatif toksinini kodlayan *siet* geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) tekniğiyle belirlenmesi ve sağlıklı köpeklerle otitis eksternalı köpekler arasındaki oranının karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamız için farklı ırk, yaş ve cinsiyetteki 52 otitis eksternalı ve 48 sağlıklı köpeğin kulaklarına ait toplam 100 örnek alınmıştır. Otitis eksternalı köpeğe ait izole edilen suşlardan 46 tanesinde bakteriyolojik üreme gözlenirken, yapılan fenotipik ve biyokimyasal testler sonucunda 22 örneğin koagulaz pozitif stafilokok olduğu belirlenmiştir. 22 suşun: 16 tanesinin otitis eksternalı köpeklerin kulaklarına, altı tanesinin ise sağlıklı olanlara ait olduğu tespit edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 22 koagulaz pozitif stafilokok suşun, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) tekniğiyle *nuc* genleri belirlenmiş ve suşların beş tanesinin *S. intermedius* olduğu genotipik olarak doğrulanmıştır. Sonrasında, bu suşlarda eksfoliatif toksinini kodlayan *siet* geni PZR tekniğiyle beş örnekte belirlenmiştir. *siet* geni: 16 otitis eksternalı köpekten izole edilen suşların dört tanesinde bulunurken, altı sağlıklı köpekten izole edilen suşlarda ise bir tanesinde saptanmıştır.

Sonuç olarak; köpeklerden izole edilen suşlarda eksfoliatif toksini kodlayan *siet* geninin saptanması, *S. intermedius*'un eksfoliatif toksininin köpeklerde otitis eksternaya yol açtığını kanıtlamaktadır. Çalışmada sağlıklı köpeklere ait bir suştada *siet* geni saptanmış olması ise hastalığın asemptomatik seyrinden ileri geldiği düşünülmektedir. Köpeklerde otitis eksternaya sebep olan stafilokokların ve bu stafilokokların virulens özelliklerinden *siet* geninin hızlı ve güvenilir olarak belirlenmesi, tedavi ve korunma anlamında hastalıkla daha etkili mücadele için klinik olarak önemli bilgiler sunacaktır.

Anahtar Kelimeler: Köpek, *Staphylococcus intermedius*, eksfoliatif toksin, otitis eksterna

SUMMARY

Determination of *Staphylococcus intermedius*'s exfoliative toxin isolated from healthy dogs and dogs with otitis externa

S. intermedius causing otitis externa include species which are known and frequently isolated. In addition *S. intermedius* can be found commensals as in mucous membrane of mouth, ear, nose, pharynx and anus of healthy dogs and can be isolated from there. Because of producing toxin and being superantigen, *S. intermedius* is an important zoonotic feature bacteria. The most important producing toxin which by *S. intermedius* is exfoliative toxin (*siet*).

Aim of this study was to develop a Polymerase Chain Reaction (PCR) technique for determinate of *siet* gene encoding exfoliative toxin in *S. intermedius* and to compare its presence ratio between *S. intermedius* isolates from healthy and dogs with otitis externa. We used 100 isolates (52 isolates from dogs with otitis externa, 48 isolates from healthy dogs) in this study. This isolates collected from ears of dogs which different breed, age and sex. Although 22 isolates (16 isolates dogs with otitis externa, six isolates healthy dogs) were coagulase positive staphylococci result from phenotypic and biochemical tests, bacterial growth was observed in 46 isolates of isolated from dogs with otitis externa. *nuc* genes of this 22 isolates were determined with PCR technique and five isolates (four isolates from dogs with otitis externa, one isolates from healthy dogs) of this 22 isolates were genotypically verified which they are *S. intermedius*. After that *siet* gene encoding exfoliative toxin was determined with PCR technique in this five isolates.

Consequently, exfoliative toxin of *S. intermedius* causes otitis externa in dogs has proven based from determining *siet* gene encoding exfoliative toxin in collected isolates from dogs. The reason for determining *siet* gene from one healthy dog isolates believed to be caused by the course of the disease asymptomatic. Rapid and secure detection of staphylococci causing otitis externa in dogs and their virulence markers like *siet* gene will provide important data for clinical practice to manage the disease more effectively by means of treatment and prevention.

Key Words: Dog, *Staphylococcus intermedius*, exfoliative toxin, otitis externa

KAYNAKLAR

Aarestrup FM. Comparative ribotyping of *Staphylococcus intermedius* isolated from members of the canoidea gives possible evidence for host specificity and coevolution of bacteria and hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary* 2001;51(4):1343-1347.

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, Aydın N, Izgur M, Diker S. Identification and antibiotic sensitivty of microganisms isolated from dogs with otitis externa. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1984;31:452-462.

Arda M, Aydın N, Ilgaz A. Özel Mikrobiyoloji. 4. Baskı. Ankara: Medisan Yayınevi;1997.

Aydın N, İzgür M, Diker KS, Yardımcı H, Esendal Ö, Paracıkoğlu J, Akan M. *Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar)*. Ankara: İlke-Emek Yayınları; 2006. p. 5-13.

Baba T, Takeuchi F, Kuroda M. Genome and virulance determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* 2002; 359: 1819-1827.

Bagcigil FA, Moodley A, Baptiste KE, Jensen VF, Guardabassi L. Occurence, species distrubution, antimicrobial resistance and clonality of methicillin and erythromycin resistant staphylococci in the nasal cavity of domestic animals. *Veterinary Microbiology* 2007;121(3-4):307-315.

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.

Ben Zakour NL, Beatson SA, VandenBroek AHM, Thoday KL, Fitzgerald J. Comparative genomics of the *Staphylococcus intermedius* group of animal pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2012;10: 3389.

Bes M, Guerin-Fauble V, Freney J, Etienne J. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* from two cases of canine pyoderma. *Veterinary Record* 2002;150(15):487-488.

Biberstein EL, Jang SS, Hirsh DC. Species distribution of coagulase positive staphylococci in animals. *Journal of Clinical Microbiology* 1984;19:610-615.

Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 3.Baskı. İzmir: Barış Yayınları; 2002.p. 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.

Blanco J. L, Guedeja M. J, Blanco I, Garcí M. E. Optimum incubation conditions for the isolation of yeasts from canine otitis externa. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 2000;47(8):599.

Blanco JL, Guedeja-Marrón J, Blanco I, García ME. Optimum incubation conditions for the isolation of yeasts from canine otitis externa. *Veterinary Dermatology* 2007;18(2):120-126.

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.

Boost MV, O'Donoghue MM, James A. Prevalence of *Staphylococcus aureus* carriage among dogs and their owners. *Epidemiology and Infection* 2008;136(7):953-964.

Borum AE, Çeçen G, Demir G, Cetin C, Şentürk S. Köpeklerde otitis externa vakalarından izole edilen mikroorganizmalar ve antibakteriyel duyarlılıklarının belirlenmesi. *Kocatepe Veteriner Dergisi* 2014;7(1).

Boyle-Vavra Daum R.S. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* the role of Panton-Valentine leukocidin. *Laboratory Investigation* 2007;87:3-9.

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.

Calvo J, Hernandez JL, Farinas MC, Garcia-Palomo D, Agüero J. Osteomyelitis caused by *Staphylococcus schleiferi* and evidence of misidentification of this staphylococcus species by an automated bacterial identification system. *Journal of Clinical Microbiology* 2000;38(10):3887-3889.

Cengiz AT. *Staphylococcus spp.* Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabı. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999.p.339-346.

Ceylan E, Körkoca H, Bozkurt H, Kutroğlu G, Ağaoğlu Z.T, Berktaş M.M. Sağlıklı Köpek dışkılarından Oksidaz Pozitif, Gram Negatif Bakterilerin İzolasyon ve İdentifikasyonu ve Antimikrobiyel Duyarlılıklarının Belirlenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2002;12:47-49.

Chaudhary M, Mirakhur K. K, Jand S. K. Antibioqram and microbiological patterns of external ear canal of dogs with reference to otitis. *Indian Veterinary Journal* 2003;80(9):951-952.

Chesneau O, Morvan A, Aubert S, El Solh N. The value of rRNA gene restriction site polymorphism analysis for delineating tax a in the genus *Staphylococcus*. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology* 2000;50:689-697.

Cole L.K, Kwochka K.W, Kowalski J. J, Hillier A, Hoshaw W.S.L. Evaluation of an ear cleanser for the treatment of infectious otitis externa in dogs. *Veterinary Therapeutics* 2003;4(1):12-23.

Couzinet S, Jay C, Barras C, Vachon R, Vernet G, Ninet B, Jan I, Minazio MA, Francois P, Lew D, Troesch A, Schrenzel J. High-density DNA probe arrays for identification of staphylococci to the species level. *Journal of Microbiological Methods* 2005;61(2):201-208.

Cristina RT, Degi J. Multiresistant *Staphylococcus intermedius* isolated from otitis externa in dogs and them human owners –A practical approach. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2013;29:1351-1356.

