

TC
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BROİLER PİLİÇLERDEN CAMPYLOBACTER
İZOLASYONU VE GENOTİPLENDİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEDA TURTAY

2015

ONAY SAYFASI

Fırat Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof.Dr.Mustafa KAPLAN

Bu tez Yüksek Lisans standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof.Dr.Hasan Basri ERTAŞ

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi

olarak kabul edilmiştir.

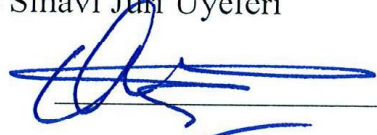
Prof.Dr.Hasan Basri ERTAŞ



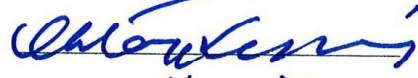
Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof.Dr.Adile MUZ



Prof.Dr.Oktay KESKİN



Prof.Dr.Hasan Basri ERTAŞ



TEŞEKKÜR

Eğitim sürem boyunca bilimsel desteklerini esirgemeyen, her konuda rahatlıkla ulaşp danıştığım, büyük desteklerini gördüğüm ve engin tecrübelerinden faydalandığım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hasan Basri ERTAŞ'a ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalındaki diğer hocalarıma, çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Burcu KARAGÜLLE'ye, Arş. Gör. Zeynep YERLİKAYA'ya ve verdikleri manevi destekten dolayı başta eşim olmak üzere aileme saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Seda Turtay

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLO LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
KISALTMALAR LİSTESİ	ix
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ	3
3.1. Tarihçe	6
3.2. Sınıflandırma	9
3.3. Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri	10
3.3.1. Görünüm ve Boyanma	10
3.3.2. Hücre Duvarı ve Antijenik Özellikleri	10
3.4. Üreme ve Kültür Özellikleri	11
3.5. Biyokimyasal Özellikleri	14
3.6. Fiziksel ve Kimyasal Etkenlere Duyarlılık	15
3.7. Campylobacter Enfeksiyonları (Campylobacteriosis)	16
3.7.1. Enfeksiyonun Bulaşması	16
3.7.2. Virulans Faktörleri ve Patogenez	17
3.7.3. Yaptığı Hastalıklar	18

3.7.3.1. İnsanlarda Campylobacteriosis	18
3.7.3.2. Hayvanlarda Campylobacteriosis	19
3.7.4. Campylobacter Enfeksiyonlarında Tanı	20
3.7.4.1. Direkt Tanı Yöntemleri	20
3.7.4.1.1. Örnek Alınması	20
3.7.4.1.2. Mikroskopik İnceleme	21
3.7.4.1.3. Kültür Ortamında İzolasyon	22
3.7.4.1.4. Campylobacter' lerin İdentifikasyonu	26
3.7.4.1.5. Dışkıda Antijen Aranması Esasına Dayanan Testler	27
3.7.4.1.6. Moleküler Tanı Yöntemleri	27
3.7.4.2. İndirekt Tanı Yöntemleri	32
3.7.5. Campylobacter Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi	32
3.7.5.1. Epidemiyolojik Açıdan Tiplendirme Yöntemleri	36
3.7.5.1.1. Fenotipik Yöntemler	37
3.7.5.1.2. Genotipik Yöntemler	41
4. MATERYAL VE METOT	45
4.1. Materyal	45
4.2. Çalışmada Kullanılan Besi Yerleri	46
4.3. Campylobacter İzolasyonu	47
4.4. Moleküler Analiz	48
4.4.1. DNA Ekstraksiyonu	48
4.5. Şüpheli İzolatların PCR İle İdentifikasyonları	49
4.6. PCR Ürünlerinin Jelde Yürütülmesi	50
4.7. RFLP Uygulamaları	51

4.7.1. Fla Gene Spesifik PCR	51
4.7.2. Restriksiyon Endonükleaz ile fla-geninin Kesilmesi	52
5. BULGULAR	53
5.1. İzolasyon Bulguları	53
5.2. İzolasyon esnasında Karşılaşılan Problemler ve Yapılan işlemler	54
5.3. PCR identifikasyonu	56
5.3. <i>fla</i> PCR sonuçları	57
4.4. Restriksiyon (fla-RFLP) Analiz Sonuçları	58
6. TARTIŞMA	61
7. KAYNAKLAR	71
8. ÖZGEÇMİŞ	80

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Campylobacter'lerin Sınıflandırılması	10
Tablo 2. Campylobacter'lerin Fenotipik Özelliklerine Göre Tanımlanmaları.	15
Tablo 3. <i>Campylobacter jejuni</i> izolasyonu için seçici besi yerlerinin içerikleri.	25
Tablo 4. <i>Termofilik campylobacter</i> türlerinin identifikasyonu.	27
Tablo 5. Campylobacter türlerinin konak tropizmi	35
Tablo 6. İzolasyon Bulguları	54
Tablo 7. Şüpheli Campylobacter izolatlarına uygulanan PCR sonuçları	56
Tablo 8. <i>C.jejuni</i> İzolatlarının <i>PtsI</i> ve <i>Hinf</i> restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucunda oluşan Profil Sayıları.	59

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1.** *C. jejuni* 'nin besi yerindeki görüntüsü. 26
- Şekil 2.** *C.jejuni* ve *C. coli*'ye ait agaroz jel elektroforez jel görüntüleri 57
- Şekil 3.** Fla genine spesifik PCR sonucunda elde edilen 1700 bp uzunluğudaki pozitif bantlar 58
- Şekil 4.** *C.jejuni* ve *C.coli* izolatlarının Hinf (üst sıra) ve PstI (alt sıra) restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmesi sonucu elde edilen profillerin agaroz jel görüntüsü 59

KISALTMALAR LİSTESİ

AFLP	: Amplified fragment length polymorphism
CAT agar	: Sefaperazon, amfoterisin B, teicoplanin agar
Cfu	: Colony forming units
ELISA	: Enzyme- Linked Immuno Sorbent Assay
EIA	: Enzim Immunoassay
FAFLP	: Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis
FTS	: Fizyolojik tuzlu su
GBS	: Guillain- Barre Sendromu
HUS	: Obstrüktif hepatit
IHA	: İndirekt hemaglutinasyon
KFT	: Kompleman birleşme reaksiyonu
MFS	: Miller Fisher Sendromu
MIC	: Minimum Inhibitory Concentration
MCCDA	: Modified Charcoal Cefoperazon Deoxycholate Agar
MLST	: Multilocus Sequence Typing
MEE	: Multilocus Enzyme Electrophoresis
NAA	: Nükleik Asit Amplifikasyonu
PFGE	: Pulsed- field jel elektroforez
PCR	: Polymerase Chain Reaction
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RAPD-PCR	: Random Amplification of Polymorphic DNA-PCR
TS/HS	: Isıya dirençli

TL/HL : Isiya duyarlı

TSI : Triple Sugar Iron Agar

VBNC : Viable but Non-Culturable

1. ÖZET

Bu çalışmada, mezbahada kesilen Broiler piliçlerin bağırsak ve safralarından alınan örneklerde *Campylobacter coli* ve *Campylobacter jejuni* izolasyonu yapılacaktır. İzole edilen etkenler Polymerase Chain Reaction (PCR) yöntemi kullanılarak identifiye edilecek. İzolatlar arasındaki genetik farklılığı ortaya koymak amacıyla da flagellin genine spesifik yapılan Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) yöntemi ile genotiplendirmeleri yapılacaktır.

Campylobacter türleri insanlarda, gıda infeksiyonu ve intoksikasyonlarına, çiftlik hayvanlarında ise abortuslara neden olmaktadır. *Campylobacter*ler tarafından meydana getirilen bu infeksiyonlarla, etkin bir şekilde mücadele edilebilmesi için etkenin doğru ve hızlı bir şekilde tespit edilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada kullanılacak yöntemler yardımıyla, *Campylobacter*lerin kanatlılardaki kolonizasyonunu belirlemek amaçlanmaktadır.

Çalışmada 100 adet Broiler tavuktan kesim esnasında, 100 safra ve 100 bağırsak olmak üzere 200 örnek toplanmıştır. Laboratuvarda aseptik koşullarda *Campylobacter* Blood Free Agar Base (CCDA agar) kullanılarak zenginleştirme yapmadan doğrudan ekim yapılmıştır. *Campylobacter* şüphesiyle izole edilen kültürler *Campylobacter jejuni* ve *Campylobacter coli* spesifik PCR yöntemi ile identifiye edilecek ve identifiye edilen kültürler, PCR-RFLP yöntemi ile flagenindeki polimorfizm saptanarak tiplendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Campylobacter*, PCR, Broiler, RFLP.

ABSTRACT

Isolation and Genotyping of Campylobacter from Broiler Chickens

In this study, Campylobacter coli and Campylobacter jejuni isolation will be made after samples taken from the intestine and galls of Broiler Chickens slaughtered in a slaughterhouse. The factors isolated will be identified by using Polymerase Chain Reaction (PCR) method. In order to reveal the genetic difference between isolates, genotyping will be performed by means of Polymerase chain reaction - Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method which is specifically applied to flagellin gene.

Campylobacter species cause food infection and intoxication in humans and abortus in livestock. In order to combat effectively with infections generated by Campylobacters, the agent must be detected in a correct and quick way. In this study, the aim is to determine the colonization of Campylobacters in poultry with the help of methods to be used.

In this study, during the slaughter from 100 Broiler Chickens, 200 samples, including 100 bile and 100 intestinal samples, will be collected. Under aseptic conditions in the lab, direct seeding without enrichment will be performed by using Blood Free Campylobacter Agar Base (CCDA agar). Cultures isolated because of Campylobacter suspicion, will be identified with Campylobacter jejuni and Campylobacter coli specific PCR method and cultures identified will be typed after determining polymorphism in the flagellin with PCR-RFLP method.

Keywords: Campylobacter, PCR, Broiler, RFLP.

3. GİRİŞ

Campylobacter'ler son yıllarda gerek tıp hekimliği gerekse veteriner hekimliğinde en çok ilgi çeken mikroorganizmalardan biri olmuştur. Bunun nedeni geliştirilen yeni izolasyon tekniklerinin uygulanmaya başlanması sonucu Campylobacter türlerinin birçok enfeksiyon hastalıklarında etiyolojik ajan olduğunun anlaşılmasıdır. Bu tür enfeksiyonlara insanların ve hayvanların enteritisleri örnek verilebilir (1). Enfekte besi hayvanlarında Campylobacter'lerin flora bakterisi gibi davranması ve kontamine gıdalarda da kontaminasyon belirtileri olarak sayılan koku ve renk değişikliği gibi gözle görülür bulguların olmaması, enfeksiyonun gıda yoluyla yayılmasını oldukça kolaylaştırmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, insanlarda enfeksiyona neden olan Campylobacter'lerin 42°C' de üreyebilen türler olduğu ortaya konulmuş ve bu türlere de 'Termofilik Campylobacter'ler adı verilmiştir (2).

Bu termofilik türler, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* ve *Campylobacter upsaliensis* olarak tespit edilmiş, özellikle *Campylobacter coli* ve *Campylobacter jejuni*'nin dünyada insanlarda akut diyarenin nedeni olduğu ortaya konulmuştur (3).

Campylobacter cinsi bakteriler insanlarda çoğunlukla kendi kendini sınırlandıran basit bir sekretuar ishale sebep olurken, bazende kanlı mukuslu dışkılamayla seyreden dizanteri şeklinde ortaya çıkmaktadır (4,5,6). Ayrıca hastanın yaşına ve bakterinin virulansına göre değişmekle beraber 2-5 yaş arası çocuklarda periferik nöronlarda demiyenilizasyon ve güç kaybı ile seyreden Guillain Barre sendromu ve Reaktif Artrit gibi sekellerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (7). Campylobacter enfeksiyonlarının önemini artıran bir diğer sebep,

özellikle insanlarda ciddi enfeksiyonlarda kullanılan kinolonlar, beta-laktam grubu antibiyotikler ve makrolidler gibi bir çok antibiyotiğe karşı çoklu ilaç direnci gösteren suşların giderek artan oranıdır (8). Bu tür suşların etkisiyle oluşan enfeksiyonlar kadar, besi döneminde, tamamen et üretimine katkı amaçlı olarak kullanılan antibiyotiklerin, gerek et ile düşük konsantrasyonlarda alınarak insan intestinal florasındaki bakterileri provoke etmesi, gerekse hayvan intestinal florasından direk direnç geliştirmiş olarak alınan bakterilerin özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda oluşturacakları enfeksiyonlar önemli bir tedavi problemini ortaya çıkarmaktadır (9). Bütün bu gerekçeler *Campylobacter* enfeksiyonlarının önemini artırmakta ve başta *C. coli* olmak üzere *Campylobacter*'lerin yol açtığı enfeksiyonların tanımlanmasında duyarlı ve özgül mikrobiyolojik tanının önemli ve gerekli olduğunu ortaya koymaktadır. *Campylobacter*'lerin mikroaerofilik özellikte olması ve dışkı florasında bulunan çok sayıda farklı bakteri grubuyla birlikte olması, bu bakterilerin klasik kültür yöntemiyle dışkı kültürlerinden izolasyon şansının önüne geçmiştir. Skirrow ve arkadaşlarının 1980'li yıllarda selektif besi yerleri kullanarak mikroaerofilik şartlarda *Campylobacter*'leri izole etmeleri ile bu mikroorganizmaların, taksonomik, patofizyolojik ve epidemiyolojik özellikleri ile ilgili çalışmalar artmıştır. 25 yılı aşkın süredir yapılan çalışmalar, *Campylobacter*'lerin gerek gastrointestinal sistemde oluşturdukları primer enfeksiyonlar ve komplikasyonları, gerekse intestinal sistem dışı sekelleri hakkında önemli bilgilere ulaşılmıştır. Bu çalışmalar ışığında özellikle hayvansal gıdaların tüketimi sonucu ortaya çıkan çoğu akut gastroenterit olgusunun *Campylobacter*'ler tarafından oluşturulduğu ortaya konulmuştur (10).

Bu çalışmada; insan ve hayvan sağlığını yakından etkileyen ve zoonoz bir hastalık etkeni olan *Campylobacter* türlerinin broiler piliçlerden tespiti, identifikasyonu, tiplendirilmesi amaçlandı. broiler piliçlerde *C. jejuni* ve *C. coli* türlerinin görülme sıklığını tesbit etmek için safra ve barsaklardan *Campylobacter* şüphesiyle izole edilen etkenler, tür spesifik PCR yöntemi ile identifiye edilerek bu izolatların PCR-RFLP yöntemi ile genotiplendirilmesi yapıldı. Böylelikle izolatlar arasındaki genetik yakınlığı belirlemek suretiyle bakterinin kolonizasyon modeli ile ilgili fikir edinilmeye çalışıldı.

3. GENEL BİLGİLER

Campylobacter jejuni ve *Campylobacter coli* günümüzde gıda kaynaklı bakteriyel enfeksiyonların en sık nedeni olarak gösterilmekte ve diyare ile ilişkili hastalıkların başlıca etkeni de *Campylobacter* türleri olarak bilinmektedir. Bu iki türün klinik olarak ayrılması güçtür. Birçok laboratuvar da rutin olarak identifikasyonları yapamadığı için *C. jejuni* ve *C. coli*'nin oranları bilinmemektedir (11).

C. jejuni sağlıklı evcil ve yabani bir çok hayvan türünün sindirim sistemi florasında sıklıkla izole edilmektedir. Bu konuyla ilgili gerek Türkiye'de gerekse yurt dışında çok sayıda araştırma yapılmıştır. Araştırma sonuçları genellikle *C. jejuni*'nin sindirim sistemi florasında yüksek oranda olduğunu göstermektedir (12).

C. coli enfeksiyonlarının da uzun süre hastanede yatışa neden olduğu ve enfeksiyon sonrası üritan barsak sendromu ile yangısal barsak hastalığının gelişimi arasındaki ilişkinin belirlenmesi *C. coli*'nin de hem ekonomik hem de önemli bir halk sağlığı problemi olarak ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Moleküler tabanlı çalışmalar *C. coli* ve *C. jejuni* enfeksiyonlarının en önemli kaynağının kanatlılar olduğunu göstermektedir (13).

3.1. Tarihçe

İnsanlarda *Campylobacter* enfeksiyonları ile ilgili ilk bilgilere Theodor ESHERICH'in 1886 yılında yazmış olduğu makalelerde rastlanmaktadır. Bu araştırmacı 'Kolera Infantum' olarak belirttiği hastalıktan ölen bir grup çocuğun dışkısında vibrioya benzer spiral şekilli bakterileri görmüş, fakat bu

mikroorganizmayı katı besi yerinde üretemediği için hastalık etkeni olarak tanımlamamıştır (10).

Campylobacter'lerin hayvanlarda abortuslara ve ishale yol açtığı XX. yüzyılın başlarından beri bilinmektedir. İlk kez 1909 yılında İngiliz asıllı veteriner hekimler Mc Fadyean J. ve Stockman S. düşük yapan koyunların plasentasında vibrioya benzeyen bir bakteri bulduklarını bildirmişler ve bu mikroorganizmayı 'Vibrio fetus' olarak adlandırmışlardır (14). Daha sonra benzer mikroorganizma 1919' da Smith T. tarafından abort yapmış sığır plasentasından da izole edilmiştir (15).

1931 yılında, Jones F.S. ve arkadaşları, Smith' in tanımlamış olduğu vibrioları, dizanterili sığırların dışkısında tespit etmişler ve *Vibrio jejuni* olarak isimlendirmişlerdir (16). Yine Doyle L.P. tarafından dizanterili domuzlarda benzer vibriolar izole edilmiş fakat *Vibrio coli* olarak adlandırılmıştır (17).

Campylobacter' lerin insanlarda da hastalık etkeni olabildiği ilk kez, 1947' de Vinzent R. ve arkadaşları tarafından nedeni bilinmeyen ateş ile hastaneye yatırılan ve ikisi ölen üç gebe kadının kanından *V. fetus* izole edilmiştir (10).

1957 yılında King E.O. adlı araştırmacı bu mikroorganizmaları ishalleri çocukların kanında göstermiş, fakat klasik vibriolardan biyokimyasal ve antijenik yönden farklı olduğu için, bu vibrioları '*Related Vibrio*' olarak tanımlamıştır. Araştırmacı bu tür vibrioların ishal etkeni olduğunu ancak yavaş üredikleri için dışkı örneklerinden izolasyonlarının yapılamadığı fikrini ortaya koymuştur (18). Selektif kültür yönteminin geliştirildiği 1972 yılına kadar 12 '*related vibrio*' vakası bildirilmiştir (19).

1963'te Sebalt M. ve Veron M. Related vibrio'ların G+C oranının bilinen halofilik vibriolardan farklı olduğunu belirlemiş ve bu mikroorganizmaların *Campylobacter* (= kıvrık bakteri) adı altında yeni bir cins olarak adlandırılmasını önermişlerdir. *Campylobacter fetus*un yer aldığı *Campylobacter* cinsi içine daha sonra *Vibrio coli* ve *Vibrio jejuni* de dahil olmuştur (10).

Campylobacter jejuni 1968'de ilk defa Dekeyser P. ve arkadaşları tarafından Brüksel'de bulunan St Peter Üniversite Hastanesi' ne ateş ve şiddetli ishal şikayeti ile gelen bir kadının önce kanında daha sonra dışkıında membran filtrasyon tekniğinden yararlanılarak izole edilmiştir. Aynı hastaya ait numuneler, 1973 yılında Butzler J.P. ve ark. tarafından da aynı yöntemler kullanılarak incelenmiş ve Dekeyser P. ve arkadaşlarının sonuçları doğrulanmıştır. Bu araştırmacılar bir araya gelerek ortak bir çalışmayla filtrasyon yöntemini kullanarak 3800 ishalleri çocuğun % 5,3' ü ile, 7200 sağlıklı insanın %1,6'sının dışkıından *Campylobacter* türü mikroorganizma izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışma doğrultusunda *C. coli* ve *C. jejuni* suşlarına karşı geliştirilen antiserumların kullanıldığı Kompleman Fiksasyon ve aglütinasyon testleri ile *C. jejuni* izolatları antijenik olarak tiplendirilmiştir. İnsanlardan izole edilen *Campylobacter* izolatları ile tavuk, domuz ve koyun gibi hayvanlardan izole edilen *Campylobacter* izolatları arasındaki antijenik benzerlikler ortaya konulmuştur. Bununla birlikte *Campylobacter*'lerin neden olduğu ishallerin patofizyolojisi ile ilgili çalışmalar hız kazanmış, *C. jejuni* suşlarının invaziv yetenekte olduğu kümes hayvanları üzerinde gösterilmiştir. Fakat daha sonraki çalışmalarda *C. jejuni* suşlarının kümes hayvanlarında, intestinal sistemde gerek lümeninde gerek mukus tabakası ve epitel yüzeyindeki kolonizasyonları sonrasında, hücreye invaze

olmadıkları, bir flora bakterisi gibi davranıp, ancak aynı dokuya ait hücreler arasında bulunan, çoğunlukla simetrik yapıdaki stoplazmik bağlantıların tahribi halinde parasellüler yolla laminapropia'ya geçiş yaptıkları bildirilmiştir (19-20).

1977' de Skirrow M.B. filtrasyon tekniği kullanmaya gerek kalmadan Campylobacterlerin kolayca izolasyonunu sağlayan selektif kültür yöntemini geliştirmiştir. Bu gelişme ışığında Campylobacter'lere yönelik çalışmalar hızlanmış, tüm dünyada klinik ve çevresel örneklerden çok sayıda yeni Campylobacter türlerinin izolasyonu yapılmış, genusa ait çok sayıda türün genomik haritası çıkarılmıştır (20).

3.2. Sınıflandırma

Campylobacter'lerle ilgili ilk sınıflandırma, 1963 yılında bu mikroorganizmaların vibriolardan farklı bir tür olduklarını söyleyen, Sebald M. ve Veron M. tarafından yapılmıştır. Bu iki araştırmacı bu mikroorganizmaların fenotipik özelliklerini dikkate alarak *Sipirillaceae* familyası içerisinde *C. fetus* ve *C. bubulus* (*C. sputorum*) olarak adlandırdıkları iki cins içine yerleştirmişlerdir (21). Bu sınıflandırmadan on yıl sonra biyokimyasal ve immünolojik özelliklerine bakılarak, G+C oranları göz önüne alınmış, bu şekilde sınıflandırma yeniden düzenlenerek, daha önce *V. jejuni* ve *V. coli* olarak sınıflandırılan iki tür *C. jejuni* ve *C. coli* adı verilerek Campylobacter cinsi içine dahil edilmiştir (22).

Bakterilerin sınıflandırılmasında en son olarak fenotipik özelliklerinde daha çok, bakteri genomundaki (DNA) yüksek derecede korunmuş dizilerin özellikle de, doğal evrimsel gelişimi gösteren 16S rDNA dizilerinin baz olarak alındığı genotipik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Bununla birlikte 2007 yılında

yapılan son sınıflandırmaya göre, Campylobacter’ler tek bir genus içine yerleştirilmiş olup 17 tür ve 8 alt tür içermektedir (23). (Tablo 1)

Tablo 1. Campylobacter’lerin Sınıflandırılması (23)

Domain	: <i>Bacteria</i>
Phylum	: <i>Proteobacteria</i>
Sınıf	: <i>Epsilonproteobacteria</i>
Order	: <i>Capmylobacterales</i>
Aile	: <i>Campylobacteraceae</i>
Genus	: <i>Campylobacter</i>

3.3. Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri

32.3.1. Görünüm ve Boyanma

Campylobacter’ler Gram-negatif, küçük, “S” harfi, helikal veya daha uzun spiral, nadiren eğik çomakçıklar şeklinde, sporsuz, kapsülsüz, aside dirençli olmayan, unipolar veya bipolar flagellaları nedeniyle hareketli, 0.2-0.5 µm genişliğinde ve 0.5-5 µm uzunluğundadırlar ve bir veya daha fazla helikal kıvrım yapabilen mikroorganizmalardır. Alkalen-metilen mavisi, kristal viyole ve karbol fuksinle iyi boyanırlar. Fimbria ve pilusları yoktur. Plazmid taşırlar ve bazı plazmidleri antibiyotik dirençliliği ile ilişkilidir. DNA’larının G+C oranı termofilik türlerde %30-36, diğer türlerinde %29- 46’dır (24, 25).

3.3.2. Hücre Duvarı ve Antijenik Özellikleri

Campylobacter’lerin hücre duvarı, dışta lipoprotein tabaka, ortada lipopolisakkarid tabaka ve iç tarafta mukopeptit tabakadan oluşur (Gram negatif). Dış membranda yer alan fosforile glikolipidlerden meydana gelen

lipopolisakkarid ya da lipooligosakkarid yapı, *Campylobacter* türlerinin, majör yüzey antijenlerini içermektedir. Lipopolisakkarit tabakada var olan ve tekrarlayan oligosakkarit ünitelerinin lineer birleşmesinden oluşan O-polisakkarid zinciri anomerik konfügurasyonunda ve tekrarlayan şeker ünitelerinde değişiklikler göstererek O-antijenini serbest bırakmaktadır (26). Fakat klinik ve çevresel örneklerden elde edilen *C.jejuni* suşlarının üçte ikisinde, hücre duvarı lipopolisakkarit yerine O-polisakkarid zincirini ihtiva etmeyen, kor-oligosakkarid ve lipid- A'dan oluşan ve bu nedenle daha düşük moleküler ağırlığa sahip olduğu bildirilen lipooligosakkarid yapı bulunmaktadır. Hem lipopolisakkarid hemde lipooligosakkaridin yapısında bulunan ve kısa heteroşeker dizilerinden oluşan koroligosakkaridleri de antijenik varyasyonlar göstermektedir (27).

*Campylobacter*ler'in flagellasını oluşturan ve protein yapıda olan flagellin de bir diğer önemli yüzey antijenidir. *Campylobacter* enfeksiyonları esnasında, flagelline karşı intestinal (IgA) ve serum (IgM ve IgG) antikorlarının oluştuğu bilinmektedir (28).

3.4. Üreme ve Kültür Özellikleri

Campylobacter'ler kapnofilik, mikroaerofilik mikroorganizmalar olup, en iyi 37°C de % 5-10 CO₂, % 5 H₂ ve % 85 N₂ içeren atmosferde, 48-72 saatte ürerler. Atmosferdeki CO₂ miktarı türler arasındaki üremenin optimizasyonu için önemlidir. DNA sentezinde görevli oksijen bağımlı ribonükleotid redüktaz enziminin aktivasyonu için, % 5-15 oksijen konsantrasyonuna ihtiyaç duyan *C. jejuni* ve *C. coli* yüksek düzeyde oksijen yokluğunda ve strik anaerob şartlarda üremesini gerçekleştiremez. Mikroaerofilik ortamlar, desikatör içerisine mum yerleştirilmesi, anaerobik jarların havasının alınıp yerine % 5 O₂, % 10 CO₂ ve %

85 N₂ gaz karışımlarının verilmesi ya da Campy-Pack, Campy-Gen gibi ticari olarak üretilen kullanıma hazır, gaz üreten iyon zarflarının yerleştirilmesi ile ortam hazırlanır (24).

C. jejuni ve *C. coli* gibi insanlarda ishale neden olan türler, hem 37°C de hem de 42°C de üreyebilirler ve bu termofilik özellikleri nedeniyle diğer türlerden ayırt edilirler. Termofilik türlerin üremeleri 37°C'nin altında oldukça yavaşlamaktadır. Campylobacter'lerin neden olduğu enterit vakalarının hemen hepsinden termofilik türler sorumludur. Kültür plaklarının 42 °C de inkübasyonu ile kullanılan materyalde bulunabilecek diğer Campylobacterler ile flora bakterilerinin üremesi baskılanırken, termofilik türlerin izolasyonu kolaylaşabilmektedir (29).

Campylobacter'lerin DNA sının diğer bakterilere göre daha küçük olması nedeniyle metabolik aktiviteleri daha yavaş ve seçicidir. Campylobacter'ler güçlü oksidaz aktivitesine sahip olmalarına rağmen, heksoz şekerlerinin glikolizinde önemli role sahip olan 6-fosfofruktokinaz enzimleri bulunmamaktadır. Bu nedenle karbonhidratları oksidatif yada fermentatif yolla metabolize edemezler. Üreme için gerekli olan enerjiyi trikarboksilik asit döngüsünden elde ederler. Döngüye katılan karbon ve nitrojeni aminoasitlerden ve havada bulunan karbondioksitten sağlarlar. Bu döngü tamamlandığında biyosentetik bileşenlerin oluşumu ve elektron transport zincirine elektron sağlanması gerçekleşmiş olur. Karbon metabolizmasının son ürünleri, asetat, format ve laktattır (30). Campylobacter türleri arasında, trikarboksilik siklusunun tam yada kısmen gerçekleşmesinde farklılıklar vardır. Metabolik defekt nedeni ile *in vitro* şartlarda basit besi yerlerinde üretilmeleri oldukça zordur. Üremenin optimizasyonunu sağlamak için

besi yerine protein, yağ ve eser element kaynağı olarak, %7-10 oranında defibrine at, koyun veya insan kanı ve B vitamin kompleksleri, Campylobacter' ler için toksik olduğu bilinen süperoksit anyonları ve hidrojen peroksit gibi oksijen radikallerini nötralize etmek içinde şarkoal, hematin, hemin, ferröz sülfat, sodyum metabisulfit ve sodyum piruvat karışımlarından oluşan supplementler ilave edilmektedir. Ayrıca besi yerlerine katılan defibrine kan metabolik ihtiyaçların yanı sıra besi yerinde biriken toksik oksijen radikallerini yıkan, katalaz, peroksidaz ve süperoksit dismutaz enzimlerinin de ihtiva etmektedir (31, 32).

Dışkı gibi polimikrobiyal floraya sahip numunelerden Campylobacter' lerin izolasyonunu yaparken, metabolik aktiviteleri daha yüksek olmasından kaynaklı daha hızlı ve bol miktarda üreyen diğer bağırsak bakterilerinin de bulunabilmesinden dolayı besi yerlerinin yalnızca metabolik yönden optimizasyonunu sağlamak yeterli olmaz. Numunedeki istenmeyen diğer bakterileri elimine edebilmek amacıyla numunenin ya 0,45 ve 0,25 µm çapındaki membran filitrelerden süzülmesi ya da üretme besi yerlerinin içerisine basitrasin, sefalothin, sefazolin, kolistin, novobiosin, polymiksin rifampisin, trimethoprim ve vankomisin gibi Campylobacter'lerin dirençli, diğer bağırsak bakterilerinin ise duyarlı olduğu antimikrobik karışımlar ilave ederek istenmeyen bakterileri uzaklaştırmak gerekmektedir (29).

Örneklerin uygun şartlarda hazırlanmış besi yerlerine ekimi yapıldıktan sonra besi yerleri 24-48 saat süreyle mikroaerofilik ortamda inkübasyona bırakılır. Bu süre sonunda saydam, mukoid, hemoliz yapmayan Campylobacter kolonileri gözle görünür hale gelir. Bunun yanında besi yerlerinin özellikleri koloni morfolojisini etkilemektedir. Nem oranı düşük besi yerlerinde 1-2 mm çapında

düzgün, granüler tarzda, gri ya da kahverengi renge sahip parlak koloniler oluşmakta, nem oranı yüksek besi yerlerinde çapı 10 mm'ye kadar ulaşabilen basık, yaygın, düzensiz kenarlı ve gri renkte formlar oluşmaktadır (24, 33).

Campylobacter'ler besin yetersizliği, uygun olmayan sıcaklık ve aerob ortam gibi olumsuz şartlarda mikroskopta kokoid şekilde görülen canlı fakat kültürü yapılamayan VBNC (=Viable but non culturable) formuna dönüşmektedir. *C. jejuni* VBNC formuna *C. coli*'ye göre daha hızlı dönüşmekte ve bu şekilde yüzey sularında uzun süre bulunabilmektedir. Kültür plağındaki Campylobacter'lerin hepsi kokoidal forma dönüştüğünde pasajlandıklarında üretilmemektedir. Fakat VBNC formunda alınan *C. jejuni*'nin intestinal fazdan sonra tekrar kültürünün yapılabilmesi, adhezyon ve enteropatojenite özelliğini yeniden kazandığı, hayvanlar üzerinde deneysel olarak gösterilmiştir (34).

3.5. Biyokimyasal Özellikleri

C. gracilis'in dışında diğer tüm Campylobacter'ler oksidaz pozitifdir. Bununla birlikte, katalaz negatif ya da zayıf katalaz özelliği gösteren *C. upsaliensis* hariç diğerlerinin hepsi katalaz pozitifdir. Campylobacter'lerin lipaz aktiviteleri olmadığı gibi, jelatini ve üreyi de hidroliz yetenekleri yoktur. Karbonhidratları kullanamadıklarından dolayı Voges Proskauer ve metil red testlerine negatif yanıt vermektedirler. Nitratları redükte edebilirler. Pigment üretemezler (24).

Campylobacter'lerin identifikasyonu için, % 1 glisin ve % 3,5 NaCl varlığında üreyebilme, TSI agarda H₂S oluşturma, nitrat redüksiyonu, hippuratın hidrolizi ve ısı tolerans testleri gibi fenotipik özelliklerden yararlanılmaktadır (Tablo 2) (35).

Tablo 2. Campylobacter'lerin Fenotipik Özelliklerine Göre Tanımlanmaları (36).

Biyokimyasal											Üreme	Tolerans		Duyarlılık				
	İnkü.asyon sıcklığı °C	Flagella	Oksidaz	Katalaz	Hippurat	Nitrat	H2S(Kurşu)	H2(Agar)	H2S (TSI agar)	Selenit	İndoksil	25°C 25-30°C	42°C	%3,5NaCl	%1 Glisin	H2S Gereksinim	Nairiksik Asit	Sefelotin
<i>C. fetus</i>	33-35	MP	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	R	S
<i>C. venerealis</i>	33-34	MP	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	R	S
<i>C. jejuni</i>	29-32	BP	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	S	R
<i>C. coli</i>	31-33	BP	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	S	L
<i>C.lari</i>	31-33	BP	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	R	R
<i>C.upsaliensis</i>	32-36	BP	+	-	-	+	+	-	+	+	-	d	-	-	d	-	S	S
<i>C.helveticus</i>	34	BP	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	S	S
<i>C. bubulus</i>	29-30	BP	+	-	-	+	+	+	-	-	-	d	+	+	+	-	R	S
<i>C. fecalis</i>	30-32	MP	+	+	-	+	+	+	+	-	-	d	-	-	+	-	R	S
<i>C. sputorum</i>	30-31	MP	+	-	-	+	+	+	-	-	-	d	-	-	+	-	S	S
<i>C.hyointestinalis</i>	35-36	MP	+	+	-	+	+	+	+	-	d	+	-	-	+	-	R	S
<i>C.mucosalis</i>	38-39	MP	+	-	-	d	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	R	S
<i>C.hyoilei</i>	35	BP	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	S	R
<i>C.concisus</i>	38-39	MP	+	-	-	d	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	R	R
<i>C.showae</i>	45-46	P	+	+	-	+	+	-	?	+	-	+	-	-	d	+	R	S
<i>C.rectus</i>	42-46	MP	+	-	-	+	+	+	?	+	-	-	-	-	+	+	R	?
<i>C.curvus</i>	42-46	MP	+	-	-	+	+	?	+	-	+	-	-	+	+	+	R	?

d: değişken, ?: bilgi yok, S: duyarlı, R: dirençli

3.6. Fiziksel ve Kimyasal Etkenlere Duyarlılık

Campylobacter'ler fiziksel ve kimyasal etkilere karşı oldukça duyarlıdır.

Doğrudan güneş ışınlarına maruz kalma, oksijen konsantrasyonu, kuruluk ve ısı farklılıkları gibi fiziksel olumsuzluklar ile, yüksek ve düşük pH (pH > 7.8 veya pH < 4.5), % 1'lik Sodyum hipoklorit, % 70'lik ethanol, % 0,5'lik gluteraldehit, % 2'lik formaldehit, % 0,5' lik iyot ve % 0,5'in üzerindeki NaCl konsantrasyonu

gibi, kimyasal ajanların düşük konsantrasyonları mikroorganizmayı kısa sürede inaktive eder. Hernekadar termofilik *Campylobacter* suşları 30°C altında üreyemezlerse de güneş ışığı ile direkt temasın olmadığı ve kimyasal dezenfektan içermeyen sularda ve gıda örneklerinde 4°C’de bir hafta, - 20°C’ de üç ay, piliç etinde -18° C’ de iki ay, -20 °C’ de oniki hafta, -15 °C’ de otuz hafta canlılıklarını korurlar (37).

*Campylobacter*ler, makrolidler ve kinolon grubu antimikrobik’lere genellikle duyarlı, sefalotin, sefaperazon, sefazolin gibi sefalosporin grubu antimikrobiklerle trimetoprim karşı dirençlidirler (38).

3.7. *Campylobacter* Enfeksiyonları (*Campylobacteriosis*)

Campylobacteriosis, insanlarda termofilik *Campylobacter* türlerinin sıklıkla fekal oral yolla bulaşması sonucu ortaya çıkan ve basit sekretuar tip bir ishalden kanlı, mukuslu ishal ile karakterize bazen fekal seyreden dizanterik formda ishallere kadar değişen klinik formlarda seyreden bir enfeksiyon hastalığıdır (39).

2.7.1. Enfeksiyonun Bulaşması

Campylobacter enfeksiyonları fekal oral yolla bulaşmaktadır. Enfeksiyon kaynağı genellikle (% 80-85) enfekte hayvanların et, süt, yumurta gibi ürünleri ile bu hayvanların intestinal yollardan kontamine gıda ve sulardır. Tüm yiyecekler içinde özellikle tavuk eti bu enfeksiyonun en önemli kaynağı olarak sorumlu tutlmaktadır. Enfeksiyon, *Campylobacter*’ lerle kontamine olmuş az pişmiş etin tüketimi veya çiğ etle temas eden ellerin ağza teması ile bulaşabilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri’inde (ABD) marketlerde kullanıma hazır satılan

tavuk etlerinin % 95'inin İngiltere'de % 83'ünün, İsveç'te ise tamamının *C. jejuni* ile kontamine olduğu bilinmektedir (40, 41).

Düşük metabolik aktivitelerinden dolayı Campylobacterlerin diğer gıda kaynaklı gastroenterit etkenleri gibi yiyecekler içerisinde kolay üreyemediği bu nedenle salgınlardan çok sporadik enfeksiyonlara yol açtığı bildirilmektedir. Salgınlar genellikle bahar aylarında ortaya çıkmakta ve genellikle aile içi seyretmektedir.

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) Campylobacter salgınları ile yapmış olduğu bir araştırmada; 1978 ile 2003 yılları arasında ortaya çıkan Campylobacterlere bağlı salgınlar literatürler ve Uluslararası Halk Sağlığı kuruluşlarının verileri esas alınarak değerlendirilmiştir. Toplam 907 Campylobacter salgınının belirlendiği bu araştırmada, salgınlar, kaynağına göre kümes hayvanları ve ürünleri, sığır veya domuz eti, et ürünleri, deniz ürünleri, süt, su, hazır gıdalar ve kaynağı belirli olmayan salgınlar olmak üzere belirli başlıklar altında toplanmıştır. Bu salgınların % 60'ında salgınların kaynağı belirlenememiş, kaynağı belirlenen salgınlar içerisinde ise en sık olarak süt ve su kaynaklı salgınların görüldüğü tespit edilmiştir (42).

3.7.2. Virulans Faktörleri ve Patogenezi

En önemli insan patojeni olan *C.jejuni*'nin NCTC 11168 suşunun tam genom analizi yapılmış fakat Campylobacter'lere ait virulans faktörleri ile Campylobacter enfeksiyonlarının patogenezi tam olarak ortaya konulamamıştır. Campylobacter türlerinin genomik yapılarının, büyük ölçüde tür içi varyasyonlar göstermesi virulansla ilgili faktörlerin tespitini zorlaştırmaktadır (43). Fekal oral yolla bulaşan Campylobacter'ler duyarlı kişilerde öncelikli olarak ileum ve

jejunum epiteli olmak üzere bağırsak epiteline kolonize olarak, akut lokalize yangısal cevaba yol açmaktadır. Sekretuar tip ishal tablosunu ortaya koyan bu durum, ilerleyen enfeksiyonlarda epitelyum hasarında ortaya çıkmasıyla, hastalığı dizanterik forma dönüştürebilmektedir. Hastalığın prognozunda Campylobacter suşunun virulansı kadar konağın duyarlılığı da etkindir (44).

3.7.3. Yaptığı Hastalıklar

3.7.3.1. İnsanlarda Campylobacteriosis

Hastalık etkeni insanlara direkt veya indirekt yolla geçmektedir. Direkt bulaşmada insanların hasta hayvanlarla teması söz konusu olmakla beraber, indirekt bulaşmada, yeterli düzeyde ısıtılmış işlem görmemiş kanatlı ürünleri, sığır ve domuz eti, çiğ süt, kontamine yüzey suları, klorlanmamış içme suları ve gıdaların hazırlanması esnasındaki çapraz kontaminasyonların etkin olduğu bilinmektedir (45, 46). İnsanlarda hastalık yapan Campylobacter cinsi bakteriler, çoğu kez kendini sınırlayan, basit sekretuar tip ishale seyreden enterit tablosunu oluşturmaktadır. Bunun dışında, Guillain-Barré Sendromu (GBS), Miller Fisher Sendromu (MFