



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



**DOKTORA TEZİ**

**PYODERMA SAPTANAN KÖPEKLERDEN İZOLE EDİLEN *Staphylococcus pseudintermedius* TÜRLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

**Begüm MAŞLAK**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Arzu Funda BAĞCIGİL**

**II. DANIŞMAN**  
**Doç. Dr. Arshnee MOODLEY**

**Veterinerlik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı**

**Veterinerlik Mikrobiyolojisi, Doktora Programı**

**Mayıs, 2023**

## TEZ KABUL VE ONAYI

Begüm MAŞLAK tarafından, Prof. Dr. Arzu Funda BAĞCIGİL danışmanlığında hazırlanan "PYODERMA SAPTANAN KÖPEKLERDEN İZOLE EDİLEN Staphylococcus pseudintermedius TÜRLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU" başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 03/05/2023 tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi		İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Prof. Dr. Arzu Funda BAĞCIGİL İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Mikrobiyoloji Anabilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
	Prof. Dr. Seyyal AK İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Mikrobiyoloji Anabilim Dalı		<input type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
ÜYE	Doç. Dr. Banu DOKUZEYLÜL İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa İç Hastalıkları Anabilim Dalı		<input type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
ÜYE	Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı		<input type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
ÜYE	Doç. Dr. Elçin GÜNAYDIN Kastamonu Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı		<input type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret



Bu yolda bana destek olan sevdiklerime ithaf ediyorum...

## **BÜTÇE DESTEKLERİ**

**PYODERMA SAPTANAN KÖPEKLERDEN İZOLE EDİLEN *Staphylococcus pseudintermedius* TÜRLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: TUA-2019-31077

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi ve önerileriyle daima yolumu aydınlatan, desteğini esirgemeyen, çok değerli danışmanım Prof. Dr. Arzu Funda BAĞCIGİL'e, Lisansüstü eğitimim süresince değerli bilgi ve önerileriyle bana yol gösteren Mikrobiyoloji Anabilim dalı Başkanı Prof. Dr. Seyyal AK'a, Mikrobiyoloji Anabilim dalı hocalarım Prof. Dr. Serkan İKİZ, Doç. Dr. Kemal METİNER, Doç. Dr. Beren BAŞARAN KAHRAMAN, Doç. Dr. Belgi DİREN SİĞİRCİ'ya,

Mesafelerin bilim desteğine mani olmayacağını bize öğreten kıymetli tez ikinci danışmanım Assoc. Prof. Dr. Arshnee MOODLEY'e, tez çalışmam boyunca yardımlarını ve dostluklarını esirgemeyen, Dr. Baran ÇELİK, Dr. Barış HALAÇ, Dr. A. İlgin KEKEÇ ve teknisyenimiz Gülten KARAKUZ'a,

Antibiyotiplendirme çalışmalarındaki desteği ve bilgi birikimi ile yol gösteren Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ'ye, Tez çalışmam ve proje sürecinde gerek örnek toplama gerek yapılan çalışmalar sırasında bana yol gösteren, Doç. Dr. Banu DOKUZEYLÜL, Doç. Dr. Lora KOENHEMSİ hocalarıma,

Her zaman bana yardım etmekten çekinmeyen dostlarım Dr. Nisa SİPAHİ, Bilim Uzmanı Nilüfer ERZAİM, Vet Hek. Burak ALABAŞ, Vet. Hek. Başak KAYMAZ, Vet. Hek. Cansu ENGİN, Vet. Hek. Yalçın ABUL, Vet. Hek. Mevlut YENER, Vet. Hek. Hager ABUGHONEM'e,

Bu süreçte daima yanımda olup beni motive eden çok kıymetli yol arkadaşım Dr. Hakkı Seçkin ÇETİN'e, Tez çalışmam sırasında benden desteklerini asla esirgemeyen ve her zaman yanımda olduğunu hissettiren sevgili annem, babam ve kardeşime çok teşekkür ederim.

Mayıs 2023

**Begüm MAŞLAK**

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI.....	ii
BÜTÇE DESTEKLERİ.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ .....	x
ÖZET.....	xi
ABSTRACT .....	xiii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE .....</b>	<b>2</b>
2.1. <i>Staphylococcus</i> cinsi, <i>S. intermedius</i> (SIG) grubu ve <i>S. pseudintermedius</i> .....	2
2.2. <i>S. pseudintermedius</i> 'un köpeklerde neden olduğu enfeksiyonlar.....	3
2.3. <i>S. pseudintermedius</i> ' un Zoonotik önemi .....	4
2.4. <i>S. pseudintermedius</i> 'un Biyofilm Oluşturma Yeteneği ve diğer virulens faktörleri .....	5
2.5. <i>S. pseudintermedius</i> ve Antimikrobiyal Direnç .....	8
2.6. <i>S. pseudintermedius</i> Enfeksiyonlarında Tanı.....	12
2.7. <i>S. pseudintermedius</i> Enfeksiyonlarında Tedavi ve Korunma .....	13
<b>3. YÖNTEM .....</b>	<b>15</b>
3.1. GEREÇ .....	15
3.1.1. Örnekler.....	15
3.1.2. Besiyerleri.....	15
3.1.3. Ayraçlar ve Kimyasallar.....	16
3.1.4. Antibiyotik Diskleri.....	17
3.1.5. Moleküler Çalışmalar .....	17
3.1.6. Diğer Gereçler.....	23
3.2. YÖNTEM.....	23
3.2.1. <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> İzolasyonu ve İdentifikasyonu .....	23

3.2.2. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıklarının Saptanması.....	25
3.2.3. Biyofilm Oluşturma Özelliğinin Saptanması.....	29
3.2.4. İstatistiksel Analiz.....	31
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>32</b>
4.1. <i>S. pseudintermedius</i> İzolasyonu .....	32
4.2. İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları .....	34
4.2.1. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıklarının Fenotipik Olarak Değerlendirilmesi ve Antibiyotiplendirme.....	34
4.2.2. Antibiyotik Direnci ile İlişkili Belirli Genlerin Saptanması Sonuçları .....	37
4.3. Biyofilm Oluşturma Özelliğinin Saptanması .....	43
4.3.1. Fenotipik Olarak Biyofilm Oluşturma Yeteneğinin Saptanması .....	43
4.3.2. Genotipik Olarak Biyofilm Oluşturma Özelliğinin İncelenmesi .....	45
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>47</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>60</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>61</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>73</b>
<b>İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....</b>	<b>80</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 4.1 <i>S. pseudintermedius</i> spesifik PCR agaroz jel elektroferез görüntüsü.....	32
Şekil 4.2 <i>S. pseudintermedius</i> izolasyonun yapıldığı pyoderma lezyonlarının bulunduğu bölgeler.....	34
Şekil 4.3 İzolatların 13 antibiyotiğe karşı duyarlılıklarına göre antibiyotip dendogramı.....	36
Şekil 4.4 <i>mecA</i> genini saptamaya yönelik PCR'in agaroz jel elektroferез görüntüsü.....	38
Şekil 4.5 <i>blaZ</i> genini saptamaya yönelik PCR'in agaroz jel elektroferез görüntüsü.....	39
Şekil 4.6 <i>ermB</i> genini saptamaya yönelik PCR'in agaroz jel elektroferез görüntüsü.....	40
Şekil 4.7 <i>ermC</i> genini saptamaya yönelik PCR'in agaroz jel elektroferез görüntüsü.....	40
Şekil 4.8 <i>tet(K)</i> genini saptamaya yönelik PCR'in agaroz jel elektroferез görüntüsü.....	41
Şekil 4.9 <i>tet(L)</i> ve <i>tet(M)</i> genlerini saptamaya yönelik PCR'in agaroz jel elektroferез görüntüsü.....	41
Şekil 4.10 <i>cat</i> (set 1) genini saptamaya yönelik PCR'in agaroz jel elektroferез görüntüsü....	42
Şekil 4.11 <i>aac(6')</i> - <i>aph(2'')</i> gen bölgelerini saptamaya yönelik PCR'in agaroz jel elektroferез görüntüsü.....	42
Şekil 4.12 CRA'da biyofilm pozitif ve negatif izolatların görünümü.....	43
Şekil 4.13 CRA ve MTP test ile biyofilm oluşturma yeteneğinin değerlendirilmesi sonuçları	44
Şekil 4.14 <i>icaA</i> genini saptamaya yönelik PCR'in agaroz jel elektroferез görüntüsü.....	45
Şekil 4.15 <i>icaD</i> genini saptamaya yönelik PCR'in agaroz jel elektroferез görüntüsü.....	46

## TABLO LİSTESİ

	<b>Sayfa No</b>
Tablo 3.1. Antibiyotik direnci ile ilişkili gen bölgeleri.....	22
Tablo 4.2 Hasta bilgileri ve SP pozitifliği oranları.....	33
Tablo 4.3 İzolatların Antibiyotik Direnç Prevalansları.....	35
Tablo 4.4 Dirençli antibiyotik sayısına göre antibiyotipler ve izolat sayıları .....	37
Tablo 4.5 CRA ve MTP testleri ile biyofilm oluşturma yeteneğinin değerlendirilme sonuçlarının karşılaştırılması.....	44
Tablo 6 : Ham veriler .....	73

## SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
°C	: Santigrat Derece
µl	: Mikrolitre
gr	: Gram
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
L	: Litre
rpm	: Revolutions Per Minute
Bp	: Baseper
Pmol	: Pikomol

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
<b>CDC</b>	: Centers for Disease Control and Prevention
<b>CLSI</b>	: Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>CRA</b>	: Congo Red Agar
<b>FTS</b>	: Fizyolojik Tuzlu Su
<b>MDR</b>	: Multi Drug Resistant
<b>MHA</b>	: Mueller Hinton Agar
<b>MSA</b>	: Mannitol Salt Agar
<b>MSSP</b>	: Methicillin Susceptible <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
<b>MRSA</b>	: Methicillin Resistance <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>MRSP</b>	: Methicillin Resistance <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
<b>MTP</b>	: Multititer Plate Test
<b>PCR</b>	: Polymerase Chain Reaction
<b>PDR</b>	: Pan Drug Resistant
<b>SIG</b>	: <i>Staphylococcus intermedius</i> grubu
<b>SP</b>	: <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>

## ÖZET

### [DOKTORA TEZİ]

# [ PYODERMA SAPTANAN KÖPEKLERDEN İZOLE EDİLEN STAPHYLOCOCCUS PSEUDINTERMEDIUS TÜRLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU ]

[Begüm MAŞLAK]

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Veterinerlik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Veterinerlik Mikrobiyolojisi, Doktora Programı

[Danışman : Prof. Dr. Arzu Funda BAĞCIGİL

II. Danışman : Doç. Dr. Arshnee MOODLEY ]

Pyoderma, köpeklerde karşılaşılan deri hastalıklarının arasında önemli bir yer tutmaktadır. Pyodermaya neden olan bakteriyel etkenlerin en başında *Staphylococcus pseudintermedius* gelmektedir. Zoonoz karakteri olan bu etkenin çevre ve halk sağlığı açısından da önemi çok büyüktür. Bu çalışmanın amacı; klinik olarak pyoderma tanısı konulan köpeklerden *S. pseudintermedius* izolasyon oranının belirlenmesi, antibiyotik direnç profili ile biyofilm oluşturma yeteneklerinin fenotipik ve genotipik olarak değerlendirilmesini içermektedir. Bu amaçla; İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Kliniğine getirilen ve pyoderma tanısı konulan 205 köpeğin lezyonlu bölgelerinden alınan sıvab örnekleri, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda *S. pseudintermedius* yönünden incelenmiştir. İncelenen örneklerin %53,17 (n=109)'sinden *S. pseudintermedius* izole edilmiştir. İzolatların fenotipik olarak antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Bununla birlikte metisilin (*mecA*), beta laktamaz (*blaZ*), makrolid (*ermA*, *ermB*, *ermC*), tetrasiklin (*tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*), kloramfenikol (*cat set1*, *cat set2*) ve gentamisin (*aac (6')*- *aph (2'')*) direnci ile ilişkili gen bölgeleri PCR yöntemi ile incelenmiştir. Biyofilm oluşumunun değerlendirilmesinde Congo Red Agar Yöntemi ve Mikrotiter Plate Test kullanılmıştır. Ayrıca biyofilm oluşturma yeteneği ile ilişkili gen bölgeleri (*icaA*, *icaD*) de PCR yöntemi ile incelenmiştir. 13 farklı antibiyotik ile yapılan antibiyotik duyarlılık testi incelenmesine göre yapılan antibiyotiplendirme sonucunda 24 antibiyotikte çoklu antibiyotik direnci saptanmıştır. En çok direnç belirlenen antibiyotikler penisilin (n=60), sulfisoksazol (n=50) ve tetrasiklin (n=41) olmuştur. İzolatların dokuzunda ise oksasiline dirençli olarak

saptanmıştır. Fenotipik MRSP olan 9 izolatta *mecA* geni saptanmamıştır. Bununla birlikte bu izolatlarda *blaZ* gen varlığı belirlenmiştir. Biyofilm oluşturma yeteneğinin değerlendirilmesinde fenotipik olarak yapılan iki yöntemin sonuçları karşılaştırılmıştır. Biyofilm oluşturma özelliği fenotipik olarak negatif olan izolatlarda ilgili gen bölgelerinin varlığı saptanmıştır. Ülkemizde bu etken ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır. Özellikle veteriner hekimlikte önemli bir nozokomiyal patojen olan *S. pseudintermedius*'un zoonotik karakteri ve gelişmiş olan antibiyotik direnci gözardı edilmemelidir. ]

Mayıs 2023 , [99] sayfa.

**Anahtar kelimeler:** [Antimikrobiyal Direnç, Biyofilm, Köpek, Pyoderma, *Staphylococcus pseudintermedius*. ]



## ABSTRACT

[Ph.D. THESIS]

[MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Staphylococcus pseudintermedius*  
SPECIES ISOLATED FROM DOGS WITH PYODERMA

[BEGÜM MAŞLAK]

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Microbiology

Name of Programme

[Supervisor : Prof. Dr. Arzu Funda BAĞCIGİL

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Arshnee MOODLEY ]

Pyoderma is the most important disease that the dogs encountered in skin diseases. *Staphylococcus pseudintermedius* is the most frequently bacterial agent that cause pyoderma. This agents' zoonotic character is the great importance for environment and public health. The aim of this study includes determining the isolation rate of *S. pseudintermedius* from dogs with pyoderma, phenotypic and genotypic evaluation of antibiotic resistance profiles and biofilm formation abilities. For this purpose, swab samples taken from the lesioned areas of 205 dogs, which were brought to Istanbul University- Cerrahpaşa, Faculty of Veterinary Medicine, Internal Medicine Department Polyclinic and diagnosed as pyoderma as a result of clinical examinations, were examined for *S. pseudintermedius* in the Department of Microbiology. *S. pseudintermedius* was isolated from 53.17% (n=109) of the examined samples. Phenotypically antibiotic susceptibility test of the isolates was determined by disc diffusion method. However, the gene regions associated with methicillin (*mecA*), beta lactamase (*blaZ*), macrolide (*ermA*, *ermB*, *ermC*), tetracycline (*tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*), chloramphenicol (*cat set1*, *cat set2*) and gentamicin (*aac (6')-aph (2'')*) resistance were investigated by PCR. Congo Red Agar Method and Microtiter Plate Test were used to evaluate biofilm formation. In addition, gene regions (*icaA*, *icaD*) associated with biofilm formation ability were also investigated by PCR. As the result of the antibiotic susceptibility test performed with 13 different antibiotics, multi drug resistance was detected in 24 antibiotypes. The most resistant antibiotics were penicillin (n=60), sulfisoxazole (n=50) and tetracycline (n=41). Oxacillin resistance was detected in 9

isolates. The *mecA* gene was not detected in 9 isolates with phenotypic MRSP. However, the presence of *blaZ* gene was determined in these isolates. The results of two phenotypic methods were compared to evaluate the biofilm forming ability. The presence of relevant gene regions was determined in isolates that were phenotypically negative for biofilm formation. There are limited studies about *S. pseudintermedius* in Türkiye. The zoonotic character and developed antibiotic resistance of *S. pseudintermedius*, which is an important nosocomial pathogen especially in veterinary medicine, should not be ignored. ]

May 2023, [99] pages.

**Keywords:** [Antimicrobial Resistance, Biofilm, Dog, Pyoderma, *Staphylococcus pseudintermedius*]



## 1. GİRİŞ

Köpekler geçmişten bu yana insanlar ile sürekli etkileşimde olan varlıklardır. Modern dünya düzeninde de köpekler ile insanlar ortak yaşam alanlarını kullanmakta ve insanlara yol arkadaşlığı etmektedirler. Eşlikçi olarak hayatlarımızda yer almalarının dışında arama kurtarma çalışmaları gibi birçok alanda da köpekler görev almaktadır. Ülkemizde de sahipli ve sahipsiz olmak üzere yüksek sayıda köpek varlığı mevcuttur. Tarım ve Orman Bakanlığının sisteminden Aralık 2022’de alınan verilere göre ülkemizde 305.505 kimliklendirilmiş ve sahipli köpek olmakla birlikte, İstanbul’da bu sayı 82.553 olarak bildirilmiştir. Birlikte oluşturulan bu düzende; insan, hayvan ve çevre zincirinde dengelerin bozulmaması açısından tek sağlık ilkeleri göz ardı edilmeksizin koruyucu önlemlerin alınması çok önemlidir.

Son yıllarda sağlık bilimlerindeki en büyük problemlerden birisi antibiyotiklere dirençli bakterilerdir ve yapılan araştırmalar çoklu antibiyotik direnci varlığını da ortaya çıkarmıştır. Bu durumda zoonoz etkenlerin yayılması, türler arasındaki bulaşma riskleri ve koruyucu hekimlik aşamasında veteriner hekimlere büyük görev düşmektedir. Hastanelerde ve veteriner kliniklerinden alınan yüzey örneklerinden, veteriner hekimler ve hayvan bakıcılarından alınan numuneler ile yapılan mikrobiyolojik analizler bu bakterilerin varlığını açıkça göstermektedir. Köpeklerde karşılaşılan deri hastalıklarının arasında pyoderma önemli bir yer tutmaktadır. Pyodermaya neden olan bakteriyel etkenlerin en başında da *S. pseudintermedius* gelmektedir. Özellikle veteriner hekimlikte önemli bir nozokomiyal patojen olan *S. pseudintermedius*’un zoonoz karakteri ve gelişmiş olan antibiyotik direnci gözardı edilmemelidir. Ülkemizde bu etken ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır.

Bu çalışmanın amacı; klinik muayene ve yardımcı testleri takiben pyoderma tanısı konulan köpeklerden *S. pseudintermedius* izolasyon oranının belirlenmesi, antibiyotik direnç profili ile biyofilm oluşturma yeteneklerinin fenotipik ve genotipik olarak değerlendirilmesini içermektedir.

## 2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

### 2.1. *Staphylococcus* cinsi, *S. intermedius* (SIG) grubu ve *S. pseudintermedius*

Stafilokoklar, *Staphylococcus* genusu, *Eubacteriales* takımının *Micrococaceae* familyasına ait mikroorganizmalar olup ilk olarak 1880 yılında Alexander Ogston tarafından tanımlanmıştır. Bu mikroorganizmalar Gram pozitif karakterde, fakültatif anaerob, hareketsiz ve sporsuz yuvarlak şekilli bakteriler olup kümeleşerek üzüm salkımı benzeri görünüm oluştururlar. Memelilerin ve kanatlıların mukoz membranları ile derilerinde, üst gastrointestinal sistem, solunum sistemi ve ürogenital sistemlerinde yer alabilmektedirler (Shoen ve diğ., 2019). İlk tanımlanan tür *Staphylococcus aureus* bunu *S. epidermidis* takip etmiştir. Bu mikroorganizmalar arasında koagülaz üretimi ana ayırt edici faktör olarak bildirilmiştir. *S. aureus* koagülaz pozitif, *S. epidermidis* ise negatiftir. Bununla birlikte koagülaz pozitif stafilokoklar (KPS) arasında insanlarda en önemli patojen *S. aureus* olarak belirlenmiş olup, hayvanlarda ise onun yerini *Staphylococcus pseudintermedius* almıştır (Markey ve diğ., 2013). Hayvanlarda stafilokokal enfeksiyonlar ile ilişkili en yaygın türler; *S. aureus*, *S. pseud(intermedius)*, *S. hyicus*, *S. chromogenes*, *S. aureus* subsp. *anaerobius*, *S. delphini*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* ve *S. felis*'tir (Markey ve diğ., 2013). Köpeklerdeki en yaygın etken ise *S. pseudintermedius*' tur. Stafilokoklar normal floranın parçası olarak var olmak ile birlikte fırsatçı karakterlerinden dolayı yerleştiği konağın farklı bölgelerinde de enfeksiyona sebep olabilmektedirler. Bunların başında deri enfeksiyonları, solunum yolu enfeksiyonları, otit, konjunktivit, idrar yolu enfeksiyonları, operasyon bölgesi enfeksiyonları, özellikle köpeklerde ısırık yarası ve yumuşak doku enfeksiyonları gelmektedir (Sasaki ve diğ., 2004; Schwarz ve diğ., 2007; Fitzgerald, 2009; Bonnoehr ve Guardabassi, 2012). *S. intermedius*, ilk olarak 1976 yılında Hajek tarafından güvercin, köpek, vizon ve atlardan yapılan çalışmada bildirilmiştir. Devriese ve diğ. (2005), kedi, köpek, at ve papağandan yapılan çalışmada izole edilen stafilokokun üreme özellikleri, biyokimyasal özellikleri ve DNA-DNA hibridizasyonlarının incelemesi sonucunda bunun yeni bir stafilokok türü olduğunu saptamıştır. Böylelikle *S. pseudintermedius*' u yeni bir stafilokok türü olarak bildirmiştir. *S. intermedius* 'un 16S rRNA sekans analizi ile yeniden sınıflandırılması sonucu; *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* ve *S. delphini*' den oluşan *S. intermedius* grubu (SIG) belirlenmiştir

(Fitzgerald, 2009; Bannoehr ve Guardabassi, 2012). Bu tanımlama ile köpeklerde ve kedilerde enfeksiyona sebep olan, aynı zamanda normal floralarında da kolonize olan ve *S. intermedius* olarak tanımlanmış birçok izolatın SIG olduğu önerilmiştir. 2018 yılında yapılan bir çalışmada insan derisinden izole edilen *Staphylococcus cornubiensis*'in de SIG' e dahil olduğu bildirilmiştir (Murray, 2018).

## 2.2. *S. pseudintermedius*'un köpeklerde neden olduğu enfeksiyonlar

*S. pseudintermedius*, köpeklerin deri, kıl örtüsü, burun, ağız ve anüs bölgelerinde doğal olarak kolonize olmaktadır (Diribe ve diğ., 2015). Kommensal ve fırsatçı patojen olan *S. pseudintermedius*, köpeklerde pyoderma olgularında en sık izole edilen bakteriyel patojendir (Bannoehr ve Guardabassi, 2012; Beck ve diğ., 2012; Proietti ve diğ., 2012; Stefanetti ve diğ., 2017; Lee ve Yang, 2019; Silva ve diğ., 2021). *S. pseudintermedius* sağlıklı köpeklerin %90'ında kolonize olan ve yapılan bir çalışmada salyadan izole edilen en yaygın tür olduğu bildirilmiştir (Somayaji ve diğ., 2016). Sağlıklı köpeklerin epidermal hücrelerine tutunabilmektedir ve bu durum özellikle atopik dermatitli köpeklerde gözlenmektedir. Bunun yanında otit, idrar yolları enfeksiyonları, pyoderma ve yaralardan sıklıkla saptanan etkenlerden biridir. Köpeklerde Metisilin Dirençli *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) kolonizasyonu genel olarak burun ve anüste bildirilmiştir, fakat aynı zamanda analiz yapılan bölgelerin de genellikle bu bölgeler olduğu bildirilmiştir (Duijkeren ve diğ., 2011). Milano ve Napoli'de bulunan iki üniversitenin veteriner hastanesinde yapılan çalışmada, hastane kliniklerine deri problemleri ve otit eksterna şikayetleri ile gelen köpeklerin kulak kepçesi ve derilerinden alınan svablardan 242 *S. pseudintermedius* izole edilmiştir (Nocera ve diğ., 2020). Sağlıklı köpeklerin yaklaşık olarak %90'ında *S. pseudintermedius* kolonizasyonu mevcuttur, konağın bağışıklık sistemindeki zayıflık durumunda ya da deri bütünlüğünün bozulduğu durumlarda enfeksiyona sebep olabildiği bildirilmiştir (Somayaji ve diğ., 2016; Balachandran ve diğ., 2018, Krapf ve diğ., 2019). Kore'de yapılan bir çalışmada sağlıklı ve otit eksternalı köpeklerde sırasıyla %36 ve %68 oranında *S. pseudintermedius* izole edilmiştir; bu sonuçlar etkenin, otit eksterna için önemli bir patojen olduğunu ve sağlıklı köpeklerde de sıklıkla izole edildiğini desteklemiştir (Lee ve Yang, 2019). SIG etkenlerinin oküler hastalıklarda apse ve keratit oluşumunun da primer etkeni olduğu bildirilmiştir (Kang ve diğ., 2014). Çin'de köpeklerdeki keratit olgularından yapılan çalışmada %23,08 oranında *S. pseudintermedius* izole edilmiş ve en yüksek oranda izole edilen stafilokok olduğu bildirilmiştir (Wang ve diğ., 2022).

*S. pseudintermedius* köpeklerde süperfisyel ve derin pyoderma başta olmak üzere; otit (Sherer, 2018), idrar yolu enfeksiyonları (Rubin ve Gaunt, 2011), yara ve operasyon bölgesi enfeksiyonlarının primer nedenidir (van Duijkeren ve diğ., 2011; Lynch ve Helbig, 2021). Pyometra tanısı konulan iki köpektan alınan irin ve eksudat örneklerinden (Huber ve diğ., 2022), mastit ve endokardit vakalarından (Abouelkhair, 2018) *S. pseudintermedius* izole edildiği bildirilmiştir. Bununla birlikte *S. pseudintermedius* oküler enfeksiyonlar (Kang ve diğ., 2014; Soimala ve diğ., 2020; Wang ve diğ., 2022), bronkopneumoni ve vücut boşluklarındaki enfeksiyonlara da neden olmaktadır (Grönthal ve diğ., 2017).

Köpeklerde pyoderma sıklıkla karşılaşılan bir sağlık sorunudur, ancak etiyojisi incelendiğinde oluşumunda rol oynayan birçok faktör bulunmaktadır. Stafilokoklar da pyoderma olgularından izole edilen bakteriyel etkenlerin başında gelmektedir. Eski çalışmalarda *S. intermedius* olarak tanımlanan, ancak tür dağılımına bakıldığında günümüzdeki moleküler tekniklerin katkısıyla artık *S. pseudintermedius* olarak belirlenen stafilokok türü köpeklerde pyodermanın başlıca etkeni olarak tanımlanmaktadır. *S. pseudintermedius* pyoderma vakalarının %60'ında izole edilen en önemli türdür (Worthing, 2018).

Ülkemizde ise *S. pseudintermedius* ile ilgili yapılan çalışmalar az sayıdadır; barınaklardaki köpeklerinden yapılan bir çalışmada, köpeklerin deri lezyonlarından alınan örneklerin %80,4'ünde *S. pseudintermedius* izolasyonu yapılmıştır (Sareyyüpoğlu ve diğ., 2014). Müştak ve diğ. (2020), deri enfeksiyonu olan 77 köpekte yaptıkları çalışmada 61 *S. pseudintermedius* suşu izole etmiştir. Kıbrıs'ta otit eksterna ve deri lezyonları olan köpek ve kedilerden alınan örneklerden yapılan bir çalışmada; köpek izolatlarının %56'sı, kedilerin ise %4'ü *S. pseudintermedius* olarak bildirilmiştir (Tamakan ve Göçmen, 2022).

### **2.3. *S. pseudintermedius*' un Zoonotik önemi**

*S. pseudintermedius* türlerinin zoonotik önemi son yıllarda daha çok gündeme gelmeye başlamıştır. İnsan ve hayvanlar arasında türler arası geçişi engelleyen bariyerler doku tropizimi, değişik hücre reseptörleri, türler arası farklı mikrobiyota, sağlık ve immun sistem durumları vb. gibi faktörlerdir. Ancak bu bariyerler aşıldığında, hayvan patojenlerinin insanlara kolonize olabileceği ve daha ciddi enfeksiyonlara neden olabileceği için, daha çok hayvan ve özellikle de köpek patojeni olarak tanımlanan *S. pseudintermedius* 'un ekolojisi, virulens faktörleri gibi birçok faktörlerini inceleyen çalışmalar önem içermektedir (Kmieciak., 2018). Son yıllarda *S. pseudintermedius* ' un hem insanlarda hem de köpeklerde aynı genotipik özelliklere sahip suşlarının izole edilmesine bağlı olarak zoonoz etkenler arasında da yer almaya başlamıştır

(Hoovels ve diğ. 2006, Duijkeren ve diğ. 2011, Paul ve diğ. 2011, Somayaji ve diğ. 2016, Meroni ve diğ. 2019, Asleh ve diğ. 2022). Hayvan hastanelerinde çalışan doktor ve yardımcı personelin MRSP taşıyıcısı olabilecekleri ve etkeni bir hayvandan başka bir hayvana bulaşmasında rol oynayabileceği görüşü son yıllarda önem kazanmaktadır (Youn ve diğ, 2011). *S. pseudintermedius* enfeksiyonu ilk olarak bir insanda 2006 yılında Belçika’da yapılan bir çalışmada bildirilmiştir; çalışmada öncelikle biyokimyasal analizler aşamasında kolaylıkla *S. aureus* ile karıştırıldığı ardından son olarak yapılan genotipik ve fenotipik testler birlikte değerlendirilerek etkenin izolasyonu yapılmıştır (Hoovels ve diğ, 2006). İnsanlarda *S. pseudintermedius* yaygın olarak deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ile ilişki olup, etken bulaşma yolunun genellikle evcil köpekler olduğu bildirilmiştir (Somayaji ve diğ., 2016). Vincze ve diğ. (2010), kronik deri problemi olan bir köpek ve sahibinde moleküler tiplendirme yöntemleri ile tamamen aynı özelliklere sahip *S. pseudintermedius* izole etmişlerdir. Bunun yanında bu patojenin sahip olduğu antibiyotik direnç özelliği tedavi yöntemlerini de kısıtlamaktadır. Onkoloji hastası 12 yaşındaki immun sistemi baskılanmış bir çocukta MRSP izole edilmiştir, çocuğun iki ev köpeği ile yakın temasta olduğu bildirilmiş olup bu vakada olduğu gibi bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar için ev hayvanları ile yaşam konusunda bilgilendirilmeleri önerilmiştir (Asleh ve diğ, 2022).

#### **2.4. *S. pseudintermedius*'un Biyofilm Oluşturma Yeteneği ve diğer virulens faktörleri**

Stafilokoklarda biyofilm oluşturma yeteneği önemli virulens faktörlerinden birisidir. Protein, DNA, polisakkarit ve sudan (%97) oluşan ekstraselüler biyofilm matriksinin koruyucu kimyasal yapısı sayesinde bakterilerin; metabolizma yapısı belirgin bir şekilde değişmiş olup, hücreler arası iletişim yeteneği gelişmiş (Quorum Sensing), buldukları konağın immun sistem hücrelerinden ve antimikrobialerin etkilerinden korunabilir özellik kazandıkları belirlenmiştir (Singh ve diğ, 2013). Ekzopolisakkarit matriks içinde kümeleşen bakterilere immun sistem hücrelerinin ulaşımı engelleneceği için bu durum fagositozu güçleştirmektedir. Biyofilm matriksi aynı zamanda pH değişimleri, UV, nem, ısı değişimi, su kaybı ve ozmotik basınca karşı da bakteriyi korumaktadır. Böylelikle biyofilm oluşumu bakterinin çoğalmasını ve hayatta kalmasını destekler nitelikte bir yapıdır, bu durumda bakterinin meydana getirdiği enfeksiyonun tedavisi güçleşmektedir (Singh ve diğ, 2017).

*S. pseudintermedius* suşları, *S. aureus* ve *S. epidermidis* türleri gibi biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir ve bu özelliğin, etkenin değişik yüzeylerde uzun süre canlı kalmasında rol oynayabileceği düşünülmektedir. Stafilokoklarda biyofilm oluşturma yeteneklerinin

belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda az, orta ve kuvvetli şeklinde sınıflandırılmalar yapılmıştır (Stepanovic ve diğ., 2007, Singh ve diğ., 2013, Diribe ve diğ., 2015). Biyofilm oluşturma yeteneğinin belirlenmesi amacıyla kullanılan fenotipik ve genotipik yöntemler mevcuttur. Singh ve diğ. (2013), klinik izolatlarda biyofilm oluşturma özelliğini fenotipik ve genotipik yöntemlerle değerlendirmişlerdir. İzolatların %96'sının orta ya da güçlü biyofilm oluşturma yetenekleri olduğunu saptamışlardır. Biyofilm oluşturma yeteneği ile metisilin dirençli (MRSP) ya da metisilin duyarlı (MSSP) olması arasında ya da etkenin kaynağı, klonal tipi arasında bir ilişki saptanmamıştır. Ancak izolatların çoğunda var olan bu özelliğin, etkenin veteriner kliniklerinde neden hızla artış gösterdiğini açıklayan bir virulens faktörü olabileceğini belirtmişlerdir (Singh ve diğ., 2013).

Diribe ve diğ. (2015), operasyon sonrası enfeksiyon gelişen cerrahi bölgelerden izole ettikleri *S. pseudintermedius* izolatlarının tümünde biyofilm oluşturma özelliği olduğunu saptamışlar ve çoklu antibiyotik direnci belirlenen suşlar ile belirlenmeyenler arasında istatistiksel bir fark olmadığını bildirmişlerdir. Özellikle inatçı olarak seyreden cerrahi bölge enfeksiyonlarında, bakterinin biyofilm oluşturma yeteneğinin iyileşme aşamasındaki güçlükleri büyük ölçüde etkilediği belirtilmiştir. Aynı zamanda bu yetenekleri sayesinde *S. pseudintermedius*' un köpeklerde üst solunum yollarında ve diğer vücut bölgelerinde hayatta kalmalarını kolaylaştırıp kolonizasyonunu sağlayan önemli bir virulens faktörü olduğunu bildirmişlerdir (Singh ve diğ., 2013).

Tayland'da yapılan bir çalışmada yeni kurulan bir veteriner hastanesinden alınan yüzey örneklerinde *S. pseudintermedius* izolatları saptanmıştır. Çalışmanın ilgi çeken tarafı bu izolatların bir kısmının deterjan ve dezenfektanlar ile yapılan temizlik sonrası alınan sürüntü örneklerinden izole edilmiş olması olduğunu vurgulayan araştırmacılar, suşların geliştirdiği direnci ortaya koymuş ve bu direncin biyofilm oluşturma yeteneği ile ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir (Fungwithaya ve diğ., 2022).

Biyofilm oluşturma yeteneği *icaA* ve *icaD* genleri ile ilişkilidir (Arciola ve diğ., 2002). Singh ve diğ. (2013) yapmış oldukları çalışmada *icaA* gen varlığını %77,9 ve *icaD* genini ise %75,7 oranında saptamışlardır. Aynı çalışmada MRSP ve MSSP izolatları arasında biyofilm oluşumu açısından karşılaştırma yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir (Singh ve diğ., 2013). İtalya'da yapılan bir çalışmada izolatların %79,5'inde *icaA* ve *icaD* genleri, %18'inde ise sadece *icaD* geni saptanmış ve yalnızca iki suşta hiçbir gen belirlenmemesine rağmen fenotipik olarak biyofilm oluşturma özelliğinin var olduğu saptanmıştır (Meroni ve diğ., 2019). Aynı çalışmada çoklu antibiyotik direnci belirlenen

izolatların %66,6'ında iki gen bölgesinin de varlığı belirlenmiş olup, bu durum antibiyotik direnci ile biyofilm oluşturma yeteneğinin arasında bağlantı olduğunu ortaya koymuş ve MDR izolatların biyofilm oluşturmaya büyük oranda daha yatkın olduğunu vurgulamışlardır. Biyofilm oluşturma özelliğini belirlemede fenotipik yöntemlerden birisi olan Mikrotiter Plate Testi (MTP) kullanan Meroni ve diğ. (2019), bu yöntem ile *ica* gen değerlendirmelerinin uyumsuz olduğunu bildirmişlerdir. Wang ve diğ. (2022) klinik olarak sağlıklı ve keratitli köpeklerin konjonktivalarından izole edilen *S. pseudintermedius* suşlarını değerlendirdiklerinde, keratitli hayvanların tamamında *icaA* ve *icaD* geni saptarken bu oranın sağlıklı hayvanlarda %92,3 olduğunu bildirilmiştir.

*S. pseudintermedius*, *S. aureus* 'un virulens faktörleri ile benzer özelliklere sahiptir (Van Duijkeren ve diğ., 2011). Bu virulens faktörleri koagulaz, hemolizinler, kapsüler polisakkaritler, pyrogenik toksin süper antijenleri, Panton-Valentine Leukosidin analogu, LukI leukotoksini, SIET ve EXI gibi eksfoliatif toksinleri, SI-ENT ve SEC<sub>canine</sub> gibi bazı enterotoksinleri şeklinde sıralanabilir.

Özellikle pyoderma olgularından izole edilen *S. pseudintermedius* suşlarında saptandığından, eksfoliatif toksininin, köpeklerde pyoderma ile ilişkili olduğu düşünülmektedir ve püstüler dermatite sebep olduğu bildirilmiştir (Futagawa-Saito ve diğ. 2009; Iyori ve diğ., 2010; Ruzauskas ve diğ. 2016; Markey ve diğ., 2013; Balanchandran ve diğ., 2018). Ayrıca eksfoliatif toksinin oftalmik enfeksiyonların gelişiminde de rol oynayabileceği düşünülmektedir (Kang ve diğ. 2014).

*S. pseudintermedius* türleri kısaca "spa" olarak isimlendirilen, "immünoglobülin bağlayıcı protein" üretebilmektedir. Fibrinojen, fibronektin ve sitokeratinlere bağlanma özelliğine de sahiptir (Geoghegan ve diğ., 2009). Mikroorganizmanın peptidoglikandan oluşan komponent olan Protein A, IgG'nin Fc bölgesine bağlanarak fagositozu engeller ve enterotoksinler T lenfositlere süperantijen aktivitesi oluşturarak kusma, ishal ve şok durumuna sebep olur (Markey ve diğ., 2013; Tanabe ve diğ., 2013). Köpek korneositlerinde adezyon oluşumu aşamasında önemli bir faktör olan yüzey proteinleri, köpeklerde pyodermanın gelişmesinde belirleyici faktörlerden olarak bildirilmiştir (Geoghegan ve diğ., 2009).

*S. pseudintermedius* suşları *S. aureus* 'un Panton-Valentine Leukosidin (PVL) toksinine benzer, *lukS* ve *lukF* genleri tarafından kodlanan leukotoksin Luk-I toksini de üretirler. Bu toksinin birçok polimorfonükleer hücreleri kuvvetli yıkıcı etkisi vardır (Ross Fitzgerald., 2009; Yoon ve diğ., 2010; Duijkeren ve diğ., 2010; Singh ve diğ., 2013; Sasaki ve diğ., 2005; Gomez-Sanz ve diğ., 2011; Moodley ve diğ., 2009).

Pyodermalı ve sağlıklı köpeklerden yapılan çalışmada izole edilen farklı suşlara virulens faktörlerinin varlığı ile ilgili neredeyse hiç fark bulunamamıştır. Sağlıklı hayvanlardan da bu virülens faktörlerinin varlığının belirlenmesi, kommensal stafilokok popülasyonlarının patojenik potansiyelini ortaya koymuştur (Ferrer ve diğ, 2021).

### 2.5. *S. pseudintermedius* ve Antimikrobiyal Direnç

Çağımızın en önemli sorunu olan antimikrobiyal direnç, stafilokoklarda da her geçen gün daha çok artarak önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmektedir (CDC 2022). Son yıllarda sağlık bilimlerindeki en büyük problemlerden birisi antibiyotiklere dirençli bakterilerdir, yapılan araştırmalar üç ve daha fazla antibiyotik sınıfına dirençli olan bakterileri çoklu antibiyotik direnci (multi drug resistance) ve tüm antibiyotik sınıflarına dirençli olanları ise Pun Drug Resistance (PDR) şeklinde tanımlanmıştır (Magiorakos, 2011). Hayvanlarda deri ve mukoz membranların florasında bulunan stafilokoklar konaktaki diğer bakteriler ile de yakın ilişki içerisindedir; bu yakın ilişki sonucunda direnç genlerini de bulunduran genetik elementlerin stafilokoklarda tür içi, türler arası ve diğer Gram pozitif türler ile değiştirebilmelerine neden olmaktadır (Schwarz ve diğ., 2018).

Hayvanlarda metisilin direnci ilk kez 1972 yılında, mastitli bir Belçika süt ineğinden izole edilen *S. aureus* (MRSA) suşunda rapor edilmiştir (Devriese ve diğ, 1975). Hayvanlar ve hayvanlarla teması olan veteriner hekim, veteriner hekimliği ğrencisi, ifti ve hayvan bakıcılarında da metisilin dirençli stafilokok (MRS), MRSA ve MRSP varlığı bildirilmiştir (Hanselman ve diğ.; 2006, Chen, 2020; Rodrigues ve diğ, 2018, Shoen H. ve diğ, 2019). Metisilin dirençli *S. pseudintermedius* (MRSP) 2006 yılından itibaren veteriner hekimlikte rapor edilmeye başlanmıştır ve her geçen yıl daha da önem taşımaktadır. Bununla birlikte son çalışmalar veteriner hastaneleri ile özel kliniklerin MRSP'nin yayılmasında önemli rol oynadığını göstermektedir (Duijkeren ve diğ., 2011). MRSP izolatları veteriner kliniklerindeki epidemilerle ilişkili olabilmekte ve bu suşlar oral olarak kullanılabilecek antibiyotiklerin neredeyse tümüne dirençli olabilmektedirler; bu durumda etkenin klinik önemini vurgulamaktadır (Beck ve diğ., 2012; Ross Fitzgerald, 2009; Bannoehr ve Guardabassi, 2012). MRSP izolatları, düşük ilgili penisilin bağlayıcı protein (low-affinity penicillin-binding protein- PBP2a) üretimini kodlayan *mecA* geni varlığı ile ilişkilidir (Moodley ve diğ., 2009). *blaZ* geni beta laktamaz direnci ile ilişkilidir fakat metisilin direncine de aracılık ettiği kabul edilmektedir (Müştak ve diğ, 2020).

Stefanetti ve diğ. (2017), pyodermalı köpeklerden izole ettikleri 51 izolatın 45'inde çoklu antibiyotik direnci, 30'unda da *mecA* geni saptanmıştır. İtalya'da yapılan bir çalışmada *S. pseudintermedius* izolatlarının %48'inde *mecA* geni varlığı saptanmıştır (Meroni ve diğ, 2019). İtalya'da yapılan başka bir çalışmada ise subklinik mastitli bir inekte metisilin dirençli *S. pseudintermedius* izole edilmiştir (Pilla ve diğ, 2013). Konjonktivit, keratit veya üveitli kedi ve köpeklerin gözlerinden alınan sürüntü örneklerinden yapılan çalışmada %39,6 oranında *S. pseudintermedius* izole edilmiş, bu izolatların %7,9'u MRSP olarak belirlenmiştir (Soimala ve diğ, 2020). Tayland'da yapılan bir çalışmada *S. pseudintermedius* izolatlarının öncelikle CLSI'e göre Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile oksasiline duyarlılıkları belirlenmiş ve %28,3'u oksasilin dirençli olarak değerlendirilmiştir. Aynı çalışmada disk difüzyon yöntemi ile MRSP olarak belirlenen izolatlarda *mecA* geni varlığı %93,33 olarak saptanmış ve bununla birlikte metisilin duyarlı olan 7 izolatta da *mecA* geni belirlenmiştir (Jantorn ve diğ, 2021). Proietti ve diğ. (2011), pyodermalı köpeklerden yaptığı çalışmada, MRSP izolatlarının tamamının gentamisine de dirençli olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada *blaZ* pozitif izolatlar hem penisilin hem de gentamisin dirençli olarak değerlendirilmiştir. Müştak ve diğ. (2020) yapmış olduğu çalışmada tek bir izolat haricinde, tüm penisilin dirençli suşları MDR olarak belirlenmiştir.

Veteriner hekimlikte pyoderma tedavisinde sefalosporinler sıklıkla tercih edilen antibiyotik grubudur. Westermeyer ve diğ. (2010), 5 MSSP izolatının, sefalosporin grubuna dahil 10 farklı antibiyotiğe karşı duyarlılıklarını incelemişler; izolatların hepsinin sefaleksim, sefazolin, sefaklor, sefoksitin, seftiofur, sefhalotin, sefovesin ve sefodroksile duyarlı; 2 izolat hariç diğer izolatların sefpodoksime duyarlı olduklarını; sefiksim ise 55 izolatın orta duyarlı ve 7 izolatın da dirençli olduğunu saptamışlardır (Westermeyer ve diğ., 2010).

Kore'de yayımlanan iki çalışmada, 74 *S. pseudintermedius* izolatının antibiyotik direnç profilleri incelenmiştir. Yoo ve diğ, (2010), 74 izolatın sadece insan ya da hayvanlarda kullanımı olan beş farklı flurokinolona duyarlılıklarını incelemiştir. İzolatların %18,9'unun incelenen tüm antibiyotiklere dirençli olduklarını saptamışlardır. *mecA* pozitif olan 25 izolatın 13'ünün, *mecA* negatif olan 49 izolatın 7'sinin de bir ya da daha fazla antibiyotiğe dirençli olduklarını vurgulamışlardır. Diğer araştırmada, Yoon ve diğ, (2010), 74 izolatın 9 farklı antibiyotik grubuna duyarlılıklarını incelemiştir. En sık saptanan dirençlerin %95,9 ile penisilin ve %91,9 ile tetrasiklin direnci olduğu, 13 *mecA* pozitif izolatın saptandığı ve bu MRSP 'lerin tümünde de çoklu antibiyotik direnci olduğunu bildirmişlerdir.

Kanada’da yapılan bir çalışmada, 175 sağlıklı köpeğin nazal, farengial ve rektal svab örneklerinin 153 (%87,4)’ünden *S. pseudintermedius* izole edilmiştir. İzolatlarda metisilin direnci saptanmamış, %46’sı incelenen tüm antibiyotik gruplarına duyarlı, geri kalan izolatlarda ise en sıklıkla penisilin ve tetrasiklin direnci saptanmıştır (Rubin ve diğ, 2011). Sefalosporin ve fluoroquinolonlara karşı gelişen direncin pyoderma tedavilerinde kullanılan protokoller ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Onuma ve diğ, 2012).

Stafilokoklarda tetrasiklin direnci dört gen tarafından kodlanmaktadır. *tet(K)* ve *tet(L)* genleri temel olarak plasmidde, *tet(M)* ve *tet(O)* genleri kromozom üzerinde bulunur, *tet(L)* aynı zamanda kromozomda da bulunabilir. Kore’de pyodermalı köpeklerden izole edilen *S. intermedius* izolatlarının %97’sinde *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)* genlerinden en az biri saptanmıştır (Kim ve diğ., 2005). Maaland ve diğ. (2013) tetrasikline dirençli 70 izolatın 66 tanesinde yalnızca *tet(M)*, 2 izolatta yalnızca *tet(K)*, bir izolatta *tet(O)* ve bir izolatta ise hem *tet(K)* hem *tet(M)* genlerini saptamışlardır. *tet(M)* geninin yaygın olduğunu belirtmişler ve bununla birlikte *tet(O)* geninin ise Gram pozitif türler içerisinde stafilokoklarda daha nadir olduğu, daha sık olarak streptokok ve enterokoklarda bulunduğu belirtilmiştir. Çeşitli hayvan türlerinden yapılan çalışmada izole edilen *S. pseudintermedius* suşlarında tetrasiklin direnci en yaygın (%34) olmak üzere ve bunu eritromisin (%13), klindamisin (%8), penisilin (%7) ve trimetoprim/sülfametoksazol (%5) olarak seyretmiştir (Rubin ve diğ, 2011).

Felşler ve diğ., (2022), köpeklerden izole edilen 41 *S. pseudintermedius* izolatının %24,4’ünü tetrasiklin dirençli olarak değerlendirmiş ve dokuzunda *tet(M)*, bir tanesinde ise *tet(K)* geni belirlemiştir. Aynı çalışmada 41 izolatın %19,5’i makrolid dirençli olarak saptanmıştır. Makrolid direnci ile ilişkili gen bölgeleri *ermA*, *ermB*, *ermC* gen bölgeleridir. Çalışmada makrolid direnci belirlenen izolatlarının beşinde *ermB*, üçünde hem *ermB* hem *ermC* geni saptanmıştır. Gentamisin direnci ile ilişkili *aacA*- *aphD* gen bölgeleri ise iki orta dirençli ve iki dirençli izolatta saptanmıştır. Bununla birlikte beş *S. pseudintermedius* izolatı tüm antibiyotik gruplarına duyarlı olarak belirlenirken, 21 izolat sadece bir antibiyotik sınıfına dirençli olarak değerlendirilmiştir.

Tayland’da yeni kurulan bir veteriner hastanesinde kullanılan masa ve ekipmanlardan izole edilen izolatların %73,3 MRSP ve %26,7 MSSP olarak belirlenmiştir (Fungwithaya ve diğ, 2022). MRSP izolatları, en çok zemin yüzeyi, masalar ve bekleme alanındaki sandalyelerden izole edilmiştir. Aynı çalışmada tüm MRSP suşları *mecA* ve *blaZ* pozitif olarak saptanmıştır. İzolatların %93,3’ü ise çoklu antibiyotik direnci karakterinde değerlendirilmiştir. Antimikrobiyal direnç profili değerlendirildiğinde ise çoktan aza sırasıyla benzilpenisilin,

sefovesin, seftiofur, kanamisin, neomisin, eritromisin, tetrasiklin ve gentamisine direnç belirlenmiştir.

Nijerya’da bir barınakta yapılan çalışmada hem bakıcılardan hem de köpeklerden nazal svab örnekleri incelenmiş, 143 köpek *S. pseudintermedius* izolatının %28,7’i, 138 insan izolatının da %4,3’ü MRSP olarak tanımlanmıştır (Moses ve diğ., 2022). Köpek MRSP izolatlarının en sıklıkla amoksisilin-klavulanik asit, seftazidim ve seferdime; insan izolatlarının da amoksisilin-klavunalik asit, seftazidime ve sefepime dirençli olduklarını saptamışlardır. Her iki grup izolatta da en düşük direnç oranının kloramfenikol direncinde olduğunu da belirtmişlerdir.

Nakamimami ve diğ. (2021) pyodermalı köpeklerin deri lezyonlarından ve burunlarından aldıkları sürüntü örnekleri ile yaptıkları çalışmada; burundan alınan örneklerin %31,6’sı ve pyoderma lezyonlarından alınan örneklerin ise %34,1’i MRSP olarak değerlendirilmiştir. Araştırmacılar ayrıca gerek nazal örnekler gerekse lezyonlardan orjin alan izolatlardaki antibiyotik direnç profillerinin benzerlik gösterdiğini bu nedenle de eşlikçi hayvanlarda kommensal stafilokokların antimikrobiyal direncine büyük önem verilmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Milano ve Napoli’deki iki üniversitenin veteriner hastanesinde yapılan çalışmadaki Milano’da bulunan hastanedeki izolatların %30’u ve Napoli’dekilerin %18’i MRSP olarak belirlenmiştir. MRSP izolatlarındaki amoksisilin klavulanik asit direncinin dikkat çekici boyutta olduğu vurgulanmıştır. Milano’daki izolatların tümünde Napoli’de ise %91’nde çoklu antibiyotik direnci saptanmıştır (Nocero ve diğ., 2020).

Hollanda’da yapılan bir çalışmada superfisyel pyoderma tanısı konulan 237 köpeğin papül ve püstül gibi lezyonlarından alınan örneklerden 218 MSSP ve 19 MRSP izole edilmiştir. MSSP izolatlarında en çok amoksisiline; MRSP izolatlarında ise klindamisin ve doksisisikline yüksek oranda (>%80) direnç belirlenmiştir. Hollanda’da köpeklerde superfisyel pyoderma tedavisinde ilk sırada ampirik tedavi amacıyla klindamisin kullanıldığı belirtilmiştir (M.M. van Damme ve diğ., 2020).

Klinik olarak sağlıklı olan ve keratit olgusu olan köpeklerin konjonktivalarından alınan örnekler ile yapılan karşılaştırmalı çalışmada, sağlıklı hayvanların % 20,9’u keratitli hayvanların ise %23,08’inden *S. pseudintermedius* izole edilmiştir (Wang ve diğ., 2022). Araştırmacılar her iki grupta da benzer şekilde en yüksek direncin tetrasiklin ve eritromisin direnci olduğunu belirtmişlerdir. (Wang ve diğ., 2022).

Brezilya’da otit eksterna teşhisi konulan 52 köpeğin 31’inde *S. pseudintermedius* izolasyonu yapılmış, antimikrobiyel duyarlılık değerlendirmesi sonucunda en yüksek oranda %77,3 ile penisilin, %61,4 ile tetrasiklin ve %63,6 ile trimetoprim sulfametoksazole direnç saptanmıştır. Bununla birlikte 26 izolatta çoklu antibiyotik direncine sahip olduğu görülmüştür (Scherer ve diğ., 2018).

Müştak ve diğ. (2014) ülkemizde yapmış oldukları çalışmada pyodermalı bir köpekten izole edilen *S. pseudintermedius*’un MIC değerlendirmesi sonucunda yüksek oranda mupirosin direnci saptamışlardır ve bu direnci kodlayan *ileS-2* gen varlığını belirlemişlerdir. Ülkemizde deri problemleri olan barınak köpeklerinden yapılan çalışmada izole edilen stafilokokların %80,4’ü *S. pseudintermedius* olarak tanımlanmış ve bu izolatların %33,3’ü metisilin dirençli olarak değerlendirilirken aynı zamanda MRSP izolatların tamamında *mecA* geni saptanmıştır (Sareyyüpoğlu ve diğ., 2014). Ülkemizde yapılan başka bir çalışmada ise deri problemleri köpeklerden izole edilen MRSP izolatların tamamının amikasinine duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Müştak ve diğ., 2020). Bununla birlikte gentamisin (%11,4) ve kloramfenikole (%18) de düşük oranda direnç belirlenmiştir. %40,9 penisilin direnci saptanmış ve direncin mevcut olduğu izolatlardan bir tanesi haricinde tamamı MDR olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada aynı zamanda izolatlarda 18 *mecA* ve 25 *blaZ* geni varlığı bildirilmiştir.

## 2.6. *S. pseudintermedius* Enfeksiyonlarında Tanı

*S. pseudintermedius* tanısı amacıyla enfeksiyonlu bölgelerden alınan klinik materyaller laboratuvara gönderilmektedir. Pyoderma teşhisi konulmuş köpeklerde lezyonlu deriden alınan sürüntüler izolasyon için yeterli olmaktadır. Stafilokoklar genel olarak kurumaya ve sıcaklık değişimlerine karşı diğer bakteriler ile karşılaştırıldığında daha dirençli oldukları için, numune alımı ve gönderimi aşamasında canlılıklarını korumaları amacıyla özel bir yöntem önerilmemiştir (Markey ve diğ., 2013). *S. pseudintermedius*’un pyodermalı hayvanların püstül ve epidermal yara bölgelerinden izole edildiği bir çalışmada sağlıklı hayvanların da perioral bölge ve karın derilerinden alınan sürüntü örneklerinden de izole edilmiştir (Ferrer ve diğ., 2021). Rutin olarak kullanılmakta olan besiyerli svabların direkt olarak numune alımı ve gönderiminde kullanımı uygun görülmektedir. Silva ve diğ. (2012), pyodermalı köpeklerden yapmış olduğu çalışmada *S. pseudintermedius* izolasyonu amacıyla deri lezyonlarının bulunduğu bölgelerden numune almak amacıyla steril fizyolojik tuzlu su ile ıslatılmış svab kullanmıştır, bu durum genellikle irin mevcut olmayan kuru lezyonlarda tercih edilmektedir.

*S. pseudintermedius* kolonileri pigmentsiz, kabarık, orta boyda, koyun ya da sığır kanı ilave edilmiş besiyerlerinde 37°C'de 24 saat inkübasyon sonucunda, tamamlanmamış  $\beta$ -hemoliz ve tam  $\alpha$ -hemoliz oluşturan koloniler şeklinde üremektedir. *S. aureus* kolonilerinde de olduğu gibi çift hemoliz özelliğini sergilemektedir. Mannitol Salt Agar'da sarı renkte koloniler oluşturmaktadır, bu durum *S. aureus* ile benzerdir. %1 maltoz içeren Purple Agar'da zayıf ve yavaş maltoz fermentasyonu oluşturmaktadır, kolonilerin alt kısmında hafif sarımsı bir zon oluşur ve izole edilen koloniler de sarımsı renkte olabilmektedir (Markey ve diğ., 2013). Purple Agar'daki koloni morfolojisine göre *S. aureus* ve *S. hyicus* ile ayrımı yapılabilmektedir. Katalaz, DNase, üreaz, alkalın fosfataz ve koagülaz pozitif karakterdedir. İdentifikasyonda önemli bir sorun, *S. pseudintermedius* hızlı tanı amacıyla yapılan lateks aglütinasyon testlerinde, clumping faktörü saptamaya yönelik yapılan lam aglütinasyon testlerinde koagülaz negatif özellik göstermesidir. Bu nedenle birçok rutin laboratuvarında, koagülaz negatif stafilokok olarak tanımlanabilmektedir. Diğer stafilokoklardan ayırımında tüpte yapılan koagülaz testi, asetoin üretimi, pyrrolidonyl arylamidaz testi,  $\beta$ -galaktosidaz testi, polimiksin B direnci ve D-mannitol fermentasyon testi yardımcı olmaktadır (Bannoehr ve Guardabassi, 2012). Koagülaz pozitif stafilokoklar ile asetoin üretiminin ve ksiloz fermentasyonunun olmaması bununla birlikte trehaloz fermentasyonun pozitif olması ile SIG grubu üyelerinden ayrılabilir ancak bu fenotipik ayırım yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle kesin tanı amacıyla moleküler düzeyde testler üzerine yoğunlaşmıştır. PCR ve RFLP, MALDI-TOF MS ve Multiplex-PCR identifikasyonda kullanılan yöntemlerdir (Sasaki ve diğ., 2010, Bannoehr ve diğ., 2009, Decristophoris ve diğ., 2011).

Günümüzde yaygın olarak kullanılmaya başlanan otomatize sistem bakteriyel identifikasyon cihazlarından birisi olan Biomeriux Vitek 2 cihazında da *S. pseudintermedius* tanımlanabilmektedir, fakat doğrulamak amacıyla sonrasında genellikle PCR yapılmaktadır (Fungwithaya ve diğ., 2022).

Rusenova ve diğ. (2020) yapmış oldukları çalışmada SIG üyelerini belirlemede biyokimyasal testlerin kullanımının önemini vurgulamış fakat üyeler arasındaki ayrımlar için moleküler analizler ile birlikte yapılmasını ya da yalnızca moleküler analiz yapılmasını önermişlerdir.

## **2.7. *S. pseudintermedius* Enfeksiyonlarında Tedavi ve Korunma**

Pyoderma tedavilerinde var olan ve sonradan gelişecek olan antimikrobiyal direnci azaltmak amacıyla sistemik antibiyotik tedavi öncelikli olarak tercih edilmemekle birlikte,

yalnızca derin pyoderma olgularında sistemik antibiyotik tedavisi önerilmektedir. Süperfisyel pyodermalarda ise daha çok lokal olarak klorheksidin ve yıkama uygulamaları tercih edilmektedir (Deboer, 2016). Sodyum hipoklorid ve salisilik asit şampuanları da tedavide kullanılmaktadır (Fadok ve diğ., 2019). Aşı ile ilgili *S. aureus*'ta kullanılan *spA* ve faj terapisi çalışmalarının *S. pseudintermedius* için de geliştirilmesi önerilmektedir (Lynch, 2021). Amerika'da süperfisyel pyodermalı köpeklerde yapılan pilot aşı çalışmasında, sonuçlar olumlu olup geliştirilebilir olduğu değerlendirilmesi yapılmıştır (Abouelkhair, 2019). Bakteriyofaj *pSp-J* ve *pSp-S*, MRSP potansiyel tedavi yöntemi olarak önerilmiştir (Kim ve diğ., 2021). Bu durumu düşük dozlarda kullanımında biyofilm oluşumunu engelleyebilme yeteneği ile başardığını bildirmişlerdir. Nanosülfür kullanımı alternatif antimikrobiyal olarak sağlık bilimlerinde yer almaktadır ve biyofilm oluşumunu engelleme özelliği ile MDR-SP izolatlarına da etkili olduğu bildirilmiştir (Kher ve diğ., 2022).

### 3. YÖNTEM

#### 3.1. GEREÇ

##### 3.1.1. Örnekler

Çalışmada Haziran 2018 ve Haziran 2020 tarihleri arasında, değişen cinsiyet ve yaşta olan, evde ya da sokakta serbest olarak yaşayan; deride eritem, alopesi, kaşıntı, papül ve püstül şikayeti ile İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'na getirilip; klinik incelemeler sonucu pyoderma tanısı konulan 205 köpeğin baş, gövde ve ekstremitte bölgelerinde bulunan deri lezyonlarından sürüntü örnekleri alındı.

Lezyonlar akıntılı ise direkt sıvab ile, kuru formda ise Tryptic Soy Broth (TSB) ile ıslatılmış svablar aracılığı ile alınan sürüntü örnekleri Stuart Medium taşıyıcı besiyeri ile İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına soğuk zincirde ulaştırıldı. Hemen işleme alınmayan örnekler +4 °C'de saklandı.

İncelenen köpeklerin 46'sının ev ortamında, 146'sının ev dışında yaşadığı kayıt edilirken 13 köpeğin ise yetiştirme ve yaşama yeri hakkında bilgi kayıt edilemedi. Köpeklerin 93'ü dişi, 112'si erkek, 36'sı 6 yaş üzeri, 158'i 6 yaş ve altında olmakla beraber 11 köpeğin yaş bilgisi bilinmemektedir. Pyoderma türlerine göre köpeklerin 29'u yüzeysel, 130'u süperfisyel, 33'ü derin pyoderma karakterinde olmakla birlikte 13 köpeğin pyoderma bilgisi kayıt edilmedi. Sürüntü örneklerinin alındığı köpeklerde en az 72 saat öncesine kadar herhangi bir antibiyotik kullanımı bulunmamakta, ancak köpeklerin 140'ında son bir yıl içerisinde antibiyotik kullanımı hikayesi vardı.

##### 3.1.2. Besiyerleri

###### 3.1.2.1. Mannitol Salt Agar (HIMEDIA M118-500G)

İçerik: Proteose Peptone 10 g/l, HM peptone 1 g/l, Sodium Chloride 75 g/l, D(-) Mannitol 10 g/l, Phenol Red 0.025 g/l, Agar 15 g/l. (pH 7.4±0.2, 25°C).

Hazırlanışı: Toz besiyerinden 111.02 gr tartıldı ve 1 litre distile su içerisinde eritildi. 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Steril petri kutularına 25'er ml dağıtıldı. Besiyerleri oda ısısında donduktan sonra kullanıma kadar +4 °C'de muhafaza edildi.

### 3.1.2.2. *Tryptic Soy Broth (MERCCK 1.05459.0500)*

İçerik: Peptone from casein 17,0 g/L, Peptone from soymeal 3,0 g/L; D(+) Glucose 2,5 g/L; NaCl 5,0 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5 g/L. (pH 7.3±0.2, 25°C).

Hazırlanışı: Toz besiyerinden 3 gr tartıldı ve 100 ml distile su içerisinde eritildi. 4'er ml steril cam tüplere dağıtılarak, 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Kullanım aşamasına kadar +4°C'de muhafaza edildi.

### 3.1.2.3. *Tryptic Soy Agar (OXOID CM0131)*

İçerik: Tryptone 15,0 g/l, soya peptone 5,0 g/l, sodium chloride 5.0 g/l, agar 15.0 g/l. (pH 7.3 ± 0.2, 25°C).

Hazırlanışı: Toz besiyerinden 40 gr tartıldı ve 1 litre distile su içerisinde eritildi. 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Ardından steril petri kutularına 25'er ml dağıtıldı. Besiyerleri oda ısısında donduktan sonra kullanım aşamasına dek +4°C'de muhafaza edildi.

### 3.1.2.4. *Mueller- Hinton Agar (OXOID CM0337)*

İçerik: Beef (dehydrated infusion from) 300.0 gm/l, Casein hydrolysate 17.5 gm/l, Starch 1.5 gm/l, Agar 17.0 gm/l. (pH 7.3 ± 0.1, 25°C).

Hazırlanışı: Toz besiyerinden 38 gr tartıldı ve 1 litre distile su içerisinde eritildi. 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Steril petri kutularına 25'er ml dağıtıldı. Besiyerleri oda ısısında donduktan sonra kullanıma kadar +4 °C'de muhafaza edildi.

### 3.1.2.5. *Congo Red Agar*

- Congo Red Indicator (ISO Lab C.I. 22210)
- Sakkaroz (Lachema)
- Brain Heart Infusion Agar (HIMEDIA M211)

#### Congo Red Agar Hazırlanışı:

1 litre distile suya 0.8 gr Congo Red, 36 gr Sakkaroz ve 52 gr Brain Heart Infusion Agar eklendi. 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Steril edilen besiyerinden 25'er ml steril petri kutularına döküldü. Oda ısısında donduktan sonra besiyerleri kullanım aşamasına dek +4°C'de muhafaza edildi.

### 3.1.3. *Ayraçlar ve Kimyasallar*

#### 3.1.3.1. *Oksidaz İdentifikasyon Stikleri (Oxoid, BR 64A)*

Oksidaz testi için kullanıldı.

#### 3.1.3.2. *%3 Hidrojen Peroksit Solüsyonu*

Katalaz testinde kullanıldı.

### 3.1.3.3. *Glasiyal Asetik Asit (ISOLAB 901.013 %100 lük)*

Biyofilm oluşturma özelliğinin fenotipik olarak araştırılması amacıyla yapılan mikrotiter plate testinde kullanıldı.

### 3.1.3.4. *Hucker Crystal Violet (%2'lik)*

Biyofilm oluşturma özelliğinin fenotipik olarak araştırılması amacıyla yapılan mikrotiter plate testinde kullanıldı.

### 3.1.3.5. *Gram Boyama Seti (Chembio Gramstain Set -110419)*

İzole edilen bakterilerin Gram boyanma özelliğinin belirlenmesinde kullanıldı.

### 3.1.3.6. *Gliserol (%99,5 Tekkim TK.070190.01000)*

%50 Gliserol; Stok gliserolden 50 ml alındı ve 50 ml dH<sub>2</sub>O ilave edildi, ardından 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Kullanıma kadar +4°C'de muhafaza edildi ve izole edilen bakterilerin -20°C'de saklanması aşamasında kullanıldı.

### 3.1.3.7. *Phosphate Buffered Saline*

8 gr NaCl, 0,2 gr KCl, 1,15 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O ve 0,2 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> distile su ile 1 l'e tamamlanarak hazırlandı. (pH 7.2). Biyofilm oluşturma özelliğinin belirlenmesinde kullanılan mikrotiter plate testinde yıkama aşamasında kullanıldı.

## 3.1.4. Antibiyotik Diskleri

Antibiyotik duyarlılık testlerinde penisilin (10 U), oksasilin (1 µg), klindamisin (2 µg), kloramfenikol (30 µg), doksisilin (30 µg), eritromisin (15 µg), tetrasiklin (30 µg), gentamisin (10 µg), enrofloksasin (5 µg), difloksasin (10 µg), marbofloksasin (5 µg), orbifloksasin (10 µg), sulfisoksazol (300 µg) antibiyotik diskleri kullanıldı.

## 3.1.5. Moleküler Çalışmalar

### 3.1.5.1. *DNA Ekstraksiyonu*

Bu çalışmada iki farklı ekstraksiyon yöntemi kullanıldı. Tüm şüpheli izolatların *S. pseudintermedius* identifikasyonu amacıyla PCR için chelex ile DNA ekstraksiyonu yapıldı. Çalışmanın 2. aşamasında ise *S. pseudintermedius* olarak saptanan izolatların antibiyotik direnç ve biyofilm oluşturma özelliklerinin genotipik olarak belirlenmesinde ekstraksiyon kiti kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapıldı.

#### a) **Chelex ile DNA Ekstraksiyonu**

DNA ekstraksiyonu için %5'lik Chelex (Bio- Rad Cat No: 142- 1253) solüsyonu kullanıldı. Bu amaçla 100 ml distile suya 5 gr Chelex eklenerek buffer hazırlandı.

#### b) **DNA Ekstraksiyon Kiti ile DNA Ekstraksiyonu**

Çalışmada Invitrogen Purelink genomic DNA mini kit (LOT: 2070303) kullanıldı.

Kitin içinde mevcut olan materyaller:

Purelink genomic lysis/ binding buffer, purelink genomic digestion buffer, Proteinaz K, RNase A, Yıkama solüsyonu I, Yıkama solüsyonu II, Elusyon Buffer, spin kolon, boş tüp.

Kit içinde mevcut olmayıp kullanım için edinilmesi gereken materyaller:

- % 96-100 Etanol
- DNA izolasyonu için örnek (Gram pozitif bakteriler için  $\leq 2 \times 10^9$ )
- Lysozyme ve Lysozyme Digestion Buffer (25mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 mM EDTA, %1 Triton X-100)
- Isıtıcı blok
- Steril, DNase- free mikrosantrifüj tüpleri

**3.1.5.2. DNA Amplifikasyonu**

DNA amplifikasyonu için Master mix ThermoScientific PCR Master Mix 2X (LOT 00691488, 0.05 U/  $\mu$ l Taq DNA polymerase, reaction buffer, 4mM MgCl<sub>2</sub> ve 0.4 mM dNTP) kullanıldı.

***PCR ile Staphylococcus pseudintermedius İdentifikasyonu***

*Staphylococcus pseudintermedius* identifikasyonu amacıyla spesifik olarak pse-F2 ve pse-R5 primerleri kullanıldı (Sasaki ve diğ. 2010). Pse- F2; 5'-TRGGCAGTAGGATTCGTTAA-3' (Cat no: C0882B01) ve Pse- R5: 5'-CTTTTGTGCTYCMTTTTGG-3' (Cat no: C0882B02) dizilimleri kullanıldı. 100  $\mu$ M konsantrasyonda stok hazırlamak amacıyla üretici firmanın belirttiği şekilde pse-F2 için 389  $\mu$ l, pse-R5 için 593  $\mu$ l TE Buffer (A.B.T. 1 X TE Buffer, Cat: B05-01-01) kullanıldı. Stok primerler kullanım aşamasına kadar -20°C'de saklandı. Kullanılmadan önce son konsantrasyon 10 pmol/ $\mu$ l olacak şekilde nuclease free water ile sulandırıldı (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Etkin Lab).

***PCR ile Antibiyotik Direnci ile İlişkili Gen Bölgelerinin Saptanması***

İzolatların metisilin direnci ile ilişkili olarak *mecA* (Kondo ve diğ. ,2007), beta laktamaz direnci ile ilişkili olarak *blaZ* (Martineau ve diğ. , 2000), makrolid direnci ile ilişkili gen bölgeleri *ermA*, *ermB*, *ermC* (Lina ve diğ. , 1999), kloramfenikol direnci ile ilişkili olarak *cat* bölgeleri, tetrasiklin direnci ile ilişkili olarak *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)* (Kim ve diğ. , 2005), gentamisin direnci ile ilişkili *aac(6')*- *aph (2'')* gen bölgeleri (Martineau ve diğ., 2000) ve stafilokoklarda antibiyotik direncinin gelişimiyle ilişkili olduğu bildirilen hareketli genetik element IS256 gen bölgesinin (Proietti ve diğ. , 2012) belirlenmesi amacıyla PCR yapıldı (Tablo 3.1).

*mecA* gen bölgesinin amplifikasyonu için *mA1* 5'-TGCTATCCACCCTCAAACAGG-3' (Cat No: C0882D07) ve *mA2* 5'-AACGTTGTAACCACCCCAAGA-3'(Cat No: C0882D08) primer dizilimleri kullanıldı (Kondo ve diğ. , 2007). 100 µM konsantrasyonda stok hazırlamak amacıyla üretici firmanın belirttiği şekilde *mA1* için 541 µl, *mA2* için ise 459 µl TE Buffer kullanıldı (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Stok primerler kullanım aşamasına kadar -20°C'de saklandı. Kullanılmadan önce son konsantrasyon 10 pmol/µl olacak şekilde nuclease free water ile sulandırıldı.

*blaZ* gen bölgesinin amplifikasyonu için *blaZ1* 5'-ACTTCAACACCTGCTGCTTTC-3' (Cat No: C00882C11) ve *blaZ2* 5'-TGACCACTTTTATCAGCAACC-3' (Cat No: C0882C12) primer dizilimleri kullanıldı (Martineau ve diğ. , 2000). 100 µM konsantrasyonda stok hazırlamak amacıyla üretici firmanın belirttiği şekilde *blaZ1* için 559 µl, *blaZ2* için ise 430 µl TE Buffer kullanıldı. Stok primerler kullanım aşamasına kadar -20°C'de saklandı. Kullanılmadan önce son konsantrasyon 10 pmol/µl olacak şekilde nuclease free water ile sulandırıldı.

*ermA* gen bölgesinin amplifikasyonu için *ermA-F* 5'-GTTCAAGAACAATCAATACAGAG-3' (Cat No: C0882B03) ve *ermA-R* 5'-GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC-3' (Cat No: C0882B04) primer dizilimleri kullanılarak yapıldı (Lina ve diğ. , 1999). 100 µM konsantrasyonda stok hazırlamak amacıyla üretici firmanın belirttiği şekilde *ermA-F* için 478 µl, *ermA-R* için ise 397 µl TE Buffer kullanıldı. Stok primerler kullanım aşamasına kadar -20°C'de saklandı. Kullanılmadan önce son konsantrasyon 10 pmol/µl olacak şekilde nuclease free water ile sulandırıldı.

*ermB* gen bölgesinin amplifikasyonu için *ermB-F* 5'-CCGTTTACGAAATTGGAACA GGT AAAGGGC-3' (Cat No: C0882B05) ve *ermB-R* 5'-GAATCGAGACTTCAGTGTGC-3' (Cat No: C0882B06) primer dizilimleri kullanıldı (Lina ve diğ. , 1999). 100 µM konsantrasyonda stok hazırlamak amacıyla üretici firmanın belirttiği şekilde *ermB-F* için 378 µl, *ermB-R* için ise 417 µl TE Buffer kullanıldı. Stok primerler kullanım aşamasına kadar -20°C'de saklandı. Kullanılmadan önce son konsantrasyon 10 pmol/µl olacak şekilde nuclease free water ile sulandırıldı.

*ermC* gen bölgesinin amplifikasyonu için *ermC-F* 5'-GCTAATATTGTTT AAATCGTCAATATTCC-3' (Cat No: C0882B07) ve *ermC-R* 5'-GGATCAGGAA AAGGACATTTTAC-3' (Cat No: C0882B08) primer dizilimleri kullanıldı (Lina ve diğ. , 1999). 100 µM konsantrasyonda stok hazırlamak amacıyla üretici firmanın belirttiği şekilde *ermC-F* için 431 µl, *ermC-R* için ise 451 µl TE Buffer kullanıldı. Stok primerler kullanım

aşamasına kadar -20°C’de saklandı. Kullanılmadan önce son konsantrasyon 10 pmol/µl olacak şekilde nuclease free water ile sulandırıldı.

*cat* gen bölgelerinin amplifikasyonu için *cat*(set 1) ve *cat*(set 2); *cat*(set 1)-F 5’-GCGAACGAAAAACAATTGCA-3’ (Cat No: C0882B09) ve *cat*(set 1)- R 5’-TGAAGCTGTAAGGCAACTGG-3’ (Cat No: C0882B10), *cat*(set 2)- F 5’-GAATGAATTTCAAGATATAA-3’ (Cat No: C0882B11) ve *cat*(set 2)- R 5’-AGACTTATTTACTACGTTTC-3’ (Cat No: C0882B12) primer dizilimleri kullanıldı (Kim ve diğ. , 2005). 100 µM konsantrasyonda stok hazırlamak amacıyla üretici firmanın belirttiği şekilde *cat*(set 1)- F için 383 µl, *cat*(set 1)- R için 535 µl ve *cat*(set 2)- F için 409 µl, *cat*(set 2)- R için 474 µl TE Buffer kullanıldı. Stok primerler kullanım aşamasına kadar -20°C’de saklandı. Kullanılmadan önce son konsantrasyon 10 pmol/µl olacak şekilde nuclease free water ile sulandırıldı.

*tet*(K) gen bölgesinin amplifikasyonu için *tet*(K)- F 5’-TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC-3’ (Oligo No: 210831-1-41) ve *tet*(K)- R 5’-GCAAACCTCATTCCAGAAGCA-3’ (Oligo No: 210831-1-42) primer dizilimleri kullanıldı (Kim ve diğ. , 2005). 100 µM konsantrasyonda stok hazırlamak amacıyla üretici firmanın belirttiği şekilde *tet*(K)- F için 345.5 µl, *tet*(K)- R için ise 331.5 µl TE Buffer kullanıldı (Sentebiolab). Stok primerler kullanım aşamasına kadar -20°C’de saklandı. Kullanılmadan önce son konsantrasyon 10 pmol/µl olacak şekilde nuclease free water ile sulandırıldı.

*tet*(L) gen bölgesinin amplifikasyonu için *tet*(L)- F 5’-GTTGCGCGCTATATTCCTAAA-3’ (Cat No: C0882C03) ve *tet*(L)- R 5’-TTAAGCAAACCTCATTCCAGC- 3’ (Cat No: C0882C04) primer dizilimleri kullanıldı (Kim ve diğ. , 2005). 100 µM konsantrasyonda stok hazırlamak amacıyla üretici firmanın belirttiği şekilde *tet*(L)- F için 494 µl, *tet*(L)- R için ise 442 µl TE Buffer kullanıldı. Stok primerler kullanım aşamasına kadar -20°C’de saklandı. Kullanılmadan önce son konsantrasyon 10 pmol/µl olacak şekilde nuclease free water ile sulandırıldı.

*tet*(M) gen bölgesinin amplifikasyonu için *tet*(M)- F 5’-GTTAAATAGTGTCTTGGAG-3’ (Cat No:C0882C05) ve *tet*(M)- R 5’-CTAAGATATGGCTCTAACAA-3’ (Cat No: C0882C06) primer dizilimleri kullanıldı (Kim ve diğ. , 2005). 100 µM konsantrasyonda stok hazırlamak amacıyla üretici firmanın belirttiği şekilde *tet*(M)- F için 558 µl, *tet*(M)- R için ise 411 µl TE Buffer kullanıldı. Stok primerler kullanım aşamasına kadar -20°C’de saklandı. Kullanılmadan önce son konsantrasyon 10 pmol/µl olacak şekilde nuclease free water ile sulandırıldı.

*tet(O)* gen bölgesinin amplifikasyonu için *tet(O)- F* 5'-GATGGCATAACAGGCACAGAC-3' (Cat No: C0882C07) ve *tet(O)- R* 5'-CAATATCACAGAGCAGGCT-3' (Cat No: C0882C08) primer dizilimleri kullanıldı (Kim ve diğ. , 2005). 100 µM konsantrasyonda stok hazırlamak amacıyla üretici firmanın belirttiği şekilde *tet(O)- F* için 402 µl, *tet(O)- R* için ise 419 µl TE Buffer kullanıldı. Stok primerler kullanım aşamasına kadar -20°C'de saklandı. Kullanılmadan önce son konsantrasyon 10 pmol/µl olacak şekilde nuclease free water ile sulandırıldı.

*aac(6')- aph(2'')* gen bölgesinin amplifikasyonu için *aac(6')- aph(2'')* - F 5'-TTGGGAAGATGAAGTTTTAGTA-3' (Cat No: C0882C09) ve *aac(6')- aph(2'')* - R 5'-CCTTTACTCCAATAATTTGGCT-3' (Cat No: C0882C10) primer dizilimleri kullanıldı (Martineau ve diğ. , 2000). 100 µM konsantrasyonda stok hazırlamak amacıyla üretici firmanın belirttiği şekilde *aac(6')- aph(2'')* - F için 356 µl, *aac(6')- aph(2'')* - R için ise 517 µl TE Buffer kullanıldı. Stok primerler kullanım aşamasına kadar -20°C'de saklandı. Kullanılmadan önce son konsantrasyon 10 pmol/µl olacak şekilde nuclease free water ile sulandırıldı.

IS256 gen bölgesinin amplifikasyonu için IS256- P5 5'-AGTCCTTTTACGGTACAATG-3' (Cat No: C0882D05) ve IS256- P3 5'-TGTGCGCATCAGAAATAACG-3' (Cat No: C0882D06) primer dizilimleri kullanıldı (Proietti ve diğ. , 2012). 100 µM konsantrasyonda stok hazırlamak amacıyla üretici firmanın belirttiği şekilde IS256- P5 için 715 µl, IS256- P3 için ise 558 µl TE Buffer kullanıldı. Stok primerler kullanım aşamasına kadar -20°C'de saklandı. Kullanılmadan önce son konsantrasyon 10 pmol/µl olacak şekilde nuclease free water ile sulandırıldı.

### ***Genotipik Olarak Biyofilm Oluşturma Yeteneğinin Belirlenmesi***

Biyofilm oluşturma özelliğinin genotipik olarak belirlenmesi amacıyla *icaA* ve *icaD* gen bölgeleri incelendi (Proietti ve diğ. , 2015).

*icaA* gen bölgesinin amplifikasyonu için; *icaA-F* 5'-ACTGTTTCGGGGACAAGCAT-3'(Oligo No: 210602-1-5) ve *icaA-R* 5'-ATTGAGGCTGTAGGGCGTTG-3' (Oligo No: 210602-1-6), *icaD* gen bölgesinin amplifikasyonu için ise *icaD-F* 5'-CGTTAATGCCTTCTTTCTTATTGCG-3' (Oligo No: 210602-1-7) ve *icaD-R* 5'-ATTAGCGCACATTCGGTGTT-3' (Oligo No: 210602-1-8) primer dizilimleri kullanıldı (Proietti ve diğ. , 2015). 100 µM konsantrasyonda stok hazırlamak amacıyla üretici firmanın belirttiği şekilde *icaA-F* için 462.5 µl, *icaA-R* için 168.9 µl, *icaD-F* için 463 µl ve *icaD-R* için 430.4 µl TE Buffer kullanıldı (Sentebiolab). Stok primerler kullanım aşamasına kadar -20°C'de

saklandı. Kullanılmadan önce son konsantrasyon 10 pmol/μl olacak şekilde nuclease free water ile sulandırıldı.

**Tablo 3.1 Antibiyotik direnci ile ilişkili gen bölgeleri**

Gen Bölgesi	Primer Adı	Gen Dizilimi (5'-3')	Amplikon Büyüklüğü	Kaynak
<i>mecA</i>	mA1	TGCTATCCACCCTCAAACAGG	286 bp	Kondo ve diğ., 2007
	mA2	AACGTTGTAACCACCCCAAGA		
<i>blaZ</i>	<i>blaZ</i> 1	ACTTCAACACCTGCTGCTTTC	173 bp	Martineau ve diğ., 2000
	<i>blaZ</i> 2	TGACCACTTTTATCAGCAACC		
<i>ermA</i>	<i>ermA</i> -F <i>ermA</i> -R	GTTCAAGAACAATCAATACAGAG GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC	421 bp	Lina ve diğ., 1999
<i>ermB</i>	<i>ermB</i> -F <i>ermB</i> -R	CCGTTTACGAAATTGGAACAGGTAAAGGGC GAATCGAGACTTCAGTGTGC	359 bp	
<i>ermC</i>	<i>ermC</i> -F <i>ermC</i> -R	GCTAATATTGTTT AAATCGTCAATATTCC GGATCAGGAA AAGGACATTTTAC	572 bp	
<i>cat(set 1)</i>	<i>cat(set 1)</i> -F <i>cat(set 1)</i> - R	GCGAACGAAAAACAATTGCA TGAAGCTGTAAGGCAACTGG	748 bp	Kim ve diğ., 2005
<i>cat(set 2)</i>	<i>cat(set 2)</i> - F <i>cat(set 2)</i> - R	GAATGAATTTCAAGATATAA AGACTTATTTACTACGTTTC	259 bp	
<i>tet(K)</i>	<i>tet(K)</i> - F <i>tet(K)</i> - R	TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC GCAAACCTCATTCCAGAAGCA	718 bp	Kim ve diğ., 2005
<i>tet(L)</i>	<i>tet(L)</i> - F <i>tet(L)</i> - R	GTTGCGCGCTATATTCCAAA TTAAGCAAACCTCATTCCAGC	788 bp	
<i>tet(M)</i>	<i>tet(M)</i> - F <i>tet(M)</i> - R	GTAAATAGTGTTCTTGAG CTAAGATATGGCTCTAACAA	656 bp	
<i>tet(O)</i>	<i>tet(O)</i> - F <i>tet(O)</i> - R	GATGGCATAACAGGCACAGAC CAATATCACCAGAGCAGGCT	643 bp	
<i>aac(6')-aph(2'')</i>	<i>aac(6')-aph(2'')</i> – F <i>aac(6')-aph(2'')</i> - R	TTGGGAAGATGAAGTTTTTAGA CCTTTACTCCAATAATTTGGCT	174 bp	Martineau ve diğ., 2000
IS256	IS256- P5 IS256- P3	AGTCCTTTTACGGTACAATG TGTGCGCATCAGAAATAACG	762 bp	Proietti ve diğ., 2012

### 3.1.5.3. Agaroz Jel Elektroferez

Belirtilen miktarda (*icaA* ve *icaD* genleri için 1,5 g, araştırılan diğer genler için 1 g agaroz jel olacak şekilde) agaroz (Invitrogen UltraPure Agarose) 100 ml 1X TAE (Invitrogen Ultrapure 10 X TAE Buffer) ile sulandırıldı ve homojenizasyonu sağlanması amacıyla mikrodalgada eritildikten sonra oda ısısında, ısısı 60°C'nin altına düşmeyecek şekilde soğutuldu. Ardından agaroz içerisine 8 μl ethidium bromide (SIGMA E-1385) ilave edildi. Bu işlemin ardından seçilen büyüklükteki kalıp tepsisi içerisine döküldü ve taraklar yerleştirilerek jelin donması beklendi. Jel katılaştıktan sonra yerleştirilen taraklar çıkartılarak, 1X TAE ile doldurulmuş elektroferez tankına konumlandırılarak yükleme işlemine hazır hale getirildi.

- Ladder (Genemark)
- Loading dye (Thermoscientific 6X DNA Loading Dye LOT 00708110)

#### 3.1.5.4. Referans Suşlar

*S. pseudintermedius* identifikasyonu ve antibiyotik direnci ile ilişkili genlerin incelenmesi amacıyla yapılan PCR çalışmalarında pozitif kontrol olarak; Kopenhag Üniversitesi'nden Doç. Dr. Arshnee Moodley'den temin edilen DK 729, E044, E047, E069, E081, E083, E094 ve E097 kodlu suşlar kullanıldı.

Negatif kontrol olarak DNaz, RNaz ve Proteaz'dan arındırılmış, steril distile su kullanıldı (Multicell 809-115-CL).

#### 3.1.6. Diğer Gereçler

İzolasyon çalışmalarında kullanılan diğer gereçler: Etüv (Nuve), hassas terazi (Bel Engineering), otoklav kirli (Nuve), otoklav temiz, steril kabin, buzdolabı ve derindondurucu.

Moleküler çalışmalarda kullanılan diğer gereçler; PCR thermal cycler (Runik Thermal Cycler, SACEM Life Technologies), PCR tüpleri (ISOLAB PCR products, 0.2 ml RNase, DNase Cat # 123.01.002), mikrosantrifüj tüpü (ISOLAB), ısıtıcı blok (Biosan, Bio TDB- 100), santrifüj Cihazı (Denville 260 D), otomatik pipetler (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl Ergo One), güç kaynağı, UV Transilluminator (Infinity, Vilber Lourmat), mikrodalga ısıtıcı (Vestel), pipet uçları ( ISOLAB), ethanol (ISOLAB), minispin (Eppendorf), distile su (Multicell 809-115-CL). Biyofilm oluşturma özelliğinin fenotipik olarak belirlenmesi amacıyla yapılan Mikrotiter Plate Testte kullanılan diğer gereçler; ELISA plakası (96 kuyucuklu) ISOLAB, ELISA okuyucu (Spektramax 190) kullanıldı.

## 3.2. YÖNTEM

### 3.2.1. *Staphylococcus pseudintermedius* İzolasyonu ve İdentifikasyonu

#### 3.2.1.1. *Staphylococcus pseudintermedius* İzolasyonu

Laboratuvara getirilen sürüntü örneklerinin Mannitol Salt Agar (MSA)'a ekimleri yapıldı ve 37°C' de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonucunda üreyen koloni tipleri değerlendirildi ve farklı morfolojiye sahip olan koloniler saflaştırıldı. Bu koloniler Gram boyama yöntemi ile boyandıktan sonra mikroskopta x100'lük objektifte incelendi. Değerlendirme sonucunda Gram pozitif kok morfolojisi belirlenen izolatlara, katalaz ve oksidaz testi yapıldı. Katalaz pozitif ve oksidaz negatif olan izolatlar, Tryptic Soy Broth (TSB)' a pasajlandı ve 37°C 'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda TSB'de

üreyen koloniler, %20 gliserol ile -20°C’de genotipik identifikasyon aşamasında kullanılması amacıyla saklandı (Wang ve diğ., 2012).

### ***Katalaz Testi***

%3’lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lam üzerine damlatıldı ve üzerine bir öze dolusu saf olarak üreyen koloniden bırakıldı, ardından gaz oluşumu gözlemlendi. Gaz oluşumunun göstergesi olan kabarcıkların oluştuğu izolatlar katalaz pozitif olarak değerlendirildi (Arda, 2011).

### ***Oksidaz Testi***

Saf olarak üreyen kolonilerden bir öze dolusu alındı ve oksidaz sticklerine sürülerek bir dakika bekletildi. Süre sonunda koyu mavi veya mor renk oluşumu pozitif, renk değişiminin olmaması ise oksidaz negatif olarak değerlendirildi (Arda, 2011).

## ***3.2.1.2. PCR ile S. pseudintermedius’un Tanımlanması***

### ***3.2.1.2.1. DNA Ekstraksiyonu***

300 µl Chelex konulan mikrosantrifüj tüplerine, iğne uçlu öze yardımı ile saf olarak üreyen kolonilerden alındı ve bakteri süspansiyonu hazırlandı. Tortu bırakılmadan ve gerektiği durumda vorteks kullanılarak homojenizasyon sağlandı. 10 dakika termal blokta 98-99 °C’de inkube edildikten sonra 12.5x rpm de 3 dakika santrifüje edildi ve ekstraksiyon aşaması tamamlandı. Üstteki sıvı PCR çalışmalarında hedef DNA olarak kullanıldı (Kariyama ve diğ.,2000).

### ***3.2.1.2.2. PCR ile S. pseudintermedius İdentifikasyonu***

Şüpheli izolatlardan *S. pseudintermedius* identifikasyonu amacıyla pse-F2 ve pse-R5 primer dizilimleri kullanılarak PCR yapıldı (Sasaki ve diğ., 2010).

Her ekstrakt için primerler (10 pmol) pse-F2 1 µl ve pse-R5 1 µl, PCR master mix 2X karışımından 12,5 µl ve 8 µl DNaz, RNaz ve Proteaz’dan arındırılmış distile su ile son hacim 25 µl olacak şekilde 2,5 µl DNA ekstraktı eklendi. Hazırlanan PCR karışımı amplifikasyon amacıyla thermal cycler cihazına yerleştirildi. Amplifikasyon, 95°C’de 2 dk ön denatürasyon; ardından takip eden 30 döngü olacak şekilde 95°C 30 sn, 56°C 35 sn, 72°C 1 dk ve son sentez aşaması 72°C 2 dk olarak PCR programı tamamlandı. Elde edilen amplifiye ürünler agaroz jelde yürütülünceye kadar +4°C’de bekletildi.

%1 Agaroz jele; ilk kuyucuğa ladder olacak şekilde ardından sırasıyla amplifiye DNA ürünleri ile birlikte pozitif ve negatif kontroller yüklendi. DNA marker (100bp) 5 µl, amplifiye DNA ürünlerinden 10 µl alınarak loading dye ile 6X sulandırma (2 µl loading dye ve 10 µl DNA) yapılacak şekilde jele yüklendi. Yükleme yapılan jele 100 volt elektrik akımında 35 dakika elektroferez uygulandı. Elektroferezin ardından, jel tanktan alınarak transillüminatöre

aktarıldı ve UV altında bant oluşumları değerlendirildi. 926 bp bant oluşturan izolatlar pozitif kontrolün de referansı ile *S. pseudintermedius* olarak tanımlandı (Sasaki ve diğ. , 2010).

### 3.2.2. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıklarının Saptanması

#### 3.2.2.1. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıklarının Fenotipik Olarak Değerlendirilmesi

İzolatların tümüne CLSI standartlarına göre disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılık testleri yapıldı. Bu amaçla, izolatlar Mannitol Salt Agara pasajlandı ve 37°C ' de 24 saat inkubasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda taze kültürlerden FTS (% 0.9'luk fizyolojik tuzlu su) içinde 0.5 Mc Farland standardında süspansiyonlar elde edildi. Süspansiyonlar steril svablar ile Mueller- Hinton Agara (MHA) yayma ekim yapıldı. Antibiyotik diskleri agar yüzeyine yerleştirildi. *S. pseudintermedius* izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesinde; penisilin (10 U), oksasilin (1 µg), klindamisin (2 µg), kloramfenikol (30 µg), doksisisiklin (30 µg), eritromisin (15 µg), tetrasiklin (30 µg), gentamisin (10 µg), enrofloksasin (5 µg), difloksasin (10 µg), marbofloksasin (5 µg), orbifloksasin (10 µg) ve sulfisoksazole (300 µg) antibiyotik diskleri kullanıldı. Besiyerleri 37°C'de 24 saat inkubasyona bırakıldı. Süre sonunda zon çapları CLSI standartlarına göre değerlendirildi duyarlılık zon çaplarına göre duyarlı, orta derecede duyarlı ve dirençli olarak değerlendirmeye tabi tutuldu (CLSI). Üç ve daha fazla antibiyotik sınıfına dirençli olan izolatlar Çoklu Antibiyotik Direnci (ÇAD) olarak değerlendirildi (Magiorakos ve diğ, 2011).

İzolatların antibiyotik duyarlılık/dirençlilik durumlarının belirlenmesinden sonra ilgili antibiyotiklere direnç durumu göz önüne alınarak fenotipik yakınlıkları kantitatif olarak belirlendi. Oluşan paternlerin dendrogramı, UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) metodu ile görüntü analiz programı kullanılarak çizildi (Çiftci ve diğ., 2015).

#### 3.2.2.2. Antibiyotik Direnci ile İlişkili Belirli Genlerin İncelenmesi

İzolatların metisilin direnci ile ilişkili olarak *mecA* (Kondo ve diğ. ,2007), beta laktamaz direnci ile ilişkili olarak *blaZ* (Martineau ve diğ. , 2000), makrolid direnci ile ilişkili gen bölgeleri *ermA*, *ermB*, *ermC* (Lina ve diğ. , 1999), kloramfenikol direnci ile ilişkili olarak *cat* bölgeleri, tetrasiklin direnci ile ilişkili olarak *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)* (Kim ve diğ. , 2005), gentamisin direnci ile ilişkili *aac(6')*- *aph (2')* gen bölgeleri (Martineau ve diğ., 2000) ve stafilokoklarda antibiyotik direncinin gelişimiyle ilişkili olduğu bildirilen hareketli genetik element IS256 gen bölgesinin (Proietti ve diğ. , 2012) belirlenmesi amacıyla PCR yapıldı.

### 3.2.2.2.1. DNA Ekstraksiyon Kiti ile DNA Ekstraksiyonu:

Kitin içeriğinde yer alan, Gram pozitif bakteriler için lizat hazırlama talimatı kullanıldı. Bunun için, iki adet ısıtıcı blok 37°C ve 55°C olarak ayarlandı. Son lizozim konsantrasyonu 20 mg/ml olarak şekilde “Lysozyme Digestion Buffer (LDB)” hazırlandı, her yeni kullanımda tampon çözeltiye lizozim taze olarak eklendi. TSB’ye pasajlanan bakterilerden 1ml alınarak 5000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üst sıvı tüpten uzaklaştırıldı ve hücre peleti elde edildi. Elde edilen hücre peleti 180 µl LDB ile kısa süreli vorteks yardımı ile iyice karıştırılarak süspanse edildi. Ardından önceden ısıtılıp hazırlanmış olan 37°C’deki ısıtıcı blokta 30 dakika inkübe edildi. Inkübasyonun sonrasında kit içerisinde bulunan Proteinase K dan 20 µl eklenerek vorteks ile iyice karıştırıldı. Ardından 200 µl “Purelink Genomic Lysis/Binding Buffer” eklenerek vorteks ile aynı yöntemle karıştırıldı. Elde edilen süspanسیون önceden ısıtılmış olan 55°C’ deki ısıtıcı blokta 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin ardından %96-100 etanolden 200 µl lizata eklenerek homojen bir solüsyon elde etmek amacıyla 5 saniye vorteks ile iyice karıştırıldı.

Kit içerisinde yer alan spin columndan 1 adet çıkarıldı ve hazırlanılan lizattan 620 µl spin columna aktarıldı. 10.000 rpm’de 1 dakika oda ısısında santrifüj edildi. Kit içerisinde yer alan yeni bir koleksiyon tüpü alındı, santrifüj sonrasındaki tüp atılarak yerine yeni koleksiyon tüpü spin columna yerleştirildi.

“Yıkama solüsyonu I” ve “Yıkama solüsyonu II” şişelerine etiketleri üzerindeki belirtilen miktarlarda %96-100’lük etanol eklendi.

Yıkama solüsyonu I, 500 µl eklendi ve oda ısısında 10.000 x g 1 dakika santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü çıkarılıp yeni bir koleksiyon tüpü yerleştirildi ve 500 µl yıkama solüsyonu II eklenerek oda ısısında maksimum hızda 3 dakika santrifüj edildi. İşlem sonunda koleksiyon tüpü atıldı.

DNA’nın elüsyon aşaması için spin kolonu 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Kit içerisinde yer alan “Purelink Genomic Elüsyon Solüsyonu”ndan 100 µl (bu miktar 25-200 µl arasında olabilmektedir) eklenerek 1 dakika oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Ardından maksimum hızda oda ısısında 1 dakika santrifüj edildi. Bu aşamada tüpte saflaştırılmış DNA bulunmaktadır. Daha fazla DNA elde etmek amacıyla, yeni bir mikrosantrifüj tüpü yerleştirilerek “Purelink Genomic Elüsyon Solüsyonu”ndan 100 µl eklenerek 1 dakika oda ısısında inkübasyona bırakıldı ve bu kez 1.5 dakika maksimum hızda oda ısısında santrifüj edildi. Bu aşamanın ardından spin kolon atıldı.

Elüsyon aşamasında kullanılan santrifüj tüpü içerisindeki saflaştırılmış DNA kullanım aşamasına kadar -20°C’de genomic elüsyon solüsyonunda saklandı.

#### **3.2.2.2.2. Metisilin Direnci ile İlişkili Gen Bölgesinin Saptanması**

*mecA* gen bölgesi için PCR karışımı; her ekstrakt için *mA1* primer 1 µl, *mA2* primer 1 µl (primerler 10pmol), Thermoscientific PCR master mix 12,5 µl ve 8 µl DNaz, RNaz ve Proteaz’dan arındırılmış distile su ile son hacim 25 µl olacak şekilde 2,5 µl DNA ekstraktı eklenerek hazırlandı. Amplifikasyon amacıyla thermal cycler cihazına yerleştirildi. Cihaz siklusu 94°C’de 5 dakika ön denatürasyon, takip eden 35 döngü olacak şekilde 94°C’de 2 dakika denatürasyon, 57°C’de 1 dakika primer bağlanması, 72°C’de 3 dakika sentez ve son sentez aşaması 72°C’ de 5 dakika olarak ayarlandı. Agaroz jele yükleme işlemi 3.2.1.2.2.’de anlatıldığı gibi yapıldı ve jel elektroforez sonucunda 286 bp bant uzunluğu gösteren izolatlar *mecA* pozitif olarak değerlendirildi (Kondo ve diğ. , 2007).

#### **3.2.2.2.3. Beta Laktamaz Direnci ile İlişkili Gen Bölgesinin Saptanması**

Her ekstrakt için primerler (10 pmol) *blaZ1* 1 µl ve *blaZ2* 1 µl, Thermoscientific PCR master mix 2X karışımından 12,5 µl ve 8 µl DNaz, RNaz ve Proteaz’dan arındırılmış distile su ile son hacim 25 µl olacak şekilde 2,5 µl DNA ekstraktı eklendi. Hazırlanan PCR karışımı amplifikasyon amacıyla thermal cycler cihazına yerleştirildi. Amplifikasyon, 95°C’de 10 dk ön denatürasyon; ardından takip eden 35 döngü olacak şekilde 94°C 30 sn, 58°C 30 sn, 72°C 30 sn ve son sentez aşaması 72°C 7 dk olarak PCR programı tamamlandı. Elde edilen amplifiye ürünler agaroz jelde yürütülünceye kadar +4°C’de bekletildi.

Agaroz jele yükleme işlemi 3.2.1.2.2. de anlatıldığı gibi yapıldı ve Jel elektroforez sonucunda 173 bp bant uzunluğu gösteren izolatlar *blaZ* pozitif olarak değerlendirildi (Martineau ve diğ. , 2000).

#### **3.2.2.2.4. Makrolid Direnci ile İlişkili Gen Bölgelerinin Saptanması**

Her ekstrakt için *ermA*, *ermB* ve *ermC* 1’er µl forward ve reverse primerlerinden (10 pmol), Thermoscientific PCR master mix 2X karışımından 12,5 µl ve 8 µl DNaz, RNaz ve Proteaz’dan arındırılmış distile su ile son hacim 25 µl olacak şekilde 2,5 µl DNA ekstraktı eklendi. Hazırlanan PCR karışımı amplifikasyon amacıyla thermal cycler cihazına yerleştirildi.

*ermA* ve *ermC* genlerinin amplifikasyon amacıyla, 95°C’de 10 dk ön denatürasyon; ardından takip eden 30 döngü olacak şekilde 94°C 30 sn, 52°C 30 sn, 72°C 60 sn ve son sentez aşaması 72°C 10 dk olarak PCR programı tamamlandı. Elde edilen amplifiye ürünler agaroz jelde yürütülünceye kadar +4°C’de bekletildi. *ermB* geninin amplifikasyonu amacıyla, 94°C’de 10 dk ön denatürasyon; ardından takip eden 30 döngü olacak şekilde 94°C 30 sn, 55°C 30 sn,

72°C 60 sn ve son sentez aşaması 72°C 10 dk olarak PCR programı tamamlandı. Elde edilen amplifiye ürünler agaroz jelde yürütülünceye kadar +4°C'de bekletildi.

Agaroz jele yükleme işlemi 3.2.1.2.2. de anlatıldığı gibi yapıldı ve Jel elektroforez sonucunda sırasıyla 421 bp, 359 bp ve 572 bp bant uzunluğu gösteren izolatlar *ermA*, *ermB* ve *ermC* pozitif olarak değerlendirildi (Lina ve diğ. , 1999).

### 3.2.2.2.5. Tetrasiklin Direnci ile İlişkili Gen Bölgelerinin Saptanması

Kim ve diğ. (2005) tarafından önerilen multiplex PCR yöntemi kullanarak, MPCR-1 ile *tet(M)* ve *tet(L)* genleri, MPCR-2 ile *tet(K)* ve *tet(O)* genleri değerlendirildi. MPCR-1 karışımı hazırlanırken her ekstrakt için primerlerden (10 pmol) *tet(L)* primer-F 1 µl, *tet(L)* primer-R 1 µl, *tet(M)* primer-F 1 µl, *tet(M)* primer-R 1 µl, Thermoscientific PCR master mix 2X karışımından 12,5 µl ve 6,5 µl DNaz, RNaz ve Proteaz'dan arındırılmış distile su ile son hacim 25 µl olacak şekilde 2 µl DNA ekstraktı eklendi. MPCR-2 karışımı hazırlanırken her ekstrakt için primerler (10 pmol) *tet(K)* primer-F 1 µl, *tet(K)* primer-R 1 µl, *tet(O)* primer-F 1 µl, *tet(O)* primer-R 1 µl, Thermoscientific PCR master mix 2X karışımından 12,5 µl ve 6,5 µl DNaz, RNaz ve Proteaz'dan arındırılmış distile su ile son hacim 25 µl olacak şekilde 2 µl DNA ekstraktı eklendi. Hazırlanan PCR karışımları amplifikasyon amacıyla thermal cycler cihazına yerleştirildi.

MPCR-1 ve MPCR-2 programında araştırılan genlerin amplifikasyonu, 95°C'de 5 dk ön denatürasyon; ardından takip eden 30 döngü olacak şekilde 95°C 30 sn, 55°C 30 sn, 72°C 30 sn ve son sentez aşaması 72°C 7 dk olarak PCR programları tamamlandı. Elde edilen amplifiye ürünler agaroz jelde yürütülünceye kadar +4°C'de bekletildi.

Agaroz jele yükleme işlemi 3.2.1.2.2. de anlatıldığı gibi yapıldı ve Jel elektroforez sonucunda sırasıyla 718 bp, 788 bp, 656 bp, 643 bp bant uzunluğu gösteren izolatlar *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)* ve *tet(O)* genleri pozitif olarak değerlendirildi (Kim ve diğ. , 2005).

### 3.2.2.2.6. Kloramfenikol Direnci ile İlişkili Gen Bölgelerinin Saptanması

Kim ve diğ. (2005) tarafından önerilen Multiplex PCR yöntemi kullanarak *cat* (set 1) ve *cat* (set 2) genleri değerlendirildi. Her ekstrakt için primerler (10 pmol) *cat* (set 1) primer-F 1 µl, *cat* (set 1) primer-R 1 µl, *cat* (set 2) primer-F 1 µl, *cat* (set 2) primer-R 1 µl, Thermoscientific PCR master mix 2X karışımından 12,5 µl ve 6,5 µl DNaz, RNaz ve Proteaz'dan arındırılmış distile su ile son hacim 25 µl olacak şekilde 2 µl DNA ekstraktı eklendi. Hazırlanan PCR karışımı amplifikasyon amacıyla thermal cycler cihazına yerleştirildi. Amplifikasyon, 95°C'de 5 dk ön denatürasyon; ardından takip eden 30 döngü olacak şekilde 95°C 30 sn, 55°C 30 sn,

72°C 30 sn ve son sentez aşaması 72°C 7 dk olarak PCR programı tamamlandı. Elde edilen amplifiye ürünler agaroz jelde yürütülünceye kadar +4°C'de bekletildi.

Agaroz jele yükleme işlemi 3.2.1.2.2. de anlatıldığı gibi yapıldı ve Jel elektroforez sonucunda sırasıyla 748 bp ve 259 bp bant uzunluğu gösteren izolatlar *cat* (set 1) ve *cat* (set 2) pozitif olarak değerlendirildi (Kim ve diğ. , 2005).

#### **3.2.2.2.7. Gentamisin Direnci ile İlişkili Gen Bölgelerinin Saptanması**

Her ekstrakt için primerler (10 pmol) *aac(6')*- *aph(2'')* - F 1 µl ve *aac(6')*- *aph(2'')* - R 1 µl, Thermoscientific PCR master mix 2X karışımından 12,5 µl ve 8 µl DNaz, RNaz ve Proteaz'dan arındırılmış distile su ile son hacim 25 µl olacak şekilde 2,5 µl DNA ekstraktı eklendi. Hazırlanan PCR karışımı amplifikasyon amacıyla thermal cycler cihazına yerleştirildi. Amplifikasyon, 95°C'de 10 dk ön denatürasyon; ardından takip eden 35 döngü olacak şekilde 94°C 30 sn, 58°C 30 sn, 72°C 30 sn ve son sentez aşaması 72°C 7 dk olarak PCR programı tamamlandı. Elde edilen amplifiye ürünler agaroz jelde yürütülünceye kadar +4°C'de bekletildi.

Agaroz jele yükleme işlemi 3.2.1.2.2. de anlatıldığı gibi yapıldı ve Jel elektroforez sonucunda 174 bp bant uzunluğu gösteren izolatlar *aac(6')*- *aph(2'')* pozitif olarak değerlendirildi (Martineau ve diğ. , 2000).

#### **3.2.2.2.8. IS256 Gen Bölgesinin Saptanması**

Her ekstrakt için primerler (10 pmol) IS256- P5 1 µl ve IS256- P3 1 µl, Thermoscientific PCR master mix 2X karışımından 12,5 µl ve 8 µl DNaz, RNaz ve Proteaz'dan arındırılmış distile su ile son hacim 25 µl olacak şekilde 2,5 µl DNA ekstraktı eklendi. Hazırlanan PCR karışımı amplifikasyon amacıyla thermal cycler cihazına yerleştirildi. Amplifikasyon, 95°C'de 5 dk ön denatürasyon; ardından takip eden 35 döngü olacak şekilde 94°C 60 sn, 52°C 60 sn, 72°C 60 sn ve son sentez aşaması 72°C 7 dk olarak PCR programı tamamlandı. Elde edilen amplifiye ürünler agaroz jelde yürütülünceye kadar +4°C'de bekletildi.

Agaroz jele yükleme işlemi 3.2.1.2.2. de anlatıldığı gibi yapıldı ve Jel elektroforez sonucunda 762 bp bant uzunluğu gösteren izolatlar IS256 pozitif olarak değerlendirildi (Proietti ve diğ. , 2012).

### **3.2.3. Biyofilm Oluşturma Özelliğinin Saptanması**

Çalışmada izolatların biyofilm oluşturma özellikleri hem fenotipik hem de genotipik olarak incelendi. Bu amaçla, Congo Red Agarda ve mikrotiter plate test olarak iki farklı yöntem kullanılarak fenotipik olarak değerlendirme yapıldı (Proietti ve diğ., 2015).

### 3.2.3.1. Fenotipik Olarak Biyofilm Oluşturma Özelliğinin Saptanması

#### 3.2.3.1.1. Congo Red Agar Yöntemi ile Biyofilm Oluşturma Yeteneğinin Saptanması

Congo Red Agar (CRA) yöntemi ile biyofilm oluşturma özelliğini incelemek amacıyla dondurulmuş olan izolatlardan Koyun Kanlı Agara pasaj yapıldı ve 37°C’de 24 saat inkübasyon sonucunda canlandırılan izolatların saflıkları kontrol edildi. Saf olarak üreyen kolonilerden Tryptic Soy Broth (TSB)’a pasaj yapıldı ve 37°C’de 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda TSB’den CRA’ya pasajları yapıldı. CRA’da meydana gelen fenotipik değişiklikler öncelikle 37°C 24 saat ve ardından 1 gece de oda ısısında inkübasyona bırakıldıktan sonra değerlendirildi. Değerlendirme kolonilerde meydana gelen renk değişimlerine göre yapıldı. Siyah renkteki koloniler biyofilm pozitif, siyaha kaçan koyu renkte olan koloniler biyofilm zayıf pozitif ve kırmızı renkteki koloniler ise biyofilm negatif olarak değerlendirildi (Proietti ve diğ. , 2015).

#### 3.2.3.1.2. Mikroiiter Plate Test (MTP) ile Biyofilm Oluşturma Yeteneğinin Saptanması

İzolatlar Tryptic Soy Agar (TSA)’a pasajlanarak 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Saf olarak üreyen kolonilerden 5ml TSB (%1 glikoz)’e 0.5 Mc Farland standartlarında süspansiyon hazırlandı. Bu test için 96 kuyucuklu plakalar kullanıldı. Hazırlanan süspansiyondan her izolat için 3 ayrı kuyucuğa 200 µl ve kontrol için 6 ayrı kuyucuğa yalnızca besiyeri konuldu, ardından 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda kuyucuklar 300 µl PBS ile 3 defa yıkanarak yapışmayan hücreler uzaklaştırıldı ve plakalar kuruyana dek oda ısısında inkübe edildi. Sonrasında her bir kuyucuğa 150 µl Hucker Crystal Violet solüsyonu ilave edildi ve 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. Süre sonunda fazla olan boyalar musluk suyu ile uzaklaştırıldı. Plakalar kuruduktan sonra, hücrelere bağlanan boyaları tekrar sulandırmak amacıyla 160 µl %33’lük Glasiyal Asetik Asit eklendi. Her kuyucuğun 570 nm’deki OD değerleri Spectramax 190 ile okundu ve değerlendirmeye alındı. OD değeri  $\leq$  0.065 olan suşlar biyofilm oluşturmeyen, OD değeri 0.065- 0.130 arasında olanlar zayıf biyofilm oluşturan, OD değeri 0.130- 0.260 arası olanlar orta derecede biyofilm oluşturan OD değeri  $>$  0.260 olan suşlar kuvvetli biyofilm oluşturan olarak değerlendirildi (Proietti ve diğ., 2015).

#### 3.2.3.2. Genotipik Olarak Biyofilm Oluşturma Özelliğinin Saptanması

Biyofilm oluşturma özelliğinin genotipik olarak belirlenmesi amacıyla *icaA* ve *icaD* gen bölgeleri incelendi (Proietti ve diğ., 2015).

Her ekstrakt için *icaA*-F primer 1 µl, *icaA*-R primer 1 µl, Thermoscientific PCR master mix 12,5 µl ve 8 µl DNaz, RNaz ve Proteaz’dan arındırılmış distile su ile son hacim 25 µl

olacak şekilde 2,5 µl DNA ekstraktı eklendi. Amplifikasyon amacıyla thermal cyclers cihazına yerleştirildi.

PCR, 94°C'de 3 dakika ön denatürasyon yapıldı. Bu aşamanın ardından 35 döngü olacak şekilde 94°C'de 15 saniye, 60°C'de 20 saniye, 72°C'de 20 saniye ve son sentez aşaması 72°C 10 dakika olarak tamamlandı. Çoğaltılan ürünlerin %1,5 agaroz jele yükleme işlemi 1.2.2. de anlatıldığı gibi yapıldı. 134 bp uzunluğunda banda sahip izolatlar *icaA* geni pozitif olarak değerlendirildi.

*icaD* geninin saptanması amacıyla; *icaD*- F, *icaD*- R primer çifti kullanılarak aynı PCR karışımı hazırlandı. PCR programında da bağlanma ısısı 56°C olarak değiştirildi. Agaroz jele yükleme işlemi *icaA* geninde anlatıldığı gibi yapıldı ve jel elektroforez sonucu 166 bp uzunluğunda banda sahip izolatlar *icaD* geni pozitif olarak değerlendirildi (Proietti ve diğ, 2015).

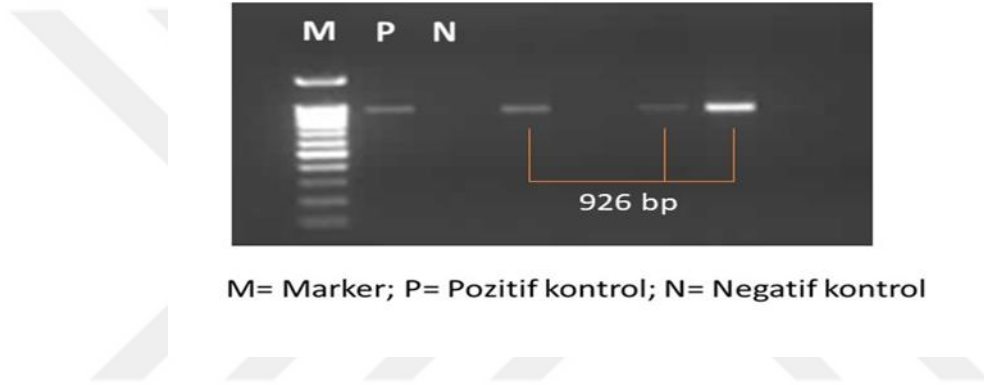
#### 3.2.4. İstatistiksel Analiz

Kolonizasyon ve antibiyotik direnci ile ilgili prevalans oranı (PR) yüzde olarak hesaplandı. Bütün analizlerde güven aralığı (CI) %95 olarak kullanıldı. Prevalans (P) örnek alındığı anda kolonizasyon bulunan hayvanların sayısının toplam örnek sayısına bölünmesi ile hesaplandı. Verilerin analizinde SPSS for Windows, Version 17.0. (SPSS Inc. Chicago, USA, Released 2008) programı kullanıldı. Hastalara ait demografik bilgiler SP varlığı ile yaş (1 yaş altı, 1-6 yaş, 6 yaş üstü), yaşam alanı (ev, dış ortam) ve cinsiyet (dişi,erkek) arasındaki ilişki araştırıldı. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında T test ve chi-kare testi (beklenen hücre değeri 5'in altında olduğu durumlarda Fisher's exact testi) kullanıldı. Gerçekleştirilen bütün analizlerde istatistiksel olarak P değeri <0,05 anlamlı olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. *S. pseudintermedius* İzolasyonu

Toplamda 205 pyodermalı köpekten alınan örneklerden yapılan incelemelerin sonucunda 196 adet *Staphylococcus spp.* şüpheli koloniler izole edildi. *S. pseudintermedius* spesifik primerler ile yapılan PCR sonucunda, 196 şüpheli izolatın 109 adeti 926 bp bant oluşturdu ve bu izolatlar *S. pseudintermedius* olarak değerlendirildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 *S. pseudintermedius* spesifik PCR agaroz jel elektroforez görüntüsü

Süperfisyel pyoderma tanısı konulan köpeklerden alınan lezyonların 65'inde, derin pyoderma tanısı konulan köpeklerin 22'sinde ve yüzeysel pyoderma tanısı konulan köpeklerin ise 20'sinde *S. pseudintermedius* izole edildi. *S. pseudintermedius* izole edilen diğer iki köpeğin pyoderma derecesi ile ilgili bilgi mevcut değildi.

Pyoderma türleri ile SP pozitifliği arasında yapılan istatistiksel analiz bulguları; Pyoderma varlığı ile SP pozitifliği (prevalans= kolonize köpek sayısı/ incelenen köpek sayısı x 100) demografik kategorilere göre hesaplandı ve SPSS for Windows, Version 17,0 (SPSS Inc. Chicago, USA, Released 2008) programı ile incelendi. Prevalans oranları (PR) ve ilgili %95 güven aralığı değerleri (%95 CI) enfeksiyonun kontrolü amacıyla pyoderma türleri ile SP pozitifliği arasındaki ilişki T test ile hesaplandı. Pyoderma varlığında SP pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Chi square  $p= 0.04281$ ). Prevalans ile ilişkilendirildiğinde bakteri varlığının pyoderma oluşumuna etkisi saptandı. *S. pseudintermedius*'un pyoderma türleri ile ilişkisi T test ile karşılaştırıldı. SP'nin varlığı pyoderma türleri arasında süperfisyel pyoderma

oluşumuna etkisi anlamlı bulundu (yüzeysel-superfisyel=0.7407-0.5285=0.2123;  $t=2.221$ ;  $df=41.7$ ;  $p=0.0161$ ; yüzeysel-derin=0.7407-0.7097=0.0311;  $t=0.265$ ;  $df=54.9$ ;  $p=0.3955$ ; superfisyel-derin=0.5285-0.7097=-0.1812;  $t=-1.946$ ;  $df=49.4$ ;  $p=0.0286$ ).

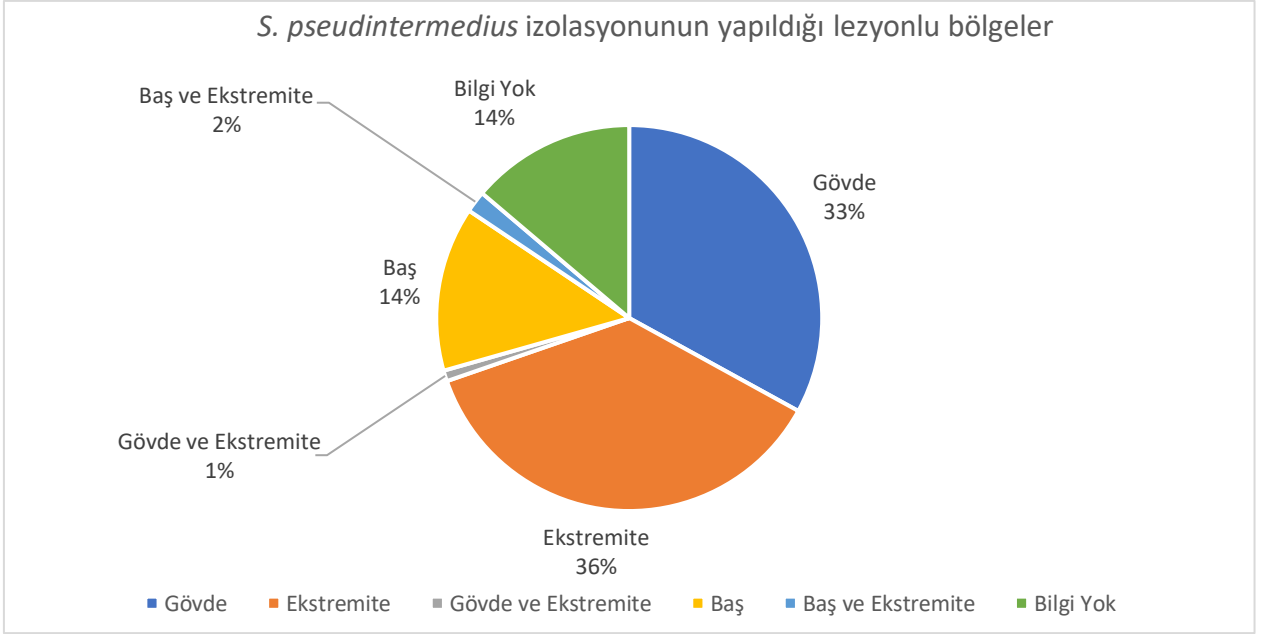
Demografik veriler SP varlığı ile ilişkilendirilerek istatistiksel olarak değerlendirildiğinde 4 aylık ve 15 yaş arası (ortalama  $\pm$  standart sapma: **4,133 $\pm$ 3,20**) köpeklerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ( $p=0,65873$ ). Üç yaş grubu (1 yaş altı, 1-6 yaş, 6 yaş üstü) arasında SP varlığı ile ilgili yapılan karşılaştırma sonucunda yaş gruplarının birbirleri ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $<1-1-6=0.5-0.5541=-0.0541$ ;  $t=-0.331$ ;  $df=9.7$ ;  $p=0.3752$ ;  $<1->6=0.5-0.4722=0.0278$ ;  $t=0.155$ ;  $df=13.9$ ;  $p=0.4402$ ;  $1-6->6=0.5541-0.4722=0.0818$ ;  $t=0.883$ ;  $df=52.7$ ;  $p=0.191$ ).

**Tablo 4.2 Hasta bilgileri ve SP pozitifliği oranları**

Değişkenler	Toplam (%)	SP pozitif (%)	SP negatif (%)
<b>Yaş (Yıl)</b>			
<1	10 (4,87)	5 (50)	5 (50)
1-6	148 (72,19)	82 (55,4)	66 (44,6)
>6	36 (17,56)	17 (47,2)	19 (52,7)
Bilinmiyor	11 (5,36)	5 (45,45)	6 (54,54)
<b>Bakım Ortamı</b>			
Ev	46 (22,43)	22(47,82)	24 (52,17)
Dış Ortam	146 (71,21)	80 (54,79)	66 (45,2)
Bilinmiyor	13 (6,34)	7 (53,84)	6 (46,15)
<b>Cinsiyet</b>			
Dişi	93 (45,36)	57 (61,29)	36 (38,7)
Erkek	112 (54,63)	52 (46,42)	60 (53,57)

SP varlığı saptanan pyodermalı köpeklerin cinsiyetleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde dişi ve erkek arasındaki fark anlamlı bulundu ( $p=0.033754$ ). Dişilerin pyoderma oluşumunun istatistiksel olarak daha olası olduğunu göstermektedir. Pyoderma saptanan SP pozitif köpeklerin yaşam ortamları arasındaki değerlendirme istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p=0.075224$ ).

Pyodermalı köpeklerde lezyonların bulunduğu bölgeler incelendiğinde, bu çalışmada ekstremitelerde yer alan lezyonlardan daha fazla SP izole edildiği görüldü (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2** *S. pseudintermedius* izolasyonunun yapıldığı pyoderma lezyonlarının bulunduğu bölgeler

## 4.2. İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

### 4.2.1. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıklarının Fenotipik Olarak Değerlendirilmesi ve Antibiyotiplendirme

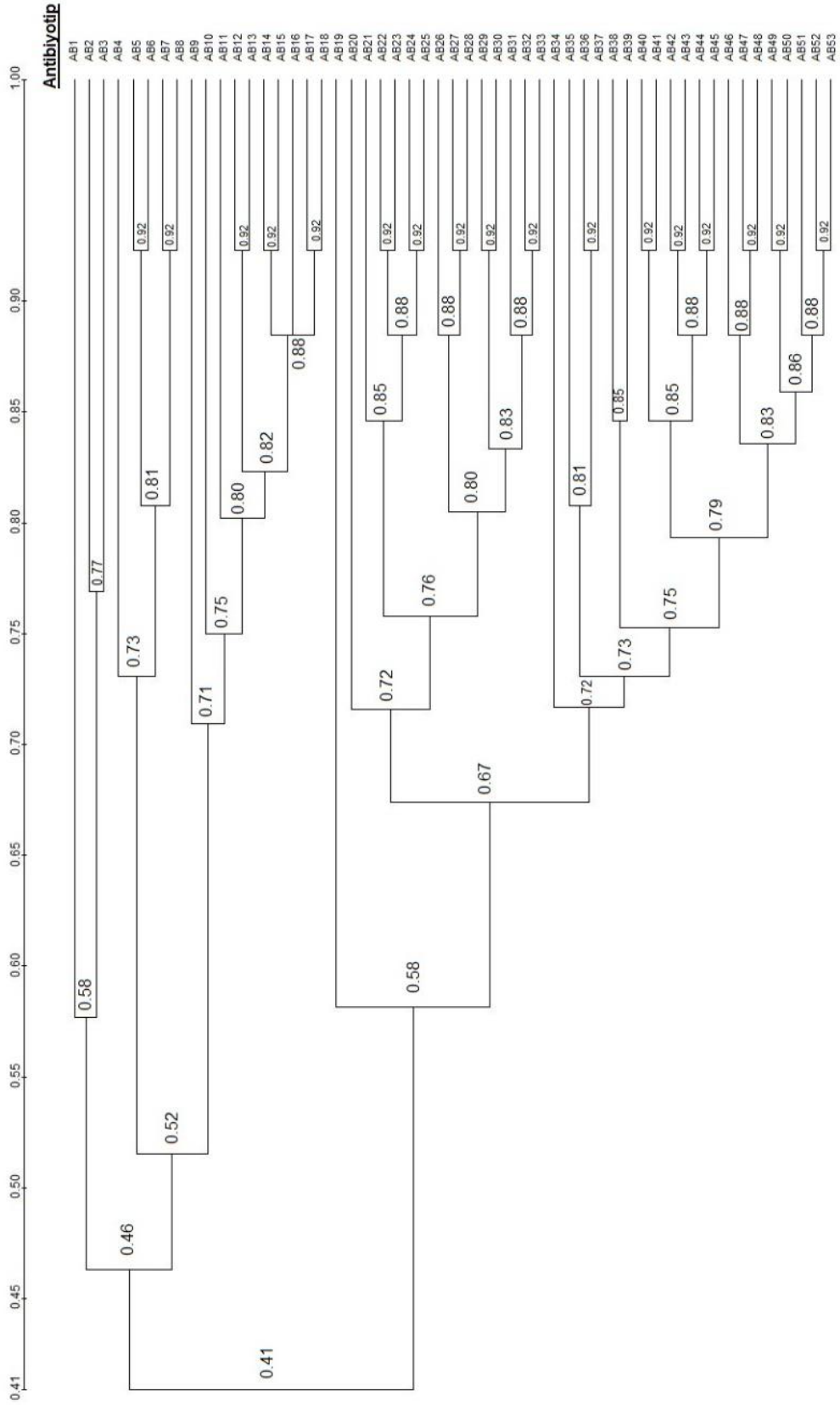
Disk difüzyon testi ile izolatların antibiyotik duyarlılıklarını fenotipik olarak değerlendirilmesi sonucunda, en çok direnç penisilin (n=60), sulfisoksazol (n=50) ve tetrasiklin (n=41) olarak belirlendi (Tablo 4.3).

*S. pseudintermedius* olarak belirlenen 109 izolata, 13 farklı antibiyotik ile yapılan antibiyogram sonuçlarına göre birbirine %41-92 arasında değişen oranlarda benzerlik gösteren 53 farklı antibiyotip belirlendi (Şekil 4.3). Aynı biyotip içerisinde yer alan suşlar %100 benzerlik oranına sahipti. AB42, 25 izolataın yer aldığı en baskın antibiyotiplendirme grubu olarak belirlendi ve bu grupta yer alan tüm izolatlar 13 antibiyotiğe de duyarlı olarak değerlendirildi. Bu grubun dışında hiçbir antibiyotiğe dirençli olmayıp sadece orta duyarlı oldukları antibiyotikler olan 8 antibiyotip (AB21, AB23, AB36, AB37, AB41, AB43, AB44, AB45) mevcuttur ve orta duyarlı oldukları antibiyotikler ise sulfisoksazol, klindamisin, enrofloksasin ve doksisisiklidir.

**Tablo 4.3 İzolatların Antibiyotik Direnç Prevalansları**

Antibiyotik	Dirençli Bakteri	
	Sayısı	P (%)
P10	60	%55
OX1	9	%8,2
DIF10	5	%4,6
ENR5	5	%4,6
MAR5	5	%4,6
ORB10	5	%4,6
ST300	50	%45,9
DA2	20	%18,3
E15	18	%16,5
C30	15	%13,7
DO30	32	%29,3
TE30	41	%37,6
CN10	7	%6,4

P10: penisilin G, OX1: oksasilin, DIF10: difloksasin, ENR5: enrofloksasin, MAR5: marbofloksasin, ORB10: orbifloksasin, ST300: sulfisoksazol, DA2: klindamisin, E15: eritromisin, C30: kloramfenikol, DO30: doksisisiklin, TE30: tetrasiklin, CN10: gentamisin, P: prevalans.



Şekil 4.3 İzolatların 13 antibiyotige karşı duyarlılıklarına göre antibiyotip dendogramı

Çalışmada toplamda 36 izolat 3 ve daha fazla antibiyotik grubuna dirençli olarak değerlendirildi. Çoklu antibiyotik direnci 22 antibiyotikte saptandı (Tablo 4.4). En fazla 12 antibiyotiğe dirençli 2 izolat, en az 3 antibiyotiğe dirençli ise 4 izolat belirlendi. Bu izolatların çalışma materyallerinin alındığı köpeklerin 21'i dışarıda yaşamakta ve 23'ünün antibiyotik kullanım geçmişi vardı. Yalnızca 5 köpek 1 yaşın altında, diğer köpekler ise 1 yaş ve üzeri olup en yaşlısı 15 yaşında idi.

**Tablo 4.4 Dirençli antibiyotik sayısına göre antibiyotikler ve izolat sayıları**

Dirençli Antibiyotik Sayısı	Antibiyotip	İzolat sayısı
12	AB6, AB7	2
11	AB5, AB8	2
9	AB4	1
8	AB12, AB17	2
7	AB3, AB13, AB14, AB16, AB18	8
6	AB2, AB9, AB10, AB15	4
5	AB1, AB11, AB31	3
4	AB33	10
3	AB26, AB27, AB30, AB32	6
2	AB20, AB24, AB28, AB29, AB34, AB47, AB48	12
1	AB19, AB22, AB25, AB35, AB38, AB39, AB40, AB46, AB49, AB50, AB51, AB52, AB53	24
0	AB21, AB23, AB36, AB37, AB41, AB42, AB43, AB44, AB45	35

#### 4.2.2. Antibiyotik Direnci ile İlişkili Belirli Genlerin Saptanması Sonuçları

##### 4.2.2.1. Metisilin Direnci ile İlişkili Gen Bölgesinin Saptanması

Metisilin direnci ile ilişkili olan *mecA* geni belirlenmesi amacıyla tüm izolatlar PCR ile incelendi ve jel elektroforez sonucunda 286 bp bant uzunluğu gösteren 6 izolat *mecA* pozitif

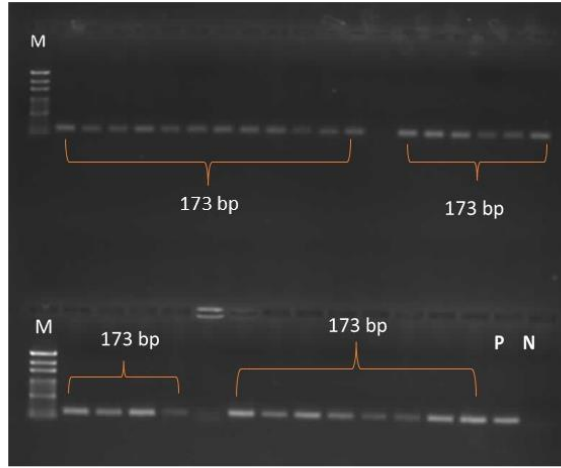
olarak belirlendi (Şekil 4.4). Metisilin direncinin belirlenmesinde kullanılan oksasilin direnci varlığı ise disk difüzyon yöntemi ile 9 izolatta saptandı fakat bu izolatlarda *mecA* geni saptanmadı. *mecA* geni saptanan köpeklerin ikisi ev ortamında, diğerleri ise dışarıda yaşayan köpekler olup; ev ortamındaki köpekler Pug ırkı, dışarıda yaşayan köpekler ise Shar-pei, Setter ve melez ırklardandı. Bir hastaya yüzeysel pyoderma, diğerlerine ise süperfisyel pyoderma tanısı konulan; ikisi erkek dördü dişi olan köpeklerin yaşları değişken olup en küçüğü 11 aylık ve en büyüğü 6 yaşındaydı.



**Şekil 4.4 *mecA* genini saptamaya yönelik PCR'ın agaroz jel elektroferez görüntüsü**

#### **4.2.2.2. Beta Laktamaz Direnci ile İlişkili Gen Bölgesinin Saptanması**

Disk difüzyon testi sonucunda penisilin dirençli olarak belirlenen izolatlarda, *blaZ* gen bölgesine spesifik primerler kullanılarak PCR yapıldı. Fenotipik olarak dirençli olan 60 izolattın 53'ünde 173 bp uzunluğunda bant gözlemlendi bu izolatlarda *blaZ* pozitif olarak değerlendirildi. 53 izolatta *blaZ* geni pozitif olarak değerlendirilirken 7 izolatta bu gen saptanmadı.

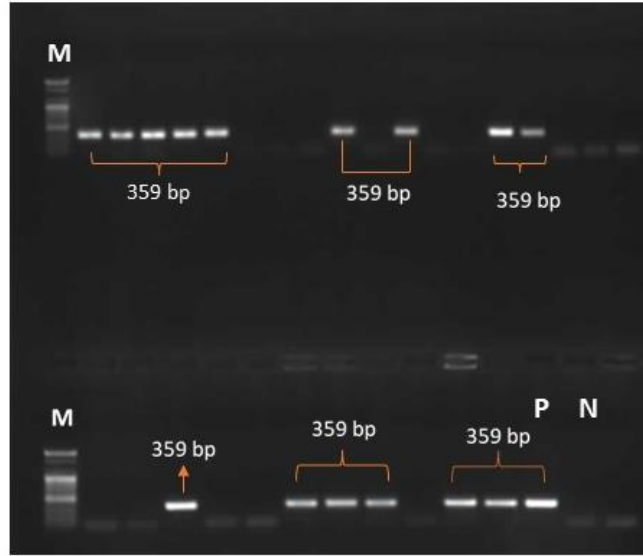


M= Marker; P= Pozitif kontrol; N= Negatif kontrol

#### Şekil 4.5 *blaZ* genini saptamaya yönelik PCR'ın agaroz jel elektroforez görüntüsü

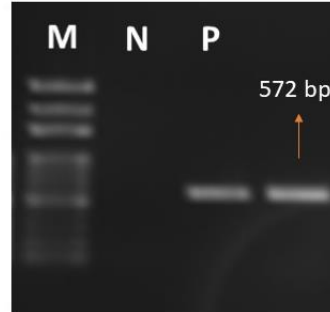
##### 4.2.2.3. Makrolid Direnci ile İlişkili Gen Bölgelerinin Saptanması

Disk difüzyon testi sonucunda eritromisine orta duyarlı ve dirençli olarak belirlenen 30 izolata *ermA*, *ermB* ve *ermC* gen bölgelerine spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR çalışmasında; jel elektroforez sonucunda sırasıyla 421 bp, 359 bp ve 572 bp bant uzunluğu gösteren izolatlara pozitif olarak değerlendirildi. *ermA* pozitifliği hiç saptanmazken, 15 izolat *ermB* pozitif ve 1 izolat *ermC* pozitif olarak saptandı. *ermC* pozitif olan izolat aynı zamanda *ermB* pozitif olarak saptandı.



M= Marker; P= Pozitif kontrol; N= Negatif kontrol

Şekil 4.6 *ermB* genini saptamaya yönelik PCR'ın agaroz jel elektroferez görüntüsü

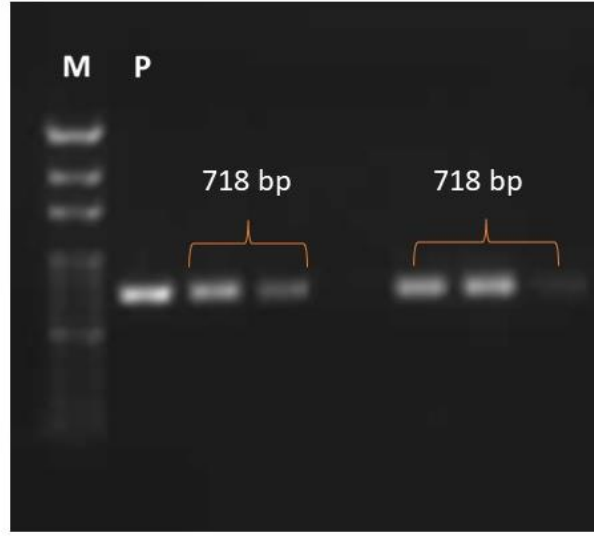


M= Marker; P= Pozitif kontrol; N= Negatif kontrol

Şekil 4.7 *ermC* genini saptamaya yönelik PCR'ın agaroz jel elektroferez görüntüsü

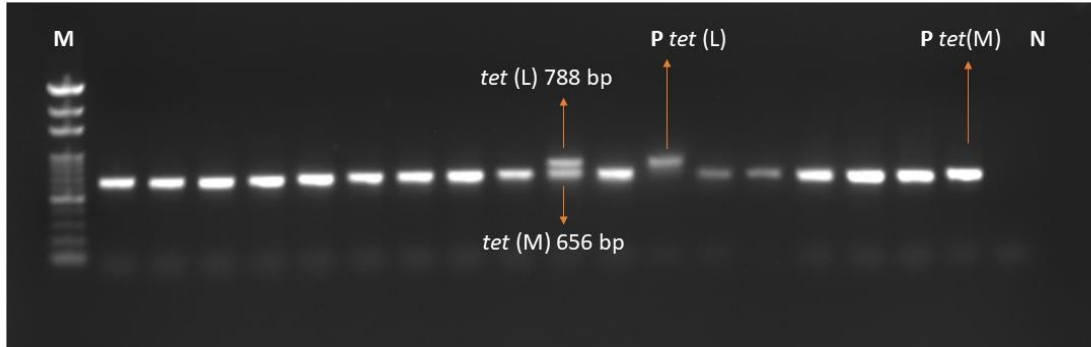
#### 4.2.2.4. Tetrasiklin Direnci ile İlişkili Gen Bölgelerinin Saptanması

Disk difüzyon testi sonucunda tetrasikline orta duyarlı ve dirençli olarak belirlenen 44 izolata yapılan PCR çalışmasında; jel elektroferez sonucunda sırasıyla 718 bp, 788 bp, 656 bp, 643 bp bant uzunluğu gösteren izolatlarda *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)* ve *tet(O)* genleri pozitif olarak değerlendirildi. 5 *tet(K)*, 1 *tet(L)*, 14 *tet(M)* geni saptanırken, hiçbir izolatta *tet(O)* geni saptanmadı.



M= Marker; P= Pozitif kontrol; N= Negatif kontrol

Şekil 4.8 *tet(K)* genini saptamaya yönelik PCR'ın agaroz jel elektroferez görüntüsü

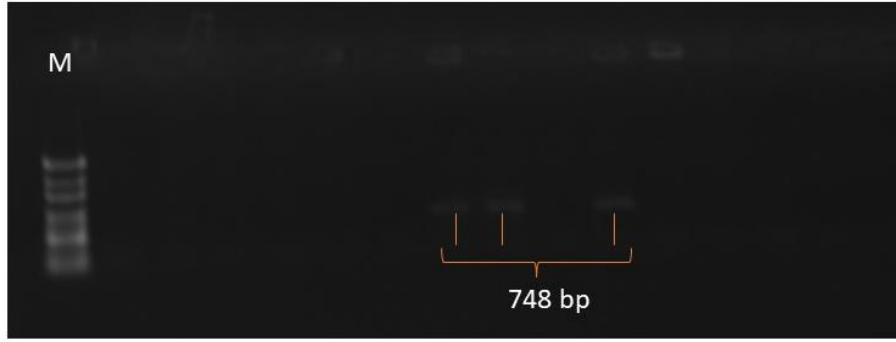


M= Marker; P= Pozitif kontrol; N= Negatif kontrol

Şekil 4.9 *tet(L)* ve *tet(M)* genlerini saptamaya yönelik PCR'ın agaroz jel elektroferez görüntüsü

#### 4.2.2.5. Kloramfenikol Direnci ile İlişkili Gen Bölgelerinin Saptanması

Fenotipik olarak kloramfenikol dirençli 15 izolata yapılan PCR çalışmasında, jel elektroferez sonucunda sırasıyla 748 bp ve 259 bp bant uzunluğu gösteren izolatlar *cat* (set 1) ve *cat* (set 2) pozitif olarak değerlendirildi. 3 izolatta *cat* (set 1) geni varlığı saptanırken, hiçbir izolatta *cat* (set 2) geni saptanmadı.

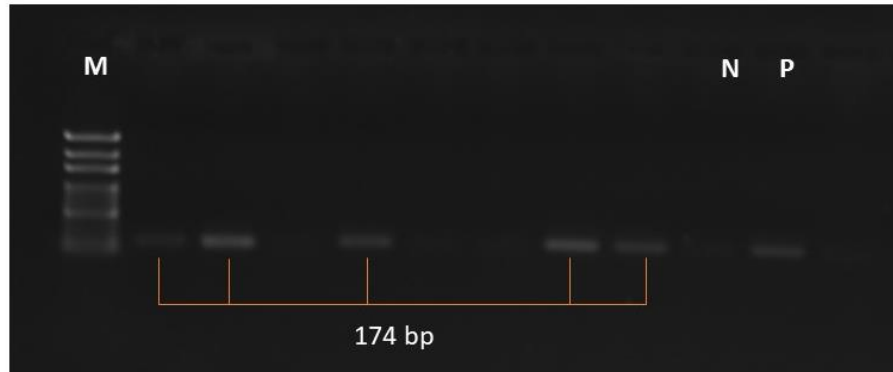


M= Marker

Şekil 4.10 *cat* (set 1) genini saptamaya yönelik PCR'ın agaroz jel elektroforez görüntüsü

#### 4.2.2.6. Gentamisin Direnci ile İlişkili Gen Bölgelerinin Saptanması

Fenotipik olarak gentamisin dirençli olarak belirlenen 7 izolata PCR yapıldı ve jel elektroforez sonucunda 174 bp bant uzunluğu gösteren 5 izolat *aac* (6')- *aph* (2'') pozitif olarak değerlendirildi.



M= Marker; P= Pozitif kontrol; N= Negatif kontrol

Şekil 4.11 *aac*(6')- *aph*(2'') gen bölgelerini saptamaya yönelik PCR'ın agaroz jel elektroforez görüntüsü

#### 4.2.2.7. *IS256* Gen Bölgesinin Saptanması

İzolatların hiçbirinde *IS256* gen varlığı saptanmadı.

### 4.3. Biyofilm Oluşturma Özelliğinin Saptanması

#### 4.3.1. Fenotipik Olarak Biyofilm Oluşturma Yeteneğinin Saptanması

##### 4.3.1.1. CRA Yöntemi ile Biyofilm Oluşturma Yeteneğinin Saptanması

CRA yöntemi tüm izolatlar yapıldı ve oluşan kolonilerdeki renk değişimine göre değerlendirildi. Siyah renkteki koloniler biyofilm pozitif, siyaha kaçan koyu renkte olan koloniler biyofilm zayıf pozitif ve kırmızı renkteki koloniler ise biyofilm negatif olarak değerlendirildi.

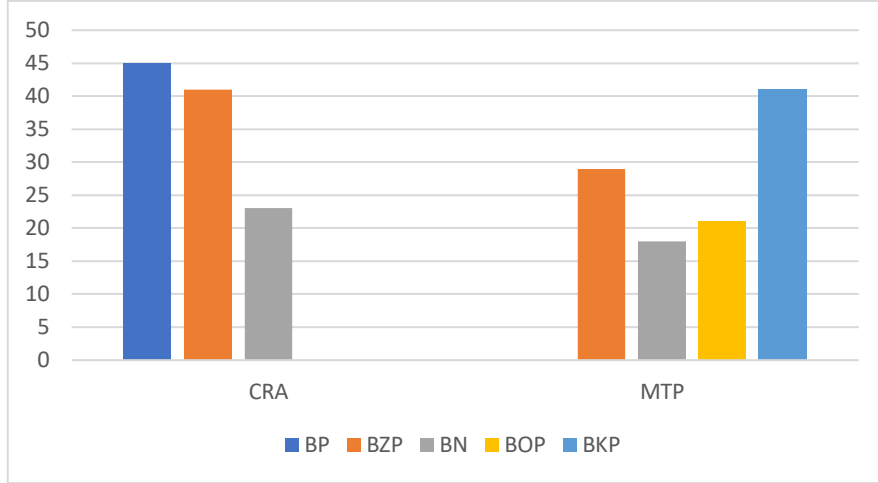
45 izolat (%41) biyofilm pozitif, 41 izolat (%38) biyofilm zayıf pozitif ve 23 izolat (%21) biyofilm negatif olarak değerlendirildi.



Şekil 4.12 CRA'da biyofilm pozitif ve negatif izolatların görünümü

##### 4.3.1.2. MTP ile Biyofilm Oluşturma Yeteneğinin Saptanmasının Sonuçları

Tüm izolatlar MTP testi yapıldı ve OD değeri  $\leq 0.065$  olan suşlar biyofilm oluşturmayan, OD değeri 0.065- 0.130 arasında olanlar zayıf biyofilm oluşturan, OD değeri 0.130- 0.260 arası olanlar orta derecede biyofilm oluşturan OD değeri  $> 0.260$  olan suşlar kuvvetli biyofilm oluşturan olarak değerlendirildi. 18 izolat (%16) biyofilm oluşturmayan, 29 izolat (%27) zayıf biyofilm oluşturan, 21 izolat (%19) orta derecede biyofilm oluşturan ve 41 izolat (%38) kuvvetli biyofilm oluşturan stafilokok olarak belirlendi (Şekil 4.13).



CRA: Congo Red Agar, MTP: Mikrotiter Plate Test, BP: Biyofilm pozitif, BZP: Biyofilm zayıf pozitif, BN: Biyofilm negatif, BOP: Biyofilm orta derecede pozitif, BKP: Biyofilm kuvvetli pozitif,

**Şekil 4.13 CRA ve MTP test ile biyofilm oluşturma yeteneğinin değerlendirilmesi sonuçları**

**Tablo 4.5 CRA ve MTP testleri ile biyofilm oluşturma yeteneğinin değerlendirilme sonuçlarının karşılaştırılması**

CRA	MTP			
	BN	BZP	BOP	BKP
BN	7	7	4	5
BZP	6	11	9	15
BP	5	11	8	21

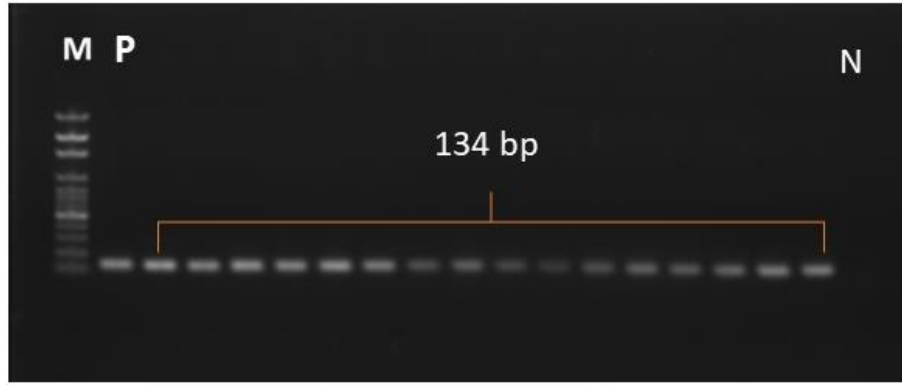
CRA: Congo Red Agar, MTP: Mikrotiter Plate Test, BP: Biyofilm pozitif, BZP: Biyofilm zayıf pozitif, BN: Biyofilm negatif, BOP: Biyofilm orta derecede pozitif, BKP: Biyofilm kuvvetli pozitif,

#### 4.3.2. Genotipik Olarak Biyofilm Oluşturma Özelliğinin İncelenmesi

Tüm izolatlara, *icaA* ve *icaD* gen bölgelerinin incelenmesi amacıyla spesifik primerler kullanılarak PCR yapıldı; jel elektroferez sonucunda sırasıyla 134 bp ve 166 bp bant oluşumu saptananlar pozitif olarak belirlendi.

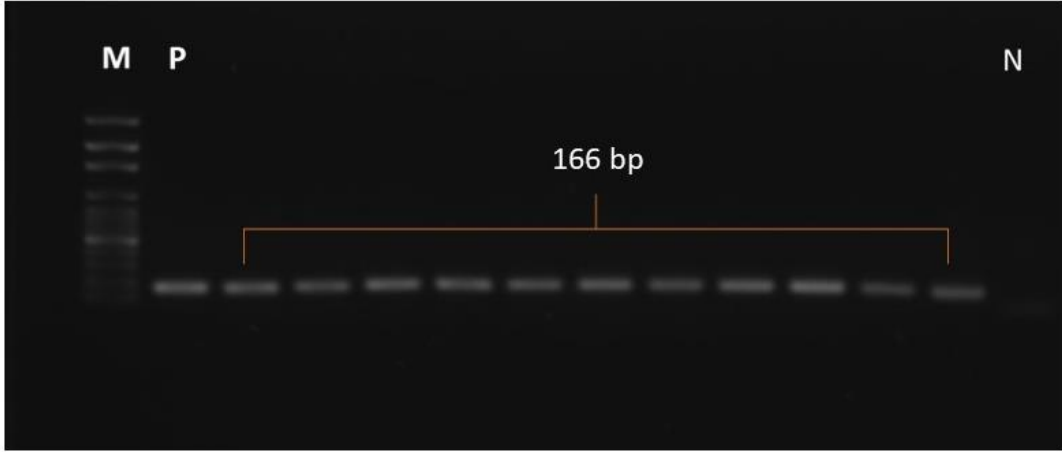
107 izolat *icaA* pozitif ve 2 izolat *icaA* negatif olarak saptandı. 107 izolat *icaD* pozitif ve 2 izolat *icaD* negatif olarak saptandı. *icaD* negatif olan izolatlarda *icaA*, *icaA* negatif olan 2 izolatta ise *icaD* varlığı belirlendi.

Biyofilm oluşturma özelliğinin değerlendirilmesinde kullanılan fenotipik yöntemlerde negatif olarak değerlendirilen izolatlarda *icaA* ve *icaD* genlerinin varlığı saptandı. CRA ve MTP testinde negatif olarak değerlendirilen 5 izolatta hem *icaA* hem de *icaD*, 1 izolatta yalnız *icaA* ve 1 izolatta da yalnız *icaD* varlığı saptandı.



M= Marker; P= Pozitif kontrol; N= Negatif kontrol

Şekil 4.14 *icaA* genini saptamaya yönelik PCR'ın agaroz jel elektroferez görüntüsü



M= Marker; P= Pozitif kontrol; N= Negatif kontrol

**Şekil 4.15 *icaD* genini saptamaya yönelik PCR'ın agaroz jel elektrofores görüntüsü**

CRA, MTP ve PCR'da biyofilm özelliği saptanmış bu üç yöntemin birbirleriyle karşılaştırması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (sırasıyla  $p=0,547$ ,  $p=0,437$ ,  $p=0,995$ ). Biyofilm oluşturma özelliği sabit ve çoklu ilaç direnci değişken olarak bir hipotez ve istatistik test kurgulandığında; iki grubun ortalama değerleri birbirinin aynı olduğundan testi gerçekleştirmek anlamsızdır. P değeri 1 çıkacaktır ve sonuç test daha gerçekleştirilmeden gözlenmektedir.

## 5. TARTIŞMA

Köpeklerde bakteriyel deri hastalıklarına sık rastlanır ve en yaygın görülen deri hastalıklardan birisi pyodermadır. Pyoderma papül, püstül ve vezikül gibi lezyonlardan oluşan derin, yüzeysel ve süperfisyel olarak üç kategoride değerlendirilen bir deri problemidir. Son yıllarda yapılan çalışmaların bakteriyolojik inceleme sonuçlarına göre köpeklerin deri, burun, ağız ve anüs bölgelerinde doğal olarak kolonize olan *Staphylococcus pseudintermedius*'un pyoderma olgularında en sık izole edilen tür olduğu bildirilmiştir (Diribe ve diğ., 2015, Bannoehr ve Guardabassi, 2012, Beck ve diğ, 2012, Proietti ve diğ, 2012, Stefanetti ve diğ, 2017, Lee ve Yang, 2019, Silva ve diğ, 2021). Bu tez çalışmasında fakülte kliniklerimizde sıklıkla karşılaşılan pyoderma olgularının etiolojisinin daha detaylı incelenebilmesi açısından pyoderma teşhis edilen köpeklerde *S. pseudintermedius* izolasyon oranlarının ve antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Ülkemizde *S. pseudintermedius* ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Barınakta yaşayan köpeklerde yapılan bir çalışmada, köpeklerin deri lezyonlarından alınan örneklerin %80,4'ünde *S. pseudintermedius* izolasyonu yapılmıştır (Sareyyüpoğlu ve diğ., 2014). Müştak ve diğ. (2020), deri enfeksiyonu olan 77 köpeğin 61'inde *S. pseudintermedius* izole etmiştir. Kıbrıs'ta pyoderma ve otit eksterna lezyonları olan kedi ve köpeklerden alınan örneklerden yapılan çalışmada; pyoderma lezyonlarından %42, otit eksterna vakalarının da %18'inden *S. pseudintermedius* ile izole edilmiştir (Tamakan, 2022). Yapılan başka bir tez çalışmasında sağlıklı ve hasta köpeklerden örnekler alınıp MALDI-TOF ile identifikasyonu sonucu sağlıklı hayvanlarda %86,5 ve hasta hayvanlarda %77,2 oranında *S. pseudintermedius* izole edilmiştir (Kurnaz, 2022). Bu çalışmada klinik olarak pyoderma tanısı konulan 205 köpekten, 109 (%53,17) *S. pseudintermedius* izole edildi. Ülkemizde yapılan diğer çalışmaların verileri ile kıyaslandığında bu çalışmadaki izolasyon oranı daha düşüktür. Fakat bu durum köpeklerin yaşayış şekli ve lezyonların karakterize olduğu bölgeler ile oldukça ilişkilidir. Barınakta yaşayan köpeklerden yapılan çalışmada *S. pseudintermedius* izolasyon oranının yüksekliği durumunu göz önüne aldığımızda, bu çalışmada da pyoderma tanısı konan köpeklerin %71,2 (n=146)'sinin dışarıda yaşayan köpeklerde olduğunu ve bu sınıflandırma baz alınarak değerlendirildiğinde bu hayvanlardaki *S. pseudintermedius* izolasyon oranının %73,4 (n=80) olduğu da görülmektedir. Önceki çalışmalarda pyoderma vakalarında en sık izole edilen

bakterilerden biri olan (Bannoehr ve Guardabassi, 2012; Beck ve diğ., 2012; Proietti ve diğ., 2012; Stefanetti ve diğ., 2017; Lee ve Yang, 2019; Silva ve diğ., 2021) SP'nin bizim çalışmamızda da pyoderma vakalarındaki varlığının önemi istatistiksel olarak kanıtlanmıştır. Derideki lokalizasyonuna göre pyoderma olguları; yüzeysel (surface), superfisyel (yüzeğe yakın) ve derin pyoderma olarak 3 sınıfa ayrılmaktadır. Derinin en dış tabakası olan epitel tabakayı etkileyen yüzeysel (surface) pyodermaya örnek olarak akut ıslak dermatit ve deri kıvrım dermatiti (intertrigo) verilebilir. Bu pyoderma türünde bakterilerin çoğalması deri yüzeyi ile sınırlıdır ve oluşumunu genellikle immun sistemin baskılanması etkilemektedir (Leoffler ve Llyod, 2018). Superfisyel pyodermada derinin epidermis tabakası ve kıl folikülleri etkilenir ancak kıl foliküllerinin yapısına zarar vermez. Superfisyel pyoderma türlerinde lezyonların karakteri genel olarak empetigo, mukokutanöz pyoderma, yüzeysel yayılan pyoderma ve yüzeysel folikülit ile tanımlanabilir. Superfisyel pyodermanın primer nedeni sağlıklı bireylerin derilerinde kolonize olan patojen stafilokoklardır; bu etkenlerin köpeklerin kutanöz ve mukozal floralarında da yer alan endojen stafilokok suşları olduğu belirtilmektedir (Bloom, 2014; Pinchbeck ve diğ., 2006, Sasaki ve diğ., 2004). Son olarak enfeksiyonun en derin tabaka olan dermise yayılması ile karakterize olan derin pyoderma, genellikle superfisyel pyodermanın devam etmesi ile gelişir ve bu pyoderma türünde kıl folikülleri de hasar görür (Rhodes, 2011).

Pyodermanın gelişimi ve bu lezyonların oluşumuna etki eden predispoze faktörler sistemik immun yetersizlik, travma, foliküler hasar, deri hasarı ve uygun olmayan antibakteriyel ajanlarla tedavi olarak belirtilmektedir (Rhodes, 2011). Tüm bu faktörlerin yanında köpeklerde pyodermaya neden olan bakteriyel etkenler arasında en yaygın tür *S. pseudintermedius*'tur (Devriese ve diğ., 2005, Sasaki ve diğ., 2007, Bannoehr ve Guardabassi, 2012, Beck ve diğ., 2012, Proietti ve diğ., 2012, Diribe ve diğ., 2015, Stefanetti ve diğ., 2017, Lee ve Yang, 2019, Silva ve diğ., 2021). *S. schleiferi* ve *S. aureus* diğer yaygın türler arasındadır (Rhodes, 2011, Nakaminami ve diğ., 2020). Derin ve superfisyel pyoderma tanısı konulan köpeklerden yapılan bir çalışmada %30 *Pseudomonas aeruginosa* izole edilmiş olup; miks enfeksiyonlarda sıklıkla stafilokoklar, *E. coli* ve *Enterobacter spp.* izole edilmiştir (Hiller ve diğ., 2006). Bununla birlikte derin pyoderma lezyonlarının *E. coli*, *Proteus spp.* ve *Pseudomonas spp.* gibi Gram negatif bakteriler tarafından komplike hale gelebildiği bildirilmiştir (Rhodes, 2011). Bu tez çalışmasının amacı *S. pseudintermedius* izolasyon oranlarını belirlenmesi olduğundan diğer bakteri türlerinin tanımlaması yapılmadı. Bununla birlikte örnek alınan hayvanlar, lezyonların karakterleri ile pyoderma türleri yönünden kategorize edildi. Yüzeysel pyoderma saptanan 27

köpeğin 20 (%74,07)'sinden; süperfisyel pyoderma saptanan 123 köpeğin 65 (%52,9)'inden, derin pyoderma saptanan 31 köpeğin de 22 (%71)'sinden *S. pseudintermedius* izole edildi. Yapılan istatistiki değerlendirme sonucuna göre de SP'nin varlığının pyoderma türleri arasında süperfisyel pyoderma oluşumuna etkisi anlamlı bulundu.

Yapılan çalışmalarda *S. pseudintermedius* izolasyonun yapıldığı pyoderma lezyonlarının bulunduğu bölgeler genellikle gövde, ekstremiteler ile özellikle patiler, yüz bölgesi ve koltuk altı olmuştur (Scott ve diğ., 1994, Murayama ve diğ., 2010, Bannoehr ve Guardabassi, 2012). Sağlıklı hayvanlarda yapılan çalışmalarda izolasyon oranını arttırmak amacıyla *S. pseudintermedius* için duyarlı bölgeler olarak bildirilen perineum, anterior, burun, ağız ve inguinal bölgeler de tercih edilmiştir (Iverson ve diğ., 2015, Ma ve diğ., 2020, Lynch ve diğ., 2021). Bu çalışmada lezyonların bulunduğu bölgeler dikkate alındığında *S. pseudintermedius* izolasyonunun en sık (%36) yapıldığı bölgenin, ekstremiteler olduğu görüldü. Vakalarda kaşıntının ekstremitelerde lokalize olması ve bu bölgeleri yalaması self travma sonucu etken izolasyonunun artmasına sebep olduğu düşünülmektedir.

Tüm dünyanın etkisinde olduğu, çağımızın en önemli halk sağlığı problemi olan antibiyotik direnci; tarım endüstrileri de dahil olmak üzere özellikle beşeri ve veteriner hekimliği olumsuz anlamda oldukça etkileyen bir durumdur (CDC, 2022). Son yıllarda gereksiz ya da yanlış antibiyotik kullanımının artışı ve ekonomik faktörlerin de etkisiyle antibiyotiklere dirençli bakterilerin yayılması hızlanarak tedavi protokollerinde kısıtlamalara sebep olmuştur (Mancuso ve diğ., 2021). Her yıl dünya çapında en az 700.000 birey antimikrobiyal direnç sebebiyle hayatını kaybetmektedir ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) öngörülerini doğrultusunda yeni tedavi yöntemleri bulunmaması sonucu bu değerlerin 2050 yılında 10 milyona ulaşacağını bildirmiştir. WHO 2017 yılında ESKAPE kısaltması ile direnç gelişiminin belirlendiği en önemli patojenleri listelemiştir. Bu patojenler; *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter* spp. dir (WHO, 2017).

Yapılan farklı çalışmalarda SP izolatlarında sıklıkla penisilin, gentamisin, tetrasiklin, oksasilin, klindamisin, eritromisin, trimetoprim sulfametoksazol ve doksisisiklin dirençleri göze çarpmaktadır (Kim ve diğ., 2005, Schwarz ve diğ., 2007, Yoon ve diğ., 2010, Rubin ve diğ., 2011, Proietti ve diğ., 2011, Kang ve diğ., 2014, Scherer ve diğ., 2018, Park ve diğ., 2018, M.M. van Damme ve diğ., 2020, Müştak ve diğ., 2020, Wang ve diğ., 2022). Bu çalışmada da penisilin (%55), sulfisoksazol (%45,9), tetrasiklin (%37,6) ve doksisisiklin (%29,3) direnci en sık karşılaşılan direnç olarak dikkat çekmekteydi. European Medicine Agency (EMA)'nin

2019'da yayınladığı bildiride, tek sağlık çatısı altında beşeri ve veteriner hekimlikte kullanılan antibiyotikleri dört kategoride listelemiştir. Bu kategoriler A (Avoid), B (Restrict), C (Caution) ve D (Prudence) şeklinde olup; A kategorisindeki antibiyotiklerin özellikle gıda hayvanlarında asla tercih edilmemesi eşlikçi hayvanlarda ise istisnai durumlarda kullanılması önerilmektedir. D kategorisindeki antibiyotikler ise veteriner hekimlikte tedavi amacıyla birincil aşamada kullanılması önerilen antibiyotiklerdir ve bu çalışmada en çok direnç gelişimi saptanan antibiyotikler de bu kategoride yer almakta olduğu dikkat çekicidir.

Hastane enfeksiyonlarının başında gelen stafilokoklarda antibiyotik direnci, etkenlerin birçoğunun zoonoz özelliğinden de dolayı oldukça önemlidir. Stafilokoklarda birçok antibiyotik ajanına direnç bildirilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalara bakıldığında ilk sırada metisilin ve ardından vankomisin direnci stafilokoklarda dikkat çekecek oranda artış göstermiştir (Urban ve diğ., 2022, John, 2020, CDC 2022). 1950'li yıllarda penisiline dirençli stafilokokların tedavisi amacıyla kullanımına başlanan metisiline çok kısa sürede direnç gelişimi gözlemlenmiştir ve 1961 yılında ilk metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) izole edilmiştir. Ülkemizde de çeşitli hayvan türlerinde MRSA varlığı ve taşıyıcılığının araştırıldığı çalışmalar mevcuttur (Bağcıgil ve diğ., 2012, Kurnaz, 2022, Abughonem, 2022, Göçmen ve diğ., 2020) ve MRSA dışında birçok koagülaz negatif stafilokokta da metisilin direnci bildirilmiştir (Kurnaz, 2022, Göçmen ve diğ., 2020, Bağcıgil ve diğ., 2012). Ülkemizde dermatitli köpeklerden izole edilen ilk MRSP 2014 yılında bildirilmiştir (Sareyyüpoğlu ve diğ., 2014). Birçok farklı hayvan türünde ve ülkede stafilokoklarda gelişen metisilin direnci her geçen gün daha çok artmaktadır (CDC 2022). Beta-laktamaz enzimiyle hidrolize olmayan beta-laktam antibiyotiklere karşı oluşan direnç olarak tanımlanan metisilin direnci, penisilin bağlayıcı protein üretimini destekleyen *mecA* ile homologları olan *mecB* ve *mecC* genleri tarafından kodlanmaktadır (Moodley ve diğ., 2009, Becker ve diğ., 2018).

*S. pseudintermedius*'ta metisilin direnci fenotipik olarak oksasiline olan direnç ve/veya, genotipik olarak *mecA* geninin saptanması ile belirlenmektedir (CLSI). Bu çalışmada 109 izolata yapılan disk difüzyonu sonucunda, 9 izolat (%8,2) metisilin dirençli olarak saptandı. Ancak bu izolatların hiçbirinde *mecA* geni saptanmadı. Tüm izolatlar *mecA* yönünden incelendiğinde de 6 izolat *mecA* pozitif olarak belirlendi. Öztürk ve diğ. (2010) çalışmalarında fenotipik olarak metisilin direnci belirledikleri MRSA (%12,1) ve MRSI (%4,8) izolatlarında benzer şekilde *mecA* geni saptamamıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, *mecA* pozitif SP izolatlarında fenotipik olarak oksasilin ve sefoksitin direncinin karşılaştırması üzerine

yoğunlaşmıştır. CLSI ve EUCAST'ta *S. pseudintermedius*'un metisilin direncinin fenotipik olarak belirlenmesinde önerilen antibiyotiğin oksasilin olmasına rağmen yapılan çalışmalarda karşılaşılan uyumsuz sonuçların varlığı ve sefoksitin kullanımında daha duyarlı sonuçların elde edilmesinden dolayı belirteç olarak seçilen antibiyotiğin ya da zon çaplarının güncellenmesi önerilmektedir (Skov ve diğ., 2020, Gupta ve diğ., 2022). Platenik ve diğ. (2022) yapmış olduğu çalışmada da *mecA* geni saptanan SP izolatları oksasilin duyarlı ve sefoksitin dirençli olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada *mecC* değerlendirilmesi önerilmiş fakat çalışmada *S. pseudintermedius* izolatlarında *mecC* geni saptanmamıştır, bu durumu seçilen primerin *S. aureus*'a uygun olup diğer stafilokok türleri için en iyi seçim olamayacağı ve SP'nin yüksek oranda genetik değişkenlik gösterdiği yönünde açıklamıştır. Kurnaz (2022) çalışmasında beta-laktam grubu antimikrobialerin duyarlılıklarının belirlenerek tedavi protokolünün belirlenmesi aşamasında yalnızca fenotipik yöntemler değil, genotipik yöntemler de kullanılarak değerlendirilmesini önermiştir.

Kang ve diğ. (2014) yapmış oldukları çalışmada 50 *S. pseudintermedius* izolatının 18'inde *mecA* geni belirlemiştir. Ayrıca bir izolatta metisilin direnci belirlenmiş ancak *mecA* geni saptanmamıştır (Kang ve diğ., 2014), benzer şekilde Nakaminami ve diğ. (2021) pyodermal köpeklerden yaptığı çalışmada %34,1 oranında MRSP saptamıştır ve aynı çalışmada 5 SP izolatı oksasiline dirençli fakat *mecA* negatif olarak belirlenmiştir. Bu durumda alternatif olarak başka bir antibiyotik direnç geni tarafından üretilen  $\beta$ -laktamaz veya PBPs'nin fazla üretimini, *mecA* geninin yokluğunda bakterilerin oksasilin benzeri  $\beta$ -laktam antibiyotiklere direnç göstermesine sebep olduğunu ifade etmişlerdir (Kang ve diğ., 2014). Bu çalışmada da oksasilin dirençli 6 izolatta *mecA* geni belirlenmezken *blaZ* gen varlığı saptanmıştır.

Menandro ve diğ., (2019) yapmış oldukları çalışmada izolatların %31,6'sı ve Scherer ve diğ. (2018) ise %27,6'sını MRSP olarak belirlemiş olup, bu izolatlarda *mecA* pozitifliği saptamışlardır. Kıbrıs'ta otit eksterna ve deri problemleri olan kedi ve köpeklerden alınan örneklerden yapılan çalışmada, metisilin direnci değerlendirilmesi amacıyla PCR yöntemiyle *mecA* geni %10 oranında bildirilirken bu oran VITEK 2 otomatize sistem cihazı ile yapılan değerlendirmede %6,7 olarak saptanmıştır (Tamakan ve Gocmen, 2022). Kıbrıs'ta yapılan bu çalışma genotipik ve fenotipik değerlendirme yöntemlerinin değerlendirilmesinde karşılaşılan farkları göz önüne koymaktadır.

Stafilokoklarda antibiyotik direnç gelişimi sıralamasında ilk sıralarda yer alan diğer önemli antibiyotik grubu ise beta laktam grubu antibiyotiklerdir. Bu çalışmada beta-laktam

grubundaki antibiyotiklerden penisilin direncinin fenotipik olarak değerlendirilmesi sonucunda 60 (%55) izolatta direnç saptanırken bu 60 izolatin 53'ünde *blaZ* geni varlığı belirlendi. Milano'da yapılan çalışmada, *mecA* geni pozitif olan tüm izolatların aynı zamanda *blaZ* genini de barındırıyor olduğu belirlenmiştir (Nocero ve diğ., 2020). Bu çalışmada da *mecA* geni olan 5 izolatta ve disk difüzyon yöntemi ile metisilin direnci saptanan 9 izolatin 6'sında da *blaZ* gen varlığı belirlendi. Ankara'da yapılan bir çalışmada %40,9 penisilin dirençli izolat belirlenirken *blaZ* gen varlığı da aynı oranda saptanmıştır (Müştak ve diğ., 2020). Silva ve diğ. (2021), tüm MRSP izolatlarının fenotipik olarak penisilin dirençli olduklarını ve yalnızca bir izolat hariç tamamında *blaZ* geninin saptandığını bildirmiştir. Almanya'da yapılan çalışmada SP izolatlarının %85,4'ü penisilin dirençli olarak değerlendirilmiş ve bu izolatların 30'unda *blaZ*, 4 izolatta hem *blaZ* hem *mecA* ve bir izolatta da sadece *mecA* gen varlığı saptanmıştır (Febler ve diğ., 2022).

Florokinolon grubu antibiyotiklerden difloksasin, enrofloksasin, marbofloksasin ve orbifloksasin tüm dokulara iyi penetre olabildikleri için özellikle süperfisyel pyoderma tedavisinde önerilmektedir (Mueller ve Stephan, 2006; Cengiz M. 2021). Ülkemizde pyoderma olgularında öncelikli olarak tercih edilen antibiyotiklerin arasında da marbofloksasin ve enrofloksasin gelmektedir (DokuzeYLül B. ve Koenhemi L, kişisel görüşmeler 2022). Bu tez çalışmasında 5 izolat (%4,6) difloksasin dirençli olarak belirlendi. Benzer şekilde aynı 5 izolat enrofloksasin, marbofloksasin ve orbifloksasine de dirençli olarak saptandı. İzolatlardan üçünde *mecA* geni saptanırken, diğeri iki izolatta fenotipik olarak oksasilin direnci belirlendi. Bununla birlikte yapılan antibiyotiplendirme değerlendirmesi ile florokinolonlara dirençli bu beş izolat MDR olarak sınıflandırıldı. Matanovic ve diğ. (2012) çalışmasında %5,66 oranında enrofloksasin direnci saptamış ve bu tez çalışmasına benzer şekilde tüm enrofloksasin dirençli izolatları MDR- MRSP olarak değerlendirmiştir. Aynı şekilde Kore'de pyodermalı ve otit eksternalı köpeklerden yapılan bir çalışmada da florokinolon dirençli *S. pseudintermedius* suşları MDR olarak belirlenmiştir (Yoo ve diğ., 2009).

Folat yolu inhibitörü olan ve CLSI'nın sulfonamid grubundaki antibiyotiklerin temsilcisi olarak belirtmiş olduğu sulfisoksazole direnç, bu tez çalışmasında 50 izolatta (%45,9) belirlendi. Bu çalışmada penisilinden sonra en çok direncin saptandığı antibiyotik sulfisoksazol olarak değerlendirildi. Sulfonamidler köpeklerde pyoderma, otit, prostatit, üriner sistem enfeksiyonları ile atipik bakteriyel enfeksiyonlarda kullanılmaktadır (Trepanier ve diğ., 2003). Köpeklerden izole edilen stafilokoklarda sulfisoksazole direnci ile ilgili güncel çalışma olmamakla birlikte diğeri hayvan türlerinden ve köpeklerden izole edilen farklı bakteri

türlerinde (özellikle *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli*) bu direnç incelenmiştir (Chen ve diğ., 2021, Liu ve diğ., 2020, Courtice ve diğ., 2021, Rubin ve diğ., 2008). Pyoderma tedavisinde sulfonamid grubundan gümüş içerikli sulfadiazine lokal olarak kullanımda önerilmektedir (Valentine, 2019). Krem formundaki bu preparatın veteriner hekim kullanım önerileri dışında, hasta sahiplerinin kolaylıkla ulaşabileceği birimlerde de satışı bulunmaktadır. Bununla birlikte kedi ve köpeklerde kullanımı önerilen trimetoprim sülfametoksazole başka bir sulfonamid türevidir (Yarsan, 2017, Kadlec ve Schwarz, 2012). Tayland’da köpeklerden izole edilen MRSP izolatlarında %73,33 gibi yüksek bir oranda trimetoprim direnci belirlenmiştir (Jantorn ve diğ., 2021). Sulfonamid grubunda oluşabilen çapraz direnç gelişimini ve aktarımını ele aldığımızda, bu çalışmadaki direnç varlığı sulfisoksazol direkt olarak hastada kullanılsa da sulfonamid grubundan diğer antibiyotiklerin kullanımı sonucunda oluşabileceğini düşündürmektedir (Eliopoulos ve diğ., 2001, Prescott, 2013).

MRSP izole edilen bir pyoderma olgusunda, klindamisin antibiyotik duyarlılık testi sonucunda duyarlı olarak saptandıysa, tedavi için iyi bir seçim olarak değerlendirilmektedir (Frank ve Loeffler, 2016). Hollanda’da köpeklerde süperfisyel pyoderma tedavisinde de ilk sırada ampirik tedavi amacıyla klindamisin kullanıldığı belirtilmiştir (M.M. van Damme ve diğ., 2020). Ülkemizde de kedi ve köpeklerdeki stafilokok enfeksiyonlarında klindamisin kullanımı önerilmektedir (Yarsan, 2017). Bu çalışmada linkozamid grubu antibiyotiklerden klindamisin duyarlılığının değerlendirilmesi sonucunda 20 izolat (%18,3) dirençli olarak belirlendi. M.M. van Damme ve diğ. (2020)’nın yaptıkları bir çalışmada, papül ve püstüllerden alınan sürüntü örneklerinden izole edilen MSSP izolatlarında %37,7 oranında klindamisin direnci saptanmıştır. Danimarka ve İsveç’te yapılan çalışmalarda sistemik antibiyotik geçmişi olan ve tedavi geçmişi bilinmeyen hastalarda yapılan değerlendirmelerde %30’ un altında klindamisin direnci bildirilmiştir. Bununla birlikte sistemik antibiyotik geçmişi olmadığı bildirilen hastalardan ve ilk kez pyoderma tanısı konulan köpeklerden izole edilen SP değerlendirilmesinde ise daha düşük (%13-14) oranlarda klindamisin direnci saptanmıştır ve çoklu antibiyotik direncini ise en çok tekrarlayan pyoderma vakalarında bildirmişlerdir (Larsen ve diğ., 2015, Holm ve diğ., 2002). Bu çalışmada da klindamisin dirençli olarak belirlenen izolatların %60’ı (n=12) antibiyotik tedavi geçmişi olan hastaları oluşturmaktadır.

Makrolid grubu antibiyotiklerden eritromisin, Gram pozitif bakteriler kaynaklı enfeksiyonlarda özellikle penisilin alerjisi olan hayvanlarda alternatif olarak kullanılmaktadır (Cengiz M, 2021). Bu çalışmada 18 izolat (%16,5) eritromisin dirençli olarak belirlendi. Hem orta duyarlı hem de dirençli saptanan izolatlarda, stafilokoklarda makrolid direnci ile ilişkili

gen bölgeleri olan *ermA*, *ermB*, *ermC* gen bölgeleri araştırıldı ve 15 izolat *ermB* pozitif ve 1 izolat *ermC* pozitif olarak saptandı. *ermC* pozitif olan izolat aynı zamanda *ermB* pozitif olarak saptandı. İncelenen 30 izolatın hiçbirinde *ermA* geni saptanmadı. Napoli'de yapılan çalışmada fenotipik değerlendirmelerde eritromisine dirençli olan tüm suşlarda *ermB* geni saptanmıştır (Nocero ve diğ., 2020). Almanya'da yapılan bir çalışmada 41 *S. pseudintermedius* izolatının %19,5'i makrolid dirençli olarak saptanmış ve bu makrolid direnci belirlenen izolatların 5'inde *ermB*, 3'ünde hem *ermB* hem de *ermC* geni saptanmıştır (Febler ve diğ., 2022). Japonya'da yapılan bir çalışmada deriden izole edilen 28 MRSP izolatının %89,3'ü eritromisin dirençli olarak değerlendirilirken 5 izolatta *ermB* geni belirlenmiştir (Nakaminami ve diğ., 2021). Aynı çalışmada izole edilen MSSP izolatlarında ise %40,9 eritromisin direnci saptanmıştır. Bu tez çalışmasında da diğer çalışmalarla benzer şekilde, eritromisin direnci ile ilgili baskın olarak *ermB* geni saptandı.

Bu çalışmada mikrobiyal protein sentezinin potent inhibitörü olan kloramfenikol için yapılan incelemede 15 izolat (%13,7) kloramfenikol dirençli olarak belirlendi. Bununla birlikte bu 15 izolata yapılan PCR sonucunda 3 izolatta *cat* (set 1) geni varlığı saptanırken, hiçbir izolatta *cat* (set 2) geni saptanmadı. Almanya'da yapılan bir çalışmada kloramfenikol direnci olan bir izolatta *cat* genine rastlanmamıştır (Schwarz ve diğ., 2007). Menandro ve diğ. (2019) çalışmasında ise *cat* gen varlığı yalnızca 5 MRSP izolatında belirlenmiştir. Bu çalışmada da benzer şekilde *cat* gen varlığı düşük oranda saptanmıştır. Japonya'da yapılan bir çalışmada MSSP izolatlarında %14,8 ve MRSP izolatlarında %60,7 oranında kloramfenikol direnci saptanmıştır (Nakaminami ve diğ., 2021). Japonya'daki çalışmanın verileri ile karşılaştırıldığında aksi şekilde bu çalışmada fenotipik MRSP izolatlarında kloramfenikol direnç oranı (%20) düşüktür, bununla birlikte *mecA* pozitif SP izolatlarında ise bu oran %33,3'tür.

Tetrasiklin grubu antibiyotiklerin duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla fenotipik olarak doksisisiklin ve tetrasiklin antibiyotikleri incelenmiştir. Bu tez çalışmasında 32 izolat (%29,3) doksisisiklin dirençli olarak belirlendi. Hollanda'da yapılan bir çalışmada (M. M. van Damme ve diğ., 2020) da %30,1 oranında doksisisiklin direnci belirlenerek, çalışmamız ile benzer değerler saptanmıştır. Bununla birlikte bu çalışmada 41 izolat (%37,6) tetrasiklin dirençli olarak belirlendi. Penisilin ve sulfisoksazolden sonra en çok direnç belirlenen antibiyotik tetrasiklin olarak değerlendirildi. Ülkemizde yapılan bir tez çalışmasında %48,2 oranında tetrasiklin direnci saptanmış ve çalışmadan izole edilen diğer stafilokoklara göre en dirençli türün SP olduğu belirtilmiştir (Kurnaz, 2022). Kore'de yapılan bir çalışmada ise %91,9

oranında belirlenen tetrasiklin direnci ülkemizdeki veriler ile kıyaslandığında oldukça yüksek oranda bildirilmiştir (Yoon ve diğ., 2010).

Stafilokoklarda tetrasiklin direnci dört gen tarafından kodlanmaktadır. *tet(K)* ve *tet(L)* genleri temel olarak plasmidde, *tet(M)* ve *tet(O)* genleri kromozom üzerinde bulunur, *tet(L)* aynı zamanda kromozomda da bulunabilir. Bu çalışmada da tetrasiklin direncini genotipik olarak belirlemek amacıyla bu gen bölgeleri incelendi. Bu çalışmada 5 *tet(K)*, 1 *tet(L)*, 14 *tet(M)* geni saptanırken, hiçbir izolatta *tet(O)* geni saptanmadı. Çalışma sonucuna benzer şekilde Kore’de yapılan çalışmada da *tet(O)* geni saptanmamıştır (Kim ve diğ., 2005). Aynı çalışmada *S. intermedius* izolatlarının %97’sinde *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)* genlerinden en az biri saptanmıştır (Kim ve diğ., 2005). Maaland ve diğ. (2013) tetrasikline dirençli 70 izolatın 66’sında yalnızca *tet(M)*, 2 izolatta yalnızca *tet(K)*, bir izolatta *tet(O)* ve bir izolatta ise hem *tet(K)* hem *tet(M)* genlerini saptamışlardır. *tet(M)* geninin yaygın olduğunu belirtmişler ve bununla birlikte *tet(O)* geninin ise Gram pozitif türler içerisinde stafilokoklarda daha nadir olduğu, daha sık olarak streptokok ve enterokoklarda bulunduğu belirtilmiştir. Belirtilen veriler, bu çalışmada da *tet(O)* geni saptanmaması durumunu destekler niteliktedir.

Milano ve Napoli’de yapılan bir çalışmadaki MRSP ve MSSP izolatlarında değişen oranlarda *tet(K)* ve *tet(M)* gen varlığı belirlenmiştir, özellikle *tet(M)* geninin MSSP izolatlarındaki oranları (%81,2 ve %46,1) daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Nocera ve diğ., 2020). Bu çalışmada tetrasiklin direnci fenotipik olarak saptanmış olan izolatların %14,63’ünde fenotipik olarak metisilin direnci de saptanmıştır.

Feßler ve diğ., (2022), Almanya’da yapmış oldukları çalışmada köpeklerden izole edilen 41 *S. pseudintermedius* izolatının %24,4’ünü tetrasiklin dirençli olarak değerlendirmiş ve 9’unda *tet(M)*, bir tanesinde ise *tet(K)* geni belirlemiştir. Japonya’da yapılan bir çalışmada ise 28 MRSP izolatlarının değerlendirilmesinde 17 *tet(M)* ve 2 *tet(K)* geni belirlenmiştir (Nakaminami ve diğ., 2021). Yapılan çalışmalarda dikkat çekici oranda *tet(M)* gen varlığı diğer gen gruplarına kıyasla daha yüksek oranda belirlenmiştir, bu durum çalışmamızdaki verileri destekler nitelikte olup aynı zamanda *tet(M)* geni tespit edilen izolatların %7,14’u MRSP’dir. Bununla birlikte bu çalışmada *tet(K)*, *tet(L)* ve *tet(M)* genlerinin birlikte bulunduğu 1 izolatta, fenotipik olarak MRSP olmamasına rağmen *mecA* ve *blaZ* genlerinin ikisi de saptanmıştır.

Bu çalışmada fenotipik olarak yapılan değerlendirmede disk difüzyon yöntemi ile aminoglikozid grubu antibiyotiklerden olan gentamisine dirençli 7 izolat (%6,4) belirlendi. Bu 7 izolata yapılan PCR sonucunda 5 izolat *aac (6’)- aph (2’)* pozitif olarak saptandı. Ülkemizde kedi ve köpeklerden yapılan bir tez çalışmasında SP izolatlarının %21,8’i gentamisin dirençli

olarak bildirilmiştir (Kurnaz, 2022). Nocera ve diğ (2020) nin çalışmasında gentamisin direnci oranları iki farklı hastanede %48,5 ile %52,2 olarak sptanmış, gentamisin direnci *aacA-aphD* gen bölgesinin varlığı ile doğrulanmıştır (Nocero ve diğ, 2020). Almanya’da yapılan çalışmada *aacA- aphD* gen bölgeleri iki orta dirençli ve iki dirençli izolatta saptanmıştır (Feßler ve diğ., 2022). Japonya’da yapılan bir çalışmada ise izole edilen 28 MRSP izolatın %46,4’ü gentamisin dirençli olarak belirlenmiş olup 25 izolatta da *aacA-aphD* gen varlığı saptanmıştır (Nakaminami ve diğ, 2021). Aynı çalışmada izole edilen MSSP izolatlarında ise %7,4 oranında gentamisin direnci belirlenmiştir. Bu çalışmada ise izole edilen 9 MRSP izolatının yalnız bir tanesi ve *mecA* pozitif izolatlardan 2 tanesi gentamisin dirençli olarak belirlendi. Bununla birlikte fenotipik olarak gentamisin dirençli ve *mecA* pozitif izolatta *aac (6’)- aph (2’)* gen bölgesi de saptandı.

Bu tez çalışmasında 36 izolat, 3 ve daha fazla antibiyotik grubuna dirençli olarak değerlendirildi. Çoklu antibiyotik direnci 24 antibiyotikte saptandı (Tablo-xx). En fazla 12 antibiyotiğe dirençli 2 izolat, en az 3 antibiyotiğe dirençli ise 6 izolat belirlendi. Çoklu antibiyotik direnci belirlenen izolatların %19,44’u fenotipik MRSP ve 4 izolat *mecA* pozitif. Bununla birlikte tüm çoklu antibiyotik direnci olan izolatlar penisilin dirençli olarak saptanmış olup, sulfisoksazole yalnız bir izolat orta duyarlı olup diğer izolatlar dirençli olarak belirlendi. Bu iki antibiyotikten sonra gözardı edilemeyecek kadar çok (%91,6) direnç saptanan antibiyotik grubu ise tetrasiklinlere gelişen dirençti.

Yapılan son çalışmalarda *S. pseudintermedius* zoonotik bakteri ve bazı izolatları çoklu antibiyotik direncine sahip olarak adlandırılmaktadır. 2020 yılında Arjantin’de bir insanın kemik dokusundan ilk *mecA* pozitif ve çoklu antibiyotik dirençli MRSP izole edilmiştir (Gagetti ve diğ., 2020). Wang ve diğ. (2022), yapmış oldukları çalışmada keratitli hayvanlardan elde ettikleri 5 izolatı çoklu antibiyotik direncine sahip olduğunu belirlemiştir. Stafilokoklardaki çoklu antibiyotik direnci oranının belirlenmesi amacıyla kedi ve köpeklerde yapılmış olan ülkemizdeki bir çalışmada çoklu antibiyotik dirençli 6 MRSP ve 8 MSSP saptanmıştır (Göçmen ve diğ., 2020). Aynı çalışmada çoklu antibiyotik dirençli MRSP izolatlarının penisilin ve tetrasiklin dirençli oldukları da belirtilmiş olup bu tez çalışmasındaki verileri desteklemektedir. İspanya ve Portekiz’de yapılan bir çalışmada süperfisyel bakteriyel follikülit tanısı konulan köpeklerden elde edilen MRSP izolatlarının %79’u ve MSSP izolatlarının ise %21’i çoklu antibiyotik direnci karakterinde saptanmıştır (Oliveria ve diğ., 2018). Aynı çalışmada çoklu antibiyotik direncine sahip olmayan izolatların tamamı ise MSSP

olarak değerlendirilmiştir ve bu tez çalışmasındaki veriler ile benzer nitelikte olmayıp fenotipik MRSP 2 izolat ve *mecA* pozitif 2 izolat çoklu antibiyotik direnci karakterinde belirlenmedi.

Kang ve diğ. (2014) gözden alınan örneklerden yapmış oldukları çalışmada tüm *mecA* pozitif ve oksasilin dirençli izolatların çoklu antibiyotik direnci karakterinde olduğu bildirilmiştir. İzolasyonu yapılan *S. pseudintermedius* suşlarının konağa özgü olduğu ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda ayaktan göze bulaşın mümkün olduğu öne sürülmüştür (Kang ve diğ., 2014). Almanya’da yapılan çalışmada 5 *S. pseudintermedius* izolatı tüm antibiyotik gruplarına duyarlı olarak belirlenirken, 21 izolat sadece bir antibiyotik sınıfına dirençli olarak değerlendirilmiştir (Feßler ve diğ., (2022). Bu tez çalışmasında da tek antibiyotik sınıfına dirençli izolatlar saptandı. SP izolatlarında üçten fazla antibiyotik sınıfına dirençli olma durumu yaygındır fakat bu çalışmadaki gibi tek antibiyotik sınıfına olan direnç gelişimine sahip izolatların varlığı nadiren olsa da yayınlarda bildirilmiştir.

*S. pseudintermedius* suşları, *S. aureus* ve *S. epidermidis* türleri gibi biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir. Bu özelliğin etkenin değişik yüzeylerde uzun süre canlı kalmasında rol oynayabileceği düşünülmektedir (Jantorn ve diğ., 2021, Diribe ve diğ., 2015, Singh ve diğ., 2013). Bu tez çalışması, ülkemizde *S. pseudintermedius*’un biyofilm oluşturma yeteneği ile ilgili yapılan ilk çalışmadır. Çalışmamızda biyofilm oluşturma yeteneği hem fenotipik olarak iki farklı yöntem ile hem de genotipik olarak incelendi. CRA yöntemi ile yapılan değerlendirmede izolatların %21,1 ve MTP yöntemi ile yapılan değerlendirmede ise %16,51 oranında biyofilm negatif olarak saptandı. Bununla birlikte biyofilm oluşturma yeteneğinin genotipik değerlendirilmesinde, 109 SP izolatında en az bir gen bölgesi saptanmış olmakla birlikte, 105 izolat hem *icaA* pozitif hem de *icaD* pozitif olarak saptandı. Bununla birlikte *icaD* negatif olan izolatlarda *icaA*, *icaA* negatif olan 2 izolatta ise *icaD* gen varlığı belirlendi. Yapılan fenotipik incelemelerde negatif olarak değerlendirilen izolatlara (7 izolat) yapılan genotipik değerlendirmede ise *icaA* ve *icaD* genlerinin varlığı saptandı. Bu veriler *S. pseudintermedius* türlerinde var olan biyofilm yeteneğinin fenotipik ve genotipik olarak yüksek prevalansa sahip olduğunu gösteren çalışmaları destekler niteliktedir (Singh ve diğ., 2013, Han ve diğ., 2015). Bununla birlikte bu tez çalışmada, SP’un biyofilm özelliğinin araştırılmasında kullanılan bu yöntemler (CRA, MTP ve PCR) arasında istatistiksel fark saptanmadığı için, çalışmalarda üç yöntemin de bu özelliğin belirlenmesinde uygun olduğu sonucuna varıldı.

Singh ve diğ. (2013), klinik izolatlarda biyofilm oluşturma özelliğini fenotipik ve genotipik yöntemlerle değerlendirmişlerdir. İzolatların %96’sının orta ya da güçlü biyofilm oluşturma yetenekleri olduğunu saptamışlardır. Biyofilm oluşturma yeteneği ile metisilin

dirençli (MRSP) ya da metisilin duyarlı (MSSP) olması arasında ya da etkenin kaynağı, klonal tipi arasında bir ilişki saptanmamıştır. Ancak izolatların çoğunda var olan bu özelliğin, etkenin veteriner kliniklerinde neden hızla artış gösterdiğini açıklayan bir virulens faktörü olabileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada *mecA* geni varlığı belirlenen (n=6) ve fenotipik olarak metisilin dirençli (n=9) olan tüm izolatlarda da hem *icaA* hem de *icaD* genleri saptandı. Diribe ve diğ. (2015), tüm *S. pseudintermedius* izolatlarında değişen derecelerde biyofilm oluşturma özelliği olduğunu saptamışlardır. Bununla birlikte çalışmada çoklu antibiyotik direnci belirlenen *S. pseudintermedius* suşları ile diğer suşlar arasında biyofilm oluşturma yeteneği ile ilişkili belirgin bir fark olmadığı belirtilmiştir (Diribe ve diğ., 2015). Biyofilm oluşumu etkenlerin antibiyotik ya da antiseptiklere dirençli olmalarını sağlamalarının yanında fagositoz oluşumuna engel olarak konağın bağışıklık sistemine de direnç gösterir. Bu özelliği ile biyofilm oluşumu kronik enfeksiyonların oluşmasına neden olabildiği için klinik açıdan oldukça önemlidir (Pompilio ve diğ., 2015). Pesset ve diğ. (2020) MSSP ve MRSP izolatları kullanarak veteriner cerrahide yaygın olarak uygulanan dikiş iplikleri ile yaptıkları çalışmada, biyofilm oluşturma yeteneğinin en çok pamuk ve polyglactin 910 malzemelerinde olduğunu saptamış, özellikle cerrahi yara enfeksiyonlarında biyofilm oluşumunun tedaviyi önemli derecede engellediğini göz önüne koymuştur.

Tayland'da yapılan bir çalışmada izole edilen tüm *S. pseudintermedius* izolatlarında biyofilm oluşturma yeteneği belirlenmiş olup %90'ı orta veya kuvvetli pozitif olarak saptanmıştır (Jantorn ve diğ., 2021). Benzer şekilde Brezilya'da yapılan çalışmada biyofilm oluşturma yeteneğinin değerlendirilmesinde MSSP ile MRSP veya çoklu antibiyotik direnci olan ile olmayan izolatlar arasında hiçbir istatistiksel fark belirlenmediği bildirilmiştir (Breyer ve diğ., 2023). Güney Kore'de yapılan bir çalışmada da Tayland'daki çalışmayı destekler nitelikte sonuçlanmıştır. Sağlıklı köpeklerden yapılan çalışmalarda izolatların %93,5'i biyofilm oluşturma yeteneği pozitif olarak belirlenmiştir (Han ve diğ., 2015). Seo ve diğ., (2021) otit eksternalı köpeklerden izole edilen SP izolatlarında antibiyofilm aktivitesini belirlemek üzere gümüş nanopartikülleri değerlendirmiş ve tedavi için alternatif olarak kullanılabileceğini önermiştir.

MRSP veteriner hekimliğinde önemli bir nozokomiyal patojen olmakla birlikte; hayvanlar ile çalışan insanlar, veteriner kliniği personelleri ve en önemlisi veteriner hekimler bu etkenin hayvandan hayvana aktarımı konusunda büyük bir rol almaktadır (Perreten ve diğ., 2010, Pompilio ve diğ., 2015). Amerika'da yapılan vaka sunumunda kedisi ve köpekleri olan bir kadında kateter ilişkili dolaşım sistemi enfeksiyonu teşhis edilmiş ve izole edilen etken

MSSP olmakla birlikte bu enfeksiyonun etkenin biyofilm oluşturma yeteneği ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Diaz ve diğ., 2019). Bulaşma çevre ve insan, köpek ve insan, köpek ve çevre gibi çeşitli varyasyonlarda ve tersi şeklinde gerçekleşebilmektedir. Bununla birlikte direkt olarak deri ve burun ile temas bulaşmada en sık karşılaşılan durumdur. Sağlıklı insanların burunlarından alınan örneklerden MRSP izole edilen çalışmalar mevcuttur (Rodrigues ve diğ., 2018). Duvar ve çeşitli yüzeylere indirekt temas ile de bulaşma gerçekleşmektedir. Kısacası köpekler ile yaşayan ya da çalıştığı ortamda yer alan insanlar aktif bir enfeksiyona sahip olmasalar dahi *S. pseudintermedius* taşıyıcısı olma potansiyelindedir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada köpeklerde en yaygın deri hastalıklardan birisi olan pyoderma olguları incelenmiş ve pyodermada en sık izole edilen *S. pseudintermedius* varlığı belirlenmiştir. Yapılan değerlendirmelerde belirli antibiyotik sınıflarında saptanan antibiyotik direnci ve çoklu antibiyotik direncine sahip izolatlar, etkenin zoonoz karakteri ile birlikte önemini öne çıkarmıştır. Hayatlarımızın önemli bir parçası olan köpeklerden izole edilen bu etken diğer memelilere de bulaşabilmektedir. Çevre, hayvan ve insan zincirinde tek sağlık bilinci de göz önüne alınarak; bulaşma yolu direkt ve indirekt yollar ile olabilen bu etkene karşı gerekli önlemler alınmalıdır. Öncelikli olarak temas ile bulaşmanın en yaygın olabileceği klinik ortamları ve hayvan-hayvan temaslarına dikkat edilmelidir. Bakterinin virulensinde önemli olduğu bilinen biyofilm oluşturma yeteneği ülkemizde ilk defa değerlendirildi ve *S. pseudintermedius* izolatlarında küçümsemeyecek kadar fazla oranda saptandı. Gözardı edilmemesi gereken bu özellik, etkenin değişik yüzeylerde uzun süre canlı kalabilme yeteneğini destekleyerek temas ile bulaşmada büyük rol oynamaktadır. Bununla birlikte klinik tanı kısmında yeterli sonuç elde etmeksizin ampirik tedavi kullanımı yapan klinisyen veteriner hekimlerin, kültür ve antibiyotik duyarlılık testlerini yapmadan tedavi aşamasına geçmemeleri konusunda bilinçlendirilmeli gerekmektedir. Günümüzde önüne geçilmesi güç bir sorun durumuna gelen antimikrobiyal dirence karşı en azından kısıtlı antibiyotik seçimi ile bireylerin tedavisine destek olunabilmesi söz konusudur. Ülkemizde ve dünyada her geçen gün artan çalışmaların verilerinin de desteği ile, *S. pseudintermedius* identifikasyonu ve antimikrobiyal direncinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin geliştirilip spesifik hale getirilmesi gerekmektedir. Ayrıca veteriner hekimlerin bu etkenin epidemiyolojik karakteri ve direnç yeteneğini göz önüne alarak tedavi yollarının geliştirilmesi ile ilgili bilinçlendirilmeleri önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

Abouelkhair, M.A.; Bemis, D.A.; Giannone, R.J.; Frank, L.A.; Kania, S.A. Characterization of a leukocidin identified in *Staphylococcus pseudintermedius*. *PLoS ONE* 2018, 13, e0204450.

Abouelkhair, M.A.; Results of a pilot clinical trial using a vaccine containing key antigens from *Staphylococcus pseudintermedius* to treat superficial pyoderma in dogs, 2019, DOI: 10.1111/vde.12750\_01\_50.

Arda M., 2011, *Temel Mikrobiyoloji*, Medisan, Ankara, ISBN: 978-975-7774-68-6.

Asleh M, Feinstein Y, Lazar I, Rokney A, Baum M, Sagi O, Leibovitz E, Danino D. Severe Pneumonia Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in an Oncology Patient: Case Report and Literature Review. *Microb Drug Resist.* 2022 Feb;28(2):222-228. doi: 10.1089/mdr.2020.0469. Epub 2021 Oct 4. PMID: 34609906.

Bagcıgil, F.A., Moodley, A., Baptiste, K.E., Jensen, V.F., Guardabassi, L., 2007, Occurrence, species distribution, antimicrobial resistance and clonality of methicillin- and erythromycin resistant staphylococci in the nasal cavity of domestic animals, *Veterinary Microbiology* 121 (3-4), 307-315.

Bağcıgil, A., İkiz, S., Güzel, Ö., Yaramış, Ç.P., ve Ilgaz, A., 2012, Hayvanlardan, klinik ortamından ve klinik çalışanlarından izole edilen metisiline dirençli stafilocokların tür dağılımları, *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 38(2), 151-160.

Balachandran, M.; Bemis, D.A.; Kania, S.A. Expression and function of protein A in *Staphylococcus pseudintermedius*. *Virulence* 2018, 9, 390–401.

Bannoehr, J. ve L. Guardabassi, *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology, and pathogenicity. *Veterinary dermatology*, 2012. 23(4): p. 253-e52.

Bannoehr J, Franco A, Iurescia M, Battisti A, Fitzgerald JR. Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Clin Microbiol.* 2009 Feb;47(2):469-71. doi: 10.1128/JCM.01915-08. Epub 2008 Dec 17. PMID: 19091817; PMCID: PMC2643665.

Beck, K.M., et al., Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from skin and carriage sites of dogs after treatment of their methicillin-resistant or methicillin-sensitive staphylococcal pyoderma. *Veterinary dermatology*, 2012. 23(4): p. 369-e67.

Becker K, van Alen S, Idelevich EA, Schleimer N, Seggewiß J, Mellmann A, Kaspar U, Peters G. Plasmid-Encoded Transferable *mecB*-Mediated Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis.* 2018 Feb;24(2):242-248. doi: 10.3201/eid2402.171074. PMID: 29350135; PMCID: PMC5782906.

Breyer, G. M., Saggin, B. F., de Carli, S., da Silva, M. E. R. J., da Costa, M. M., Brenig, B., Siqueira, F. M. (2023). Virulent potential of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs. *Acta Tropica*, 106911.

Chen C., Chengtao Sun, Jidong Li, Xing Ji, Yang Wang, Cuiping Song, Guiqin Wang, Characterisation of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Ningxia, Western China, *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, Volume 25, 2021, Pages 232-237, ISSN 2213-7165, <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.03.021>.

Chen C, Wu F. *Occup Environ Med* 2021;78:530–540. doi:10.1136/oemed-2020-106418

Courtice R, Sniatynski M, Rubin JE. Characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* causing urinary tract infections in dogs: Passive surveillance in Saskatchewan, Canada 2014 to 2018. *J Vet Intern Med*. 2021; 35:1389–1396. <https://doi.org/10.1111/jvim.16103>

Çiftci, A., Onuk, E. E. ve ÇİFTÇİ, G. (2015). The comparative analysis of phenotypic and genotypic properties of *Aeromonas sobria* strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1972). *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 21(4).

DeBoer J. D., DILEMMAS IN DERMATOLOGY: PEARLS & PITFALLS. TODAY'S VETERINARY PRACTICE, January/February 2016: p. 69-75.

Decristophoris P, Fasola A, Benagli C, Tonolla M, Petrini O. Identification of *Staphylococcus intermedius* Group by MALDI-TOF MS. *Syst Appl Microbiol*. 2011 Feb;34(1):45-51. doi: 10.1016/j.syapm.2010.11.004. PMID: 21300509.

Devriese L.A., Hommez J., Epidemiology of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* in dairy helds. *Research in Veterinary Science* 1975, 19, 23-27.

Devriese, L. A., Vancanneyt, M., Baele, M., Vaneechoutte, M., De Graef, E., Snauwaert, C., Haesebrouck, F. (2005). *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(Pt 4), 1569–1573. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63413-0>

Diaz, M. A., Gardner, L. B., Libertin, C. R. (2019). *Staphylococcus pseudintermedius* catheter-related bloodstream infection after exposure to domestic dogs and a cat. *BMJ Case Reports CP*, 12(12), e231489.

Diribe O, Thomas S, AbuOun M, Fitzpatrick N, La Ragione R. Genotypic relatedness and characterization of *Staphylococcus pseudintermedius* associated with post-operative surgical infections in dogs. *J Med Microbiol*. 2015 Sep;64(9):1074-1081. doi: 10.1099/jmm.0.000110. PMID: 26449388.

Duijkeren E., Boudewijn Catry, Christina Greko, Miguel A. Moreno, M. Constança Pomba, Satu Pyörälä, Modestas Ružauskas, Pascal Sanders, E. John Threlfall, Jordi Torren-Edo, Karolina Törneke, [Scientific Advisory Group on Antimicrobials (SAGAM)], Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 66, Issue 12, 2011.

Eliopoulos G. M., Huovinen P., Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 32, Issue 11, 1 June 2001, Pages 1608–1614, <https://doi.org/10.1086/320532>.

Fadok, V. A. ve Irwin, K. (2019). Sodium hypochlorite/salicylic acid shampoo for treatment of canine staphylococcal pyoderma. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 55(3), 117-123.

Ferrer L, García-Fonticoba R, Pérez D, Viñes J, Fàbregas N, Madroñero S, Meroni G, Martino PA, Martínez S, Maté ML, Sánchez-Bruni S, Cuscó A, Migura-García L, Francino O. Whole genome sequencing and de novo assembly of *Staphylococcus pseudintermedius*: a pangenome approach to unravelling pathogenesis of canine pyoderma. *Vet Dermatol*. 2021 Dec;32(6):654-663. doi: 10.1111/vde.13040. PMID: 34796561.

Feßler AT, Scholtzek AD, Schug AR, Kohn B, Weingart C, Schink A-K, Bethe A, Lübke-Becker A, Schwarz S. Antimicrobial and Biocide Resistance among Feline and Canine *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* Isolates from Diagnostic Submissions. *Antibiotics*. 2022; 11(2):127. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020127>

Findık A. ve ark. (2009). Methicilin resistance profile and molecular typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated from noses of the healthy dogs. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(6), 925-930.

Frank, L. A., & Loeffler, A. (2012). Meticillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: clinical challenge and treatment options. *Veterinary dermatology*, 23(4), 283-e56.

Fungwithaya P, Sontigun N, Boonhoh W, Boonchuay K, Wongtawan T (2022) Antimicrobial resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* on the environmental surfaces of a recently constructed veterinary hospital in Southern Thailand, *Veterinary World*, 15(4): 1087-1096.

Futagawa-Saito K., Shinichiroh Makino, Fujiko Sunaga, Yukio Kato, Naomi Sakurai-Komada, William Ba-Thein, Tsuguaki Fukuyasu, Identification of first exfoliative toxin in *Staphylococcus pseudintermedius*, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 301, Issue 2, December 2009, Pages 176–180, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01823.x>

Gagetti, P., Errecalde, L., Wattam, A. R., De Belder, D., Ojeda Saavedra, M., Corso, A., & Rosato, A. E. (2020). Characterization of the first mec A-positive multidrug-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from an Argentinian patient. *Microbial Drug Resistance*, 26(7), 717-721.

Geoghegan, J.A., Smith, E.J., Speziale, P., Foster, T.J., 2009. *Staphylococcus pseudintermedius* expresses surface proteins that closely resemble those from *Staphylococcus aureus*. *Vet Microbiol* 138: 345-352.

Gómez-Sanz, E., et al., Detection and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in healthy dogs in La Rioja, Spain. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 2011. 34(5): p. 447-453.

Göçmen, H., Tamakan, H., Şükür, H. & Esenal, Ö. M. (2020). Kedi ve Köpeklerden İzole Edilen *Staphylococcus* Türlerinde Çoklu İlaç Dirençliliğinin Araştırılması. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 15 (2), 156-166. DOI: 10.17094/ataunivbd.706993

Grönthal, T., Eklund, M., Thomson, K., Piiparinen, H., Sironen, T., & Rantala, M. (2017). Antimicrobial resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and the molecular epidemiology of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* in small animals in Finland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(4), 1021-1030.

Gupta, N., Jais, M., Shrivastava, P. K. & Sharma, A. (2022). Comparison of Different Phenotypic Methods of Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* with Polymerase Chain Reaction. *Journal of Microbiology and Infectious Diseases*, 12 (03), 116-126. DOI: 10.5799/jmid.1176537

Hajek V., 1976. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. *Int J Syst Bacteriol*, 26, 401-408.

Han JI, Yang CH, Park HM. Emergence of biofilm-producing *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from healthy dogs in South Korea. *Vet Q.* 2015;35(4):207-10. doi: 10.1080/01652176.2015.1096429. Epub 2015 Oct 27. Erratum in: *Vet Q.* 2016 Jun;36(2):120. PMID: 26404519.

Hanselman BA, Kruth SA, Rousseau J, Low DE, Willey BM, McGeer A, Weese JS. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in veterinary personnel. *Emerg Infect Dis.* 2006 Dec;12(12):1933-8. doi: 10.3201/eid1212.060231. PMID: 17326947; PMCID: PMC3291342.

Huber D, Šoštarić-Zuckermann IC, Mihoković Buhin I, Habuš J, Štritof Z, Stevanović V, Grabarević Ž. Pyometra Associated With *Staphylococcus pseudintermedius* in Two Bitches. *Top Companion Anim Med.* 2022 Jul-Aug; 49:100650. doi: 10.1016/j.tcam.2022.100650. Epub 2022 Mar 6. PMID: 35259494.

Iyori K., Junzo Hisatsune, Tetsuji Kawakami, Sanae Shibata, Nobuo Murayama, Kaori Ide, Masahiko Nagata, Tsuneo Fukata, Toshiroh Iwasaki, Kenshiro Oshima, Masahira Hattori, Motoyuki Sugai, Koji Nishifuji, Identification of a novel *Staphylococcus pseudintermedius* exfoliative toxin gene and its prevalence in isolates from canines with pyoderma and healthy dogs, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 312, Issue 2, November 2010, Pages 169–175, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02113.x>

Jantorn P, Heemamad H, Soimala T, Indoung S, Saising J, Chokpaisarn J, Wanna W, Tipmanee V, Saeloh D. Antibiotic Resistance Profile and Biofilm Production of *Staphylococcus pseudintermedius* Isolated from Dogs in Thailand. *Pharmaceuticals.* 2021; 14(6):592. <https://doi.org/10.3390/ph14060592>

Jantorn, P.; Heemamad, H.; Soimala, T.; Indoung, S.; Saising, J.; Chokpaisarn, J.; Wanna, W.; Tipmanee, V.; Saeloh, D. Antibiotic Resistance Profile and Biofilm Production of *Staphylococcus pseudintermedius* Isolated from Dogs in Thailand. *Pharmaceuticals* 2021, 14, 592. <https://doi.org/10.3390/ph14060592>

John J Jr. The treatment of resistant staphylococcal infections. *F1000Res.* 2020 Feb 26;9: F1000 Faculty Rev-150. doi: 10.12688/f1000research.17718.1. PMID: 32148777; PMCID: PMC7047908.

Kadlec, K., Schwarz, S. (2012). *Antimicrobial resistance of Staphylococcus pseudintermedius.* *Veterinary Dermatology*, 23(4), 276–e55. doi:10.1111/j.1365-3164.2012.01056.x

Kang MH, Chae MJ, Yoon JW, Kim SG, Lee SY, Yoo JH, Park HM. Antibiotic resistance and molecular characterization of ophthalmic *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs. *J Vet Sci.* 2014 Sep;15(3):409-415. <https://doi.org/10.4142/jvs.2014.15.3.409>

Kariyama R., Mitsuhashi R., Chow JW., Clewell DB., Kumon H., 2000, Simple and reliable Multiplex-PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci, *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 3092-3095.

Keita Iyori, Junzo Hisatsune, Tetsuji Kawakami, Sanae Shibata, Nobuo Murayama, Kaori Ide, Masahiko Nagata, Tsuneo Fukata, Toshiro Iwasaki, Kenshiro Oshima, Masahira Hattori, Motoyuki Sugai, Koji Nishifuji, Identification of a novel *Staphylococcus pseudintermedius* exfoliative toxin gene and its prevalence in isolates from canines with pyoderma and healthy dogs, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 312, Issue 2, November 2010, Pages 169–175, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02113.x>

Kher, L., Santoro, D., Kelley, K. Effect of Nanosulfur Against Multidrug-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 106, 3201–3213 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11872-8>

Kim G.S., Giri S.S., *Front. Med.*, 31 March 2021, Sec. Infectious Diseases – Surveillance, Prevention and Treatment. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.524059>.

Kim, T., Y. Na, ve J. Lee, Investigations into the basis of chloramphenicol and tetracycline resistance in *Staphylococcus intermedius* isolates from cases of pyoderma in dogs. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 2005. 52(3): p. 119-124.

Kmieciak, W. and E.M. Szewczyk, are zoonotic *Staphylococcus pseudintermedius* strains a growing threat for humans? *Folia microbiologica*, 2018: p. 1-5.

Kondo, Y., Ito, T., Ma, X. X., Watanabe, S., Kreiswirth, B. N., Etienne, J., ve Hiramatsu, K., 2007, Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(1), 264-274.

Krapf, M.; Müller, E.; Reissig, A.; Slickers, P.; Braun, S.D.; Müller, E.; Ehrlich, R.; Monecke, S. Molecular characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs and the description of their SCCmec elements. *Vet. Microbiol.* 2019, 233, 196–203.

Kurnaz H., Kedi ve Köpek Kökenli Stafilokok Türlerinde Beta-Laktam Direncinin Fenotipik ve Genotipik Karakterizasyonu, Doktora Tez Çalışması, 2022.

Larsen, R., Boysen, L., Berg, J., Guardabassi, L., & Damborg, P. (2015). Lincosamide resistance is less frequent in Denmark in *Staphylococcus pseudintermedius* from first-time canine superficial pyoderma compared with skin isolates from clinical samples with unknown clinical background. *Veterinary dermatology*, 26(3), 202-e44.

Lee G. Y., Yang S., 2019 Comparative assessment of genotypic and phenotypic correlates of *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from dogs with otitis externa and healthy dogs. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* Volume 70, June 2020, 101376.

- Lina, G., Quaglia, A., Reverdy, M.E., Leclercq, R., Vandenesch, F., Etienne, J., 1999, Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(5), 1062-1066.
- Liu C, Zhao X, Xie H, Zhang X, Li K, Ma C (2020) Whole genome sequence and comparative genome analyses of multi-resistant *Staphylococcus warneri* GD01 isolated from a diseased pig in China. *PLoS ONE* 15(5): e0233363. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233363>
- Lynch, S. A., Helbig, K. J. (2021). The complex diseases of *Staphylococcus pseudintermedius* in canines: where to next?. *Veterinary sciences*, 8(1), 11.
- Maaland, M. G., Papich, M. G., Turnidge, J., Guardabassi, L. (2013). Pharmacodynamics of doxycycline and tetracycline against *Staphylococcus pseudintermedius*: proposal of canine-specific breakpoints for doxycycline. *Journal of clinical microbiology*, 51(11), 3547-3554.
- Marina Morgan, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis?, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 62, Issue 6, December 2008, Pages 1181–1187, <https://doi.org/10.1093/jac/dkn405>
- Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A., & Maguire, D. (2013). *Clinical veterinary microbiology e-book*. Elsevier Health Sciences.
- Martineau, F., Picard, F.J., Grenier, L., Roy, P.H., Ouellette, M., ve Bergeron, M. G., 2000, Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patients infected after cardiac surgery, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(4), 527-534.
- Matanović, K., Mekić, S., & Šeol, B. (2012). Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs and cats in Croatia during a six-month period. *Vet. Arhiv*, 82(5), 505-517.
- Menandro, M. L., Dotto, G., Mondin, A., Martini, M., Ceglie, L., & Pasotto, D. (2019). Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from symptomatic companion animals in Northern Italy: Clonal diversity and novel sequence types. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 66, 101331. ISSN 0147-9571 <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101331>.
- Meroni G, Soares Filipe JF, Drago L, Martino PA. Investigation on Antibiotic-Resistance, Biofilm Formation and Virulence Factors in Multi Drug Resistant and Non Multi Drug Resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Microorganisms*. 2019; 7(12):702. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120702>
- MM vanDamme, C., Broens, E. M., Auxilia, S. T., & Schlotter, Y. M. (2020). Clindamycin resistance of skin derived *Staphylococcus pseudintermedius* is higher in dogs with a previous antibiotic history.
- Moodley A., Stegger M., Nouri L. Ben Zakour, J. Ross Fitzgerald, Luca Guardabassi. Tandem repeat sequence analysis of staphylococcal protein A (spa) gene in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*, *Veterinary Microbiology*, Volume 135, Issues 3–4, 2009, Pages 320-326, ISSN 0378-1135, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.070>.

Moses, Ikechukwu Benjamin and Esimone, Charles Okechukwu and Romanus, Iroha Ifeanyichukwu and J.E., Rubin and M.K., Sniatynsky and Cardoso da Silva Ribeiro, Ághata and Fernandes Santos, Fernanda and Cayo da Silva, Rodrigo and Gales, Ana Cristina, 2022, First Study on the Antibiotypes and High Frequency of Toxin Genes in Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from Nares of Dogs and Dog Guardians in Nigeria. SSRN: <https://ssrn.com/abstract=4113936> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4113936>

Mueller RS, Stephan B., Pradofloxacin in the treatment of canine deep pyoderma: a multicentred, blinded, randomized parallel trial. *Vet Dermatol.* 2007 Jun;18(3):144-51. doi: 10.1111/j.1365-3164.2007.00584.x. PMID: 17470228.

Murray AK, Lee J, Bendall R, Zhang L, Sunde M, Schau Slettemeås J, Gaze W, Page AJ, Vos M. *Staphylococcus cornubiensis* sp. nov., a member of the *Staphylococcus intermedius* Group (SIG). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2018 Nov;68(11):3404-3408. doi: 10.1099/ijsem.0.002992. Epub 2018 Sep 11. PMID: 30204583.

Müştak, H. K., Sareyyüpoğlu, B., & Diker, K. S. (2014). High-level mupirocin resistance in a *Staphylococcus pseudintermedius* strain from canine origin. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(6).

Müştak, İ. B., Müştak, H. K., SARIÇAM, S., Üstün, T., & Erdem, A. E. (2020). Frequency of *Staphylococcus pseudintermedius* in canine skin infections and antibiotic resistance profiles of the recovered isolates. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 31(2), 127-132.

NAKAMINAMI H, YUU OKAMURA, Satomi TANAKA, Takeaki WAJIMA, Nobuo MURAYAMA, Norihisa NOGUCHI, Prevalence of antimicrobial-resistant staphylococci in nares and affected sites of pet dogs with superficial pyoderma, *Journal of Veterinary Medical Science*, Article ID 20-0439, Advance online publication December 18, 2020, Online ISSN 1347-7439, Print ISSN 0916-7250, <https://doi.org/10.1292/jvms.20-0439>

Nocera FP, Meroni G, Fiorito F, De Martino L, Martino PA. Occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of canine *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from two different Italian university veterinary hospitals. *Vet Ital.* 2020 Dec 1;56(4):263-269. doi: 10.12834/VetIt.2195.12897.1. PMID: 33635615.

Oliveira, A., Devesa, J., Hill, P., Poeta, P. (2018). Multidrug resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from superficial bacterial folliculitis in dogs from Portugal and Spain.

Onuma, K., T. Tanabe, H. Sato, Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from healthy dogs and dogs affected with pyoderma in Japan. *Veterinary dermatology*, 2012. 23(1): p. 17-e5.

Öztürk, D., Avki, S., Türütoğlu, H., Yiğitarıslan, K., & Sağnak, S. (2010). Methicillin resistance among coagulase-positive staphylococci isolated from dogs with otitis externa, skin wounds and pyoderma.

Proietti Casagrande, A. Bietta, M. Coletti, M.L. Marenzoni, A.V. Scorza, F. Passamonti, Insertion sequence IS256 in canine pyoderma isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* associated with antibiotic resistance, *Veterinary Microbiology* [Volume 157, Issues 3–4](#), 15 June 2012, Pages 376-382

Proietti Casagrande P, Stefanetti V, Hyatt DR, Marenzoni ML, Capomaccio S, Coletti M, Bietta A, Franciosini MP, Passamonti F. Phenotypic and genotypic characterization of canine pyoderma isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* for biofilm formation. *J Vet Med Sci*. 2015 Aug;77(8):945-51. doi: 10.1292/jvms.15-0043. Epub 2015 May 18. PMID: 25892615; PMCID: PMC4565817.

Park, J. H., Kang, J. H., Hyun, J. E., & Hwang, C. Y. (2018). Low prevalence of mupirocin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine pyoderma in Korea. *Veterinary dermatology*, 29(2), 95-e37.

Paul, N. C., Moodley, A., Ghibaud, G., & Guardabassi, L. (2011). *Carriage of Methicillin-Resistant Staphylococcus pseudintermedius in Small Animal Veterinarians: Indirect Evidence of Zoonotic Transmission*. *Zoonoses and Public Health*, 58(8), 533–539. doi:10.1111/j.1863-2378.2011.01398.x

Perreten V., Kristina Kadlec, Stefan Schwarz, Ulrika Grönlund Andersson, Maria Finn, Christina Greko, Arshnee Moodley, Stephen A. Kania, Linda A. Frank, David A. Bemis, Alessia Franco, Manuela Iurescia, Antonio Battisti, Birgitta Duim, Jaap A. Wagenaar, Engeline van Duijkeren, J. Scott Weese, J. Ross Fitzgerald, Alexandra Rossano, Luca Guardabassi, Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 65, Issue 6, June 2010, Pages 1145–1154, <https://doi.org/10.1093/jac/dkq078>

Pesset, C. M., da Fonseca, C. O., Antunes, M., Dos Santos, A. L. L., Teixeira, I. M., Ribeiro, T. A., Penna, B. (2022). Characterizing biofilm formation of *Staphylococcus pseudintermedius* in different suture materials. *Microbial Pathogenesis*, 172, 105796.

Pilla, R., Bonura, C., Malvisi, M., Snel, G. G. M., Piccinini, R. (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* as causative agent of dairy cow mastitis. *Vet Rec*, 173(19.2).

Pinchbeck, L. R., Cole, L. K., Hillier, A., Kowalski, J. J., Rajala-Schultz, P. J., Bannerman, T. L., & York, S. (2006). Genotypic relatedness of staphylococcal strains isolated from pustules and carriage sites in dogs with superficial bacterial folliculitis, *American Journal of Veterinary Research*, 67(8), 1337-1346. Retrieved Dec 9, 2022, from <https://avmajournals.avma.org/view/journals/ajvr/67/8/ajvr.67.8.1337.xml>

Platenik MO, Archer L, Kher L, Santoro D. Prevalence of *mecA*, *mecC* and *Panton-Valentine-Leukocidin* Genes in Clinical Isolates of Coagulase Positive Staphylococci from Dermatological Canine Patients. *Microorganisms*. 2022 Nov 12;10(11):2239. doi: 10.3390/microorganisms10112239. PMID: 36422308; PMCID: PMC9695408.

Pompilio A, De Nicola S, Crocetta V, Guarnieri S, Savini V, Carretto E, Di Bonaventura G. New insights in *Staphylococcus pseudintermedius* pathogenicity: antibiotic-resistant biofilm formation by a human wound-associated strain. *BMC Microbiol*. 2015 May 21;15:109. doi: 10.1186/s12866-015-0449-x. PMID: 25994406; PMCID: PMC4440327.

Prescott J. F., Sulfonamides, Diaminopyrimidines, and Their Combinations, *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, Fifth Edition. Edited by Steeve Giguère, John F. Prescott and Patricia M. Dowling. © 2013 John Wiley & Sons, Inc. Published 2013 by John Wiley & Sons, Inc. p: 279-294.

Rodrigues AC, Belas A, Marques C, Cruz L, Gama LT, Pomba C. Risk Factors for Nasal Colonization by Methicillin-Resistant Staphylococci in Healthy Humans in Professional Daily Contact with Companion Animals in Portugal. *Microb Drug Resist.* 2018 May;24(4):434-446. doi: 10.1089/mdr.2017.0063. Epub 2017 Sep 18. PMID: 28922060.

Ross Fitzgerald, J., The *Staphylococcus intermedius* group of bacterial pathogens: species reclassification, pathogenesis, and the emergence of methicillin resistance. *Veterinary dermatology*, 2009. 20(5-6): p. 490-495.

Rubin J, Walker RD, Blickenstaff K, Bodeis-Jones S, Zhao S. Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine infections. *Vet Microbiol.* 2008 Sep 18;131(1-2):164-72. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.02.018. Epub 2008 Mar 4. PMID: 18395369.

Rubin JE, Ball KR, Chirino-Trejo M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from various animals. *Can Vet J.* 2011 Feb;52(2):153-7. PMID: 21532820; PMCID: PMC3022451.

Rubin, J.E. ve M. Chirino-Trejo, Prevalence, sites of colonization, and antimicrobial resistance among *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from healthy dogs in Saskatoon, Canada. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 2011. 23(2): p. 351-354.

Rusenova, N., Krustev, S., Atanasov, A., Rusenov, A., Stanilova, S. (2020). Differentiation of *Staphylococcus pseudintermedius* in the *Staphylococcus intermedius* Group (SIG) by Conventional and Molecular Methods. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 26(5).

Ruzauskas M, N. Couto, A. Pavilonis, I. Klimiene, R. Siugzdiniene, M. Virgailis, L. Vaskeviciute, L. Anskiene, C. Pomba. Characterization of *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from diseased dogs in Lithuania. *Polish Journal of Veterinary Sciences* Vol. 19, No. 1 (2016), 7–14.

Sareyyüpoğlu B., Müştak, H. K., Cantekin, Z., Diker, K. S. (2014). Methicillin Resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* Isolated from Shelter Dogs in Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 20 (3): 435-438, 2014 DOI: 10.9775/kvfd.2013.10364.

Sasaki A, Shimizu A, Kawano J, Wakita Y, Hayashi T, Ootsuki S. Characteristics of *Staphylococcus intermedius* isolates from diseased and healthy dogs. *J Vet Med Sci.* 2005 Jan;67(1):103-6. doi: 10.1292/jvms.67.103. PMID: 15699604.

Sasaki T, Tsubakishita S, Tanaka Y, Sakusabe A, Ohtsuka M, Hirotaki S, Kawakami T, Fukata T, Hiramatsu K. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *J Clin Microbiol.* 2010 Mar;48(3):765-9. doi: 10.1128/JCM.01232-09. Epub 2010 Jan 6. PMID: 20053855; PMCID: PMC2832457.

Scherer, C. B., Botoni, L. S., Coura, F. M., Silva, R. O., Santos, R. D. D., Heinemann, M. B., Costa-Val, A. P. (2018). Frequency and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs with otitis externa. *Ciência Rural*, 48.

Schwarz S, Kadlec K, Strommenger B. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* detected in the BfT-GermVet monitoring programme 2004-

2006 in Germany. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Feb;61(2):282-5. doi: 10.1093/jac/dkm487. Epub 2007 Dec 19. PMID: 18096559.

Seo, M., Oh, T., Bae, S. (2021). Antibiofilm activity of silver nanoparticles against biofilm forming *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs with otitis externa. *Veterinary Medicine and Science*, 7(5), 1551-1557.

Silva, V.; Oliveira, A.; Manageiro, V.; Caniça, M.; Contente, D.; Capita, R.; Alonso-Calleja, C.; Carvalho, I.; Capelo, J.L.; Igrejas, G.; et al. Clonal Diversity and Antimicrobial Resistance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* Isolated from Canine Pyoderma. *Microorganisms* 2021, 9, 482. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030482>.

Singh, A., Walker, M., Rousseau, J. *et al.* Characterization of the biofilm forming ability of *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs. *BMC Vet Res* 9, 93 (2013). <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-93>

Skov R, Varga A, Matuschek E, Åhman J, Bemis D, Bengtsson B, Sunde M, Humphries R, Westblade L, Guardabassi L, Kahlmeter G. EUCAST disc diffusion criteria for the detection of mecA-Mediated  $\beta$ -lactam resistance in *Staphylococcus pseudintermedius*: oxacillin versus cefoxitin. *Clin Microbiol Infect.* 2020 Jan;26(1):122.e1-122.e6. doi: 10.1016/j.cmi.2019.05.002. Epub 2019 May 17. PMID: 31108230.

Soimala, T., Lübke-Becker, A., Hanke, D., Eichhorn, I., Feßler, A. T., Schwarz, S., & Eule, J. C. (2020). Molecular and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from ocular surfaces of dogs and cats suffering from ophthalmological diseases. *Veterinary Microbiology*, 244, 108687.

Somayaji 2016, Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonoses of canine origin: report of 24 cases, <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.05.008>

Stefanetti V, Bietta A, Pascucci L, Marenzoni ML, Coletti M, Franciosini MP, Passamonti F, Casagrande Proietti P. Investigation of the antibiotic resistance and biofilm formation of *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from canine pyoderma. *Vet Ital.* 2017 Dec 29;53(4):289-296. doi: 10.12834/VetIt.465.2275.6. PMID: 29307122.

Tamakan, H., & Gocmen, H. (2022). Genetic Characterization of Methicillin Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Dogs and Cats in Cyprus: Comparison of MRSP and MRSA Results. *Pakistan Journal of Zoology*, 54(4), 1511.

Tanabe T, Toyoguchi M, Hirano F, Chiba M, Onuma K, Sato H. Prevalence of staphylococcal enterotoxins in *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs with pyoderma and healthy dogs. *Microbiol Immunol.* 2013 Sep;57(9):651-4. doi: 10.1111/1348-0421.12069. PMID: 23659343.

Trepanier, L.A., Danhof, R., Toll, J., Watrous, D. (2003), Clinical Findings in 40 Dogs with Hypersensitivity Associated with Administration of Potentiated Sulfonamides. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17: 647-652. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2003.tb02495.x>

Urban-Chmiel R, Marek A, Stępień-Pyśniak D, Wieczorek K, Dec M, Nowaczek A, Osek J. Antibiotic Resistance in Bacteria—A Review. *Antibiotics*. 2022; 11(8):1079. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081079>

Valentine B. Treating pyoderma without the use of systemic antibiotics. *Can Vet J*. 2019 Dec;60(12):1361-1363. PMID: 31814647; PMCID: PMC6855222.

Van Hoovels L, Vankeerberghen A, Boel A, Van Vaerenbergh K, De Beenhouwer H. First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human. *J Clin Microbiol*. 2006 Dec;44(12):4609-12. doi: 10.1128/JCM.01308-06. Epub 2006 Oct 18. PMID: 17050817; PMCID: PMC1698428.

Van Damme, C. M., Broens, E. M., Auxilia, S. T., & Schlotter, Y. M. (2020). Clindamycin resistance of skin derived *Staphylococcus pseudintermedius* is higher in dogs with a history of antimicrobial therapy. *Veterinary Dermatology*, 31(4), 305-e75.

Van Duijkeren E, Catry B, Greko C, Moreno MA, Pomba MC, Pyörälä S, Ruzauskas M, Sanders P, Threlfall EJ, Torren-Edo J, Törneke K; Scientific Advisory Group on Antimicrobials (SAGAM). Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Dec;66(12):2705-14. doi: 10.1093/jac/dkr367. Epub 2011 Sep 19. PMID: 21930571.

Vincze S, Paasch A, Walther B, Ruscher C, Lübke-Becker A, Wieler LH, Barbara K. Multidrug- and methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* as a cause of canine pyoderma: a case report. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 2010 Sep-Oct;123(9-10):353-8. PMID: 21038805.

Wang Z, Guo L, Li J, Li J, Cui L, Dong J, Meng X, Qian C and Wang H (2022) Antibiotic resistance, biofilm formation, and virulence factors of isolates of *staphylococcus pseudintermedius* from healthy dogs and dogs with keratitis. *Front. Vet. Sci*. 9:903633. doi: 10.3389/fvets.2022.903633

Wang Y, Yang J, Logue CM, Liu K, Cao X, Zhang W, Shen J, Wu C. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from canine pyoderma in North China. *J Appl Microbiol*. 2012 Apr;112(4):623-30. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05233.x. Epub 2012 Feb 20. PMID: 22229826.

Westermeyer RR, Roy AF, Mitchell MS, Merchant SR. In vitro comparison of *Staphylococcus pseudintermedius* susceptibility to common cephalosporins used in dogs. *Vet Ther*. 2010 Fall;11(3):E1-9. PMID: 20960413.

Worthing, K.A.; Abraham, S.; Coombs, G.W.; Pang, S.; Saputra, S.; Jordan, D.; Trott, D.J.; Norris, J.M. Clonal diversity and geographic distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from Australian animals: Discovery of novel sequence types. *Vet. Microbiol*. 2018, 213, 58–65.

Yoo JH, Yoon JW, Lee SY, Park HM. High prevalence of Fluoroquinolone- and Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine pyoderma and otitis externa in veterinary teaching hospital. *J Microbiol Biotechnol*. 2010 Apr;20(4):798-802. PMID: 20467256.

Yoon, J. W., Lee, K. J., Lee, S. Y., Chae, M. J., Park, J. K., Yoo, J. H., & Park, H. M. (2010). Antibiotic resistance profiles of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine patients in Korea. *Journal of microbiology and biotechnology*, 20(12), 1764-1768.

Yoon, J.W., Prevalence of genes for enterotoxins, toxic shock syndrome toxin 1 and exfoliative toxin among clinical isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* from canine origin. *Veterinary dermatology*, 2010. 21(5): p. 484-489.

Youn JH, Yoon JW, Koo HC, Lim SK, Park YH. Prevalence and antimicrogram of *Staphylococcus intermedius* group isolates from veterinary staff, companion animals, and the environment in veterinary hospitals in Korea. *J Vet Diagn Invest*. 2011 Mar;23(2):268-74. doi: 10.1177/104063871102300211. PMID: 21398446.



## EKLER

Tablo 6 : Ham veriler

	Hasta no	Pyoderma türü	Penisilin (10 µg)	Oksasilin (1 µg)	Difloksasin (10 µg)	Enrofloksasin (5 µg)	Marbofloksasin (5 µg)	Orbifloksasin (10 µg)	Sulfisoksazol (300 µg)	Klindamisin (2 µg)	Eritromisin (15 µg)	Kloramfenikol (30 µg)	Doksisisiklin (30 µg)	Tetrasiklin (30 µg)	Gentamisin (10 µg)	Biyofilm ölç. (CRA)	Biyofilm ölç. (MPT)	mec A	ica A/ icaD	IS256	blaZ	aac-aph	erm A/B/C	cat 1 , cat 2	tet (K), tet (L), tet(M), tet(O)
1	BG 1	Superfisyal	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	BP	BN	mec A	ica A, ica D	n	blaZ	α	erm B	n	α
2	BG 2	Derin	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	O	R	S	BP	BOP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	α	α	tet(M)
3	BG 5	Superfisyal	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	BP	BOP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	α	α	tet(M)
4	BG 6	Superfisyal	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	BN	BOP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	erm B	n	tet(M)
5	BG 8	Superfisyal	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	BP	BOP	mec A	ica A, ica D	n	blaZ	α	α	α	n
6	BG 9	Superfisyal	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S	BP	BKP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	erm B	n	n
7	BG 10	X	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	BP	BN	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	n
8	BG 12	Superfisyal	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	BP	BOP	n	ica A, ica D	n	blaZ	aac-aph	erm B	n	tet(K)
9	BG 13	Superfisyal	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	BP	BKP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	erm B	n	α
10	BG 14	Superfisyal	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	BZP	BKP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	α	α	α
11	BG 15	Yüzeysel	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	BN	BOP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	α	α	tet(K)
12	BG 20	Superfisyal	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	BZP	BOP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	α	α	tet(M)
13	BG 21	Superfisyal	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	BZP	BN	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	α	α	tet(M)

	Hasta no	Pyoderma türü	Penisilin (10 µg)	Oksasilin (1 µg)	Difloksasin (10 µg)	Enrofloksasin (5 µg)	Marbofloksasin (5 µg)	Orbifloksasin (10 µg)	Sulfisoksazol (300 µg)	Klindamisin (2 µg)	Eritromisin (15 µg)	Kloramfenikol (30 µg)	Doksisiklin (30 µg)	Tetrasiklin (30 µg)	Gentamisin (10 µg)	Biyofilim ölç. (CRA)	Biyofilim ölç. (MPT)	mec A	ica A/ ica D	IS256	blaZ	aac-aph	erm A/B/C	cat 1 , cat 2	tet (K), tet (L), tet(M), tet(O)
14	BG 22	Superfisyal	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	BN	BZP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
15	BG 27	Superfisyal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	BP	BN	n	ica A, ica D	n	n	α	n	α	n
16	BG 28	Superfisyal	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	BZP	BOP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	α	α	tet(M)
17	BG 29	Superfisyal	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	BZP	BZP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	α	α	α
18	BG 31	Superfisyal	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	BZP	BOP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	n	n	n
19	BG 32	Superfisyal	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BN	BOP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	α	α	α
20	BG 33	Derin	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	O	R	S	BN	BKP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	α	α	n
21	BG 36	Yüzeysel	S	S	S	S	S	S	S	S	O	S	S	S	S	BN	BZP	n	ica A, ica D	n	α	α	n	α	α
22	BG 37	Yüzeysel	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BP	BZP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
23	BG 38	Superfisyal	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	BP	BKP	mec A	ica A, ica D	n	blaZ	aac-aph	erm B	cat1	tet(K), tet (L), tet (M)
24	BG 39	Superfisyal	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BN	BKP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
25	BG 40	Superfisyal	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BN	BN	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	α	α	α
26	BG 41	Yüzeysel	R	S	S	S	S	S	O	S	S	S	S	S	S	BN	BZP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	α	α	α
27	BG 43	Derin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BP	BZP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
28	BG 46	Superfisyal	R	S	S	S	S	O	S	S	S	S	R	O	S	BP	BOP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	α	α	n
29	BG 47	Derin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BP	BOP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
30	BG 48	Superfisyal	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	O	R	S	BZP	BKP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	α	α	n
31	BG 49	Derin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	O	R	S	BZP	BZP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	n

	Hasta no	Pyoderma türü	Penisilin (10 µg)	Oksasilin (1 µg)	Difloksasin (10 µg)	Enrofloksasin (5 µg)	Marbofloksasin (5 µg)	Orbifloksasin (10 µg)	Sulfisoksazol (300 µg)	Klindamisin (2 µg)	Eritromisin (15 µg)	Kloramfenikol (30 µg)	Doksisisiklin (30 µg)	Tetrasiklin (30 µg)	Gentamisin (10 µg)	Biyofilm ölç. (CRA)	Biyofilm ölç. (MPT)	mec A	ica A/ icaD	IS256	blaZ	aac- aph	erm A/B/C	cat 1 , cat 2	tet (K), tet (L), tet(M), tet(O)
32	BG 50	Yüzeysel	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BP	BOP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
33	BG 51	Yüzeysel	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BP	BKP	n	ica A, ica D	n	n	α	α	α	α
34	BG 52	Superfisyal	S	S	S	O	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BP	BZP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
35	BG 53	Superfisyal	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BP	BZP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
36	BG 56B	Derin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BZP	BKP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
37	BG 60	Yüzeysel	R	S	S	O	S	S	R	S	S	S	O	R	S	BZP	BOP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	α	α	tet(M)
38	BG 62	Derin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	O	R	S	BZP	BZP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	n
39	BG 67	Superfisyal	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	O	S	S	BN	BZP	mec A	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
40	BG 72	Derin	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BP	BKP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	α	α	α
41	BG 73	Superfisyal	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BZP	BZP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
42	BG 74B	Superfisyal	R	S	S	S	S	S	S	S	O	S	R	R	S	BZP	BKP	mec A	ica A, ica D	n	blaZ	α	erm B	α	n
43	BG 75	Superfisyal	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	O	S	S	BP	BKP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
44	BG 76	Yüzeysel	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	BN	BKP	n	ica D	n	blaZ	α	α	α	α
45	BG 78	Superfisyal	S	R	S	O	S	S	S	O	S	S	S	S	S	BP	BKP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
46	BG 79A	Yüzeysel	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	BZP	BKP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	α	α	tet(M)
47	BG 80B	Yüzeysel	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BP	BKP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
48	BG 81	Yüzeysel	R	S	S	S	S	S	S	S	O	S	S	S	S	BP	BKP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	n	α	α
49	BG 82	Superfisyal	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BZP	BZP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
50	BG 83	Yüzeysel	R	S	S	S	S	S	O	S	O	S	S	S	S	BP	BKP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	n	α	α

	Hasta no	Pyoderma türü	Penisilin (10 µg)	Oksasilin (1 µg)	Difloksasin (10 µg)	Enrofloksasin (5 µg)	Marbofloksasin (5 µg)	Orbifloksasin (10 µg)	Sulfisoksazol (300 µg)	Klindamisin (2 µg)	Eritromisin (15 µg)	Kloramfenikol (30 µg)	Doksisisiklin (30 µg)	Tetrasiklin (30 µg)	Gentamisin (10 µg)	Biyofilim ölç. (CRA)	Biyofilim ölç. (MPT)	mec A	ica A/ icaD	IS256	blaZ	aac-aph	erm A/B/C	cat 1 , cat 2	tet (K), tet (L), tet(M), tet(O)
51	BG 84	Superfisyal	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	BP	BZP	n	ica A, ica D	n	blaZ	aac-aph	α	α	tet(K)
52	BG 85	Yüzeysel	R	S	S	S	S	S	O	S	S	S	S	S	S	BP	BKP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	α	α	α
53	BG 86	Yüzeysel	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	O	R	S	BP	BZP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	α	α	tet(K)
54	BG 87	Yüzeysel	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BP	BKP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
55	BG 88B	Superfisyal	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	O	S	S	BP	BKP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
56	BG 89	Superfisyal	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BP	BKP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
57	BG 90	Superfisyal	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BZP	BOP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
58	BG 92	Superfisyal	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BZP	BKP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
59	BG 94	Superfisyal	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BP	BKP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
60	BG 95	Superfisyal	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BZP	BOP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
61	BG 103b	Yüzeysel	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BP	BKP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
62	BG 104	Yüzeysel	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	BZP	BN	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	erm B	cat1	tet(M)
63	BG 105	Yüzeysel	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BN	BN	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
64	BG 107	Yüzeysel	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	BP	BZP	mec A	ica A, ica D	n	blaZ	n	erm B	α	n
65	BG 108	Superfisyal	R	R	S	O	S	O	R	R	O	S	R	R	S	BP	BKP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	n	α	n
66	BG 112	Superfisyal	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BP	BZP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
67	BG 114	Derin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BZP	BKP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
68	BG 115	Superfisyal	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	O	R	S	BZP	BOP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	α	α	n

	Hasta no	Pyoderma türü	Penisilin (10 µg)	Oksasilin (1 µg)	Difloksasin (10 µg)	Enrofloksasin (5 µg)	Marbofloksasin (5 µg)	Orbifloksasin (10 µg)	Sulfisoksazol (300 µg)	Klindamisin (2 µg)	Eritromisin (15 µg)	Kloramfenikol (30 µg)	Doksisisiklin (30 µg)	Tetrasiklin (30 µg)	Gentamisin (10 µg)	Biyofilim ölç. (CRA)	Biyofilim ölç. (MPT)	mec A	ica A/ icaD	IS256	blaZ	aac-aph	erm A/B/C	cat 1 , cat 2	tet (K), tet (L), tet(M), tet(O)
69	BG 117	Derin	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	BN	BKP	n	ica A, ica D	n	n	α	α	α	n
70	BG 119	Superfisyal	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BZP	BKP	n	ica A	n	blaZ	α	α	α	α
71	BG 120	Superfisyal	R	S	S	S	S	S	O	S	S	S	S	S	S	BZP	BKP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	α	α	α
72	BG 122	Superfisyal	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	BZP	BKP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
73	BG 123	Superfisyal	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BP	BZP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
74	BG 124	Superfisyal	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	BN	BN	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
75	BG 125b	Superfisyal	S	S	S	O	S	S	O	S	S	S	S	S	S	BP	BN	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
76	BG 126b	Superfisyal	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	BN	BN	n	ica D	n	blaZ	α	α	α	n
77	BG 128	Superfisyal	S	S	S	S	S	S	S	O	O	S	S	S	S	BZP	BZP	n	ica A, ica D	n	α	α	n	α	α
78	BG 129	Superfisyal	R	S	S	S	S	S	R	O	S	S	S	S	S	BP	BKP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	α	α	α
79	BG 130	Derin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	BZP	BKP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	n
80	BG 131	Superfisyal	S	S	S	S	S	O	R	S	O	S	S	S	S	BP	BN	n	ica A, ica D	n	α	α	n	α	α
81	BG 132	Superfisyal	R	R	O	O	O	O	R	R	O	S	R	R	R	BZP	BOP	n	ica A, ica D	n	n	n	n	α	n
82	BG 133	Superfisyal	S	S	S	S	S	S	O	S	S	S	O	S	S	BZP	BN	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
83	BG 134	Superfisyal	S	S	S	S	S	S	R	S	O	S	S	O	S	BN	BN	n	ica A	n	α	α	n	α	n
84	BG 141	Superfisyal	R	S	O	S	S	O	R	S	S	S	R	R	R	BZP	BZP	n	ica A, ica D	n	blaZ	aac-aph	α	α	n
85	BG 143	Superfisyal	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	R	O	S	BP	BKP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	n	α	n
86	BG 144	Superfisyal	R	S	S	S	S	S	O	S	S	S	O	R	S	BN	BZP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	α	α	tet(M)

	Hasta no	Pyoderma türü	Penisilin (10 µg)	Oksasilin (1 µg)	Difloksasin (10 µg)	Enrofloksasin (5 µg)	Marbofloksasin (5 µg)	Orbifloksasin (10 µg)	Sulfisoksazol (300 µg)	Klindamisin (2 µg)	Eritromisin (15 µg)	Kloramfenikol (30 µg)	Doksisisiklin (30 µg)	Tetrasiklin (30 µg)	Gentamisin (10 µg)	Biyofilm ölç. (CRA)	Biyofilm ölç. (MPT)	mec A	ica A/ icaD	IS256	blaZ	aac- aph	erm A/B/C	cat 1 , cat 2	tet (K), tet (L), tet(M), tet(O)
87	BG 145	Yüzeysel	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	BP	BOP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	erm B	n	tet(M)
88	BG 149	Superfisyal	S	S	S	S	S	S	S	O	S	S	S	S	S	BN	BKP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
89	BG 152	Derin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BZP	BZP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
90	BG 153	Derin	S	S	S	S	S	S	R	O	O	S	S	S	S	BZP	BN	n	ica A, ica D	n	α	α	n	α	α
91	BG 154	Derin	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BZP	BOP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	α	α	α
92	BG 155	Derin	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	BN	BN	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	α	α	α
93	BG 156	Derin	S	S	S	S	S	S	O	O	O	S	S	S	S	BP	BZP	n	ica A, ica D	n	α	α	n	α	α
94	BG 162	Superfisyal	R	S	O	S	S	S	O	R	R	R	R	R	S	BN	BN	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	erm B	cat1	n
95	BG 165	Derin	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	BZP	BN	n	ica A, ica D	n	n	α	α	α	α
96	BG 166	Superfisyal	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	BZP	BN	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
97	BG 168	Superfisyal	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	O	R	S	BN	BZP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	erm B	n	n
98	BG 169	Derin	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	O	R	R	BZP	BKP	n	ica A, ica D	n	blaZ	aac- aph	erm B	n	n
99	BG 176	Superfisyal	R	R	S	S	S	S	O	O	S	S	S	S	S	BN	BZP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	α	α	α
100	BG 185	Superfisyal	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BZP	BZP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
101	BG 186	Superfisyal	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	O	BZP	BZP	n	ica A, ica D	n	n	α	n	n	n
102	BG 187	Derin	R	S	S	S	S	S	S	O	S	S	S	S	S	BP	BKP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	α	α	α
103	BG 192	Superfisyal	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BZP	BKP	n	ica A, ica D	n	A	α	α	α	α
104	BG 196	Superfisyal	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	BP	BZP	n	ica A, ica D	n	n	α	erm B ermC	n	n

	Hasta no	Pyoderma türü	Penisilin (10 µg)	Oksasilin (1 µg)	Difloksasin (10 µg)	Enrofloksasin (5 µg)	Marbofloksasin (5 µg)	Orbifloksasin (10 µg)	Sulfisoksazol (300 µg)	Klindamisin (2 µg)	Eritromisin (15 µg)	Kloramfenikol (30 µg)	Doksisiklin (30 µg)	Tetrasiklin (30 µg)	Gentamisin (10 µg)	Biyofilm olş. (CRA)	Biyofilm olş. (MPT)	mec A	ica A/ icaD	IS256	blaZ	aac- aph	erm A/B/C	cat 1 , cat 2	tet (K), tet (L), tet(M), tet(O)
105	BG 197b	Derin	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	BN	BOP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	erm B	n	n
106	BG 198	Derin	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	BZP	BZP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
107	BG 200	Derin	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	BP	BKP	n	ica A, ica D	n	blaZ	α	α	α	n
108	BG 202	Superfisyal	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BZP	BKP	n	ica A, ica D	n	α	α	α	α	α
109	BG 205	X	S	S	S	O	O	S	R	O	O	S	S	S	S	BZP	BKP	n	ica A, ica D	n	α	α	n	α	α

R: Dirençli, S: Duyarlı, O: Orta duyarlı, X: Pyoderma bilgisi kaydedilmedi, n: İlgili gen saptanmadı, α: İlgili gen incelenmedi (sadece fenotipik olarak direnç belirlenen izolatlarda ilgili gen bölgesi incelendi), CRA: Congo Red Agar, MTP: Mikrotiter Plate Test, BN: Biyofilm negatif, BZP: Biyofilm zayıf pozitif, BOP: Biyofilm orta derecede pozitif, BKP: Biyofilm kuvvetli pozitif, BP: Biyofilm pozitif.

## İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

### PYODERMA SAPTANAN KÖPEKLERDEN İZOLE EDİLEN Staphylococcus pseudintermedius TÜRLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

#### ORJİNALLİK RAPORU

<b>%9</b> BENZERLİK ENDEKSİ	<b>%8</b> İNTERNET KAYNAKLARI	<b>%4</b> YAYINLAR	<b>%3</b> ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
--------------------------------	----------------------------------	-----------------------	-------------------------------

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<b>nek.istanbul.edu.tr:4444</b> İnternet Kaynağı	<b>%1</b>
<b>2</b>	<b>docplayer.biz.tr</b> İnternet Kaynağı	<b>%1</b>
<b>3</b>	<b>Submitted to Istanbul University</b> Öğrenci Ödevi	<b>&lt;%1</b>
<b>4</b>	<b>acikerisim.uludag.edu.tr</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>5</b>	<b>avesis.istanbulc.edu.tr</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>6</b>	<b>fbe.duzce.edu.tr</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>7</b>	<b>cdn.istanbul.edu.tr</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>8</b>	<b>avesis.iuc.edu.tr</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>