Devriese LA, Hermans K, Baele M, Haesebrouck F. *Staphylococcus pseudintermedius* versus *staphylococcus intermedius*. *Veterinary Microbiology* 2009;133(1-2):206-207.

Dickson DB, Love DN. Bacteriology of the horizontal ear canal of dogs. *Journal of Small Animal Practice* 1983;24:413-421.

Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews* 2000;13:16-34.

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.

Duquette RA, Nuttall TJ. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dogs and cats: an emerging problem. *Journal of Small Animal Practice* 2004;45(12):591-597.

Epstein CR, Yam WC, Peiris JSM, Epstein RJ. Methicillin-resistant commensal staphylococci in healthy dogs as a potential zoonotic reservoir for community-acquired antibiotic resistance. *Infection, Genetics and Evolution* 2009;9(2):283-285.

Fitzgerald RJ. The *Staphylococcus intermedius* group of bacterial pathogens: species re-classification, pathogenesis and the emergence of methicillin resistance. *Veterinary Dermatology* 2009;20:490-495.

Frank LA, Kania SA, Hnilica KA, Wilkes RP, Bemis DA. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from dogs with pyoderma. *American Veterinary Medical Association* 2003;222(4):451-454.

Gandra EÁ, Silva JA, Macedo MRP, Araújo MR, Mata MM, Silva WP. Differentiation between *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* using phenotypical tests and PZR. *Alimentos e Nutrição Araraquara* 2005;16:99-103.

Gerstadt K, Daly J.S, Mitchell M, Wessollosky M, Cheeseman S.H. Methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* pneumonia following coronary artery bypass grafting. *Clinical Infectious Diseases* 1999;29:218-219.

Gortel K, Campbell KL, Kakoma I, Whittem T, Schaeffer DJ, Weisiger RM. Methicillin resistance among staphylococci isolated from dogs. *American Journal of Veterinary Research* 1999;60(12):1526-1530.

Griffeth GC, Morris DO, Abraham JL, Shofer FS, Rankin SC. Screening for skin carriage of methicillin resistant coagulase positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. *Veterinary Dermatology* 2008;19(3):142-149.

Grono LR, Frost AJ. Otitis externa in the dog. The microbiology of the normal and the affected external ear canal. *Australian Veterinary Journal* 1969;45:420-422.

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.

Guardabassi L, Schwarz S, Lloyd DH. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2004;54(2):321-332.

Gülay Z. Antibakteriyel ilaçların etki mekanizmaları. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2008. p.227-243.

Hajek V. *Staphylococcus intermedius* a new species isolated from animals. *International Journal Of Systematic Bacteriology* 1976;26:401-408.

Hartmann FA, White DG, West SEH, Walker RD, Deboer DJ. Molecular characterization of *Staphylococcus intermedius* carriage by healthy dogs and comparison of antimicrobial susceptibility patterns to isolates from dogs with pyoderma. *Veterinary Microbiology* 2005;108:119-131.

Heikens E, Fleer A, Paauw A, Florijn A, Fluit AC. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43(5):2286-2290.

Hill PB, Lo A, Eden CA, Huntley S, Morey V, Ramsey S, Richardson C, Smith DJ, Sutton C, Taylor MD, Thorpe E, Tidmarsh R, Williams V. Survey of the prevalence, diagnosis and treatment of dermatological conditions in small animals in general practice. *Veterinary Record* 2006;158(16):533-539.

Igimi S, Takahashi E, Mitsuoka T. *Staphylococcus schleiferi subsp. coagulans subsp. nov.* isolated from the external auditory meatus of dogs with external ear otitis. International journal of systematic bacteriology 1990;40(4):409-411.

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 and 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.

Kalorey DR, Dakshinkar NP, Kurkure NV, Warke S, Sakhare PS. Antibacterial activity of a herbal ear drops for pets. The Veterinarian 2004; 28:18.

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.

Kikuchi K, Karasawa T, Piao C, Itoda I, Hidai H, Yamaura H, Totsuka K, Morikawa T, Takayama M. Molecular confirmation of transmission route of *Staphylococcus intermedius* in mastoid cavity infection from dog saliva. Journal of Infection and Chemotherapy 2004;10(1):46-48.

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

Kitao T. Survey of methicillin-resistant coagulase negative staphylococci isolated from the fingers of nursing students. Journal of Infection and Chemotherapy 2003;9(1):30-34.

Klein BU, Muller E. Bacteria and fungi associated with external otitis in dogs and cats their resistance to antimicrobial agents. *Kleinterpraxis* 1999;44(1):27-30.

Kluytmans J, Berg H, Steegh P, Vandenesch F, Etienne J, Van Belkum A. Outbreak of *Staphylococcus schleiferi* wound infections: Strain characterization by randomly amplified polymorphic DNA analysis, PZR ribotyping, conventional ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* 1998;36(8):2214-2219.

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.

Kwon NH, Park KT, Jung WK, Youn HY, Lee Y, Kim SH, Bae W, Lim JY, Kim JY, Kim JM, Hong SK, Park YH. Characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat and hospitalized dogs in Korea and their epidemiological relatedness. *Veterinary Microbiology* 2006;117(2-4):304-312.

Lautz S, Kanbar T, Alber J, Lämmler C, Weiss R, Prenger-Berninghoff E, Zschöck M. Dissemination of the gene encoding exfoliative toxin of *Staphylococcus intermedius* among strains isolated from dogs during routine microbiological diagnostics. *Journal Of Veterinary Medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health* 2006;53(9):434-438.

Lee AH, Swaim SF, McGuire JA. Effects of chlorhexidine diacetate, povidone-iodine and polyhydroxydine on wound healing in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1988;24:77.

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.

Lodise TP, McKinnon PS. Clinical and economic impact of methicillin resistance in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2005;52:113-122.

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.

Logas D.B. Diseases of the ear canal. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 1994;24:905-919.

Lorenzini R, Sala V. Clinical and diagnostic criteria in otitis externa of dogs experimental studies. *Atti della Societa italiana della Scienza Veterinarie* 1983;37:366-369.

Lyskova P, Vydrzalova M, Mazurova J. Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria and yeasts isolated from healthy dogs and dogs with otitis externa. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 2007;54:559-563.

Maltezou H, Giamarellou H. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. International Journal of Antimicrobial Agents 2006;27:87-96.

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.

Martin B, Lubida G, Gonzales L, Tejedor J. Antibacterial Susceptibility Patterns of *Pseudomonas* Strains Isolated from Chronic Canine Otitis Externa. Jama Veterinary Medical B Infections Public Health 2001;47(3):191-196.

May ER, Hnilica KA, Frank LA, Jones RD, Bemis DA. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from healthy dogs and dogs with otitis, pyoderma, or both. Journal of the American Veterinary Medical Association 2005;227:928-931.

Medleau L, Long RE, Brown J, Miller WH. Frequency and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from canine pyodermas. American Journal of Veterinary Research 1986;47:229-231.

Meucci V, Vanni M, Guardabassi L, Moodley A, Soldani G, Intorre L. Evaluation of methicillin resistance in *Staphylococcus intermedius* isolated from dogs. Veterinary Research Communications 2010;34(1):79-82.

Meyer SA, Schleifer KH. Deoxyribonucleic acid reassociation in the classification of coagulase positive staphylococci. Archives of Microbiology 1978;117:183-188.

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.

Moodley A, Guardabassi L. Clonal spread of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci among horses, personnel and environmental sites at equine facilities. Veterinary Microbiology 2009;137(3-4):397-401.

Moreillon P, Que Y, Glauser MP. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock) In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. (Eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2005.p.2321-2351.

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.

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. Medical Microbiology. Philadelphia: Elsevier Press; 2005.p.203-212.

Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. 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.

Ozer K, Sengoz G, Arkan N, Saroglu M, Gulenber EG, Uluturk S. Treatment of otitis externa with systemic enrofloxacin, fluconazole and methylprednisolone in dogs. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 1999;23(2):479-489.

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 Universitesi 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.

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

Rosser E.J. Causes of otitis externa. Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice 2004;34:459-468.

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.

Samsar E, Akın F. Özel Cerrahi. 5. Baskı. Ankara: Mediopres Yayınevi; 2006.

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

Sarıdomichelakis MN, Farmaki R, Leontides LS, Koutinas AF. Aetiology of canine otitis externa: a retrospective study of 100 cases. Veterinary Dermatology 2007;18(5):341-347.

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.

Schick AE, Angus JC, Coyner KS. Variability of laboratory identification and antibiotic susceptibility reporting of *Pseudomonas spp.* isolates from dogs with chronic otitis externa. Veterinary Dermatology 2007;18(2):120-126.

Scott D.W, Miller W.H, Griffin C.E. Diseases of eyelids, claws, anal sacs, and ears. Muller and Kirk's Small Animal Dermatology 2001;6:1203-1235.

Scott D.W, Miller W.H. Idiopathic cutaneous adverse drug reactions in the dog literature review and report of 101 cases (1990-1996). Canine Practice 1999;24:16-22.

Simoons SAM, Verweij V, Vught AMJJ, MacLaren DM. Virulence of *Klebsiella* strains in experimentally induced skin lesions in the Mouse. Journal of Medical Microbiology 1984;17:67-77.

Sing A, Tuschak C, Hormansdorfer S. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a family and its pet cat. The New England Journal of Medicine 2008;358(11):1200-1201.

Tanner M.A, Everett C. L, Youvan D. C. Molecular phylogenetic evidence for noninvasive zoonotic transmission of *Staphylococcus intermedius* from a canine pet to a human. Journal of Clinical Microbiology 2000;8:1628-1631.

Tejedor JMT, Martin BJL. Identification and antimicrobial susceptibility of coagulase positive staphylococci isolated from healthy dogs and dogs suffering from otitis externa. Journal of Veterinary Medicine Series B 2002;49(9):419-423.

Terauchi R, Sato H, Hasegawa T, Yamaguchi T, Aizawa C, Maehara N. Isolation of exfoliative toxin from *Staphylococcus intermedius* and its local toxicity in dogs. Veterinary Microbiology 2003;94:19-29.

Turner PJ. Meropenem Activity Against European Isolates: Report on the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection 2006 Results. Diagnostic Microbiology and Infect Disease 2008;60:185-192.

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

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

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

Ünal S. *Staphylococcus aureus* Direnç Mekanizmaları. In: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Gram pozitif bakteri infeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004.p.23-38.

Van DE, Houwers DJ, Schoormans A, Broekhuizen-Stins MJ, Ikawaty R, Fluit AC, Wagenaar JA. Transmission of methicillin resistant *Staphylococcus intermedius* between humans and animals. Veterinary Microbiology 2008;128(1-2):213-215.

Van Duijkeren E, Box ATA, Heck MEOC, Wannet WJB, Fluit AC. Methicillin resistant staphylococci isolated from animals. Veterinary Microbiology 2004;103(1-2):91-97.

Vandenesch F, Celard M, Arpin D, Greenland M, Etienne J. Catheter-related bacteremia associated with coagulase-positive *Staphylococcus intermedius*. Journal of Clinical Microbiology 1995;33:2508-2510.

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.

Wakita Y, Kawano J, Shimizu A, Hajek V, Tomisaka E, Yasuda R, Matsuo E. Development of a PZR test for the identification of *Staphylococcus intermedius* based on the 16S rDNA sequence. The Journal of Veterinary Medical Science 2002;64(7):603-605.

Weese JS, Archambault M, Willey BM, Hearn P, Kreiswirth BN, Said-Salim B, McGeer A, Likhoshvay Y, Prescott JF, Low DE. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel, 2000-2002. *Emerging Infectious Diseases* 2005;11(3):430-435.

Weese JS, Dick H, Willey BM, McGeer A, Kreiswirth BN, Innis B, Low DE. Suspected transmission of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. *Veterinary Microbiology* 2006;115(1-3):148-155.

Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, Van Leeuwen W, Van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet Infectious Diseases* 2005;5(12):751-762.

Woo PC, Leung AS, Leung KW, Yuen KY. Identification of slide coagulase positive, tube coagulase negative *Staphylococcus aureus* by 16S ribosomal RNA gene sequencing. *Molecular Pathology* 2001;54(4):244-247.

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.

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.

Yugueros J, Temprano A, Berzal B, Sanchez M, Hernanz C, Luengo JM, Naharro G. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase encoding gene as a useful taxonomic tool for *Staphylococcus spp.* *Journal of Clinical Microbiology* 2000;38(12):4351-4355.

Zdovc I, Ocepek M, Pirs T, Krt B, Pinter L. Microbiological features of *Staphylococcus schleiferi subsp. coagulans*, isolated from dogs and possible misidentification with other canine coagulase positive staphylococci. *Journal of veterinary medicine B, Infectious diseases and veterinary public health* 2004;51(10):449-454.

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

Özgenur YILMAZ 1988 yılında Kocaeli ilinin Gölcük ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Gölcük'te tamamladıktan sonra, 2008 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı ve 2012 yılında mezun oldu. Ekim 2012' den bu yana, ADÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisidir.

TEŞEKKÜR

Tez çalıŐmalarım boyunca ilgi ve yardımlarımı gördüğüm danışmanım Doç.Dr. Serap SAVAŞAN'a, ADÜ Veteriner Fakóltesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı BaŐkanı Prof.Dr. Osman KAYA'ya, Yrd.Doç.Dr.Uğur PARIN'a, materyal temininde yardımlarıyla Veteriner Hekim Canberk BALIKÇI'ya ve annem Nagihan BaŐhan'a sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.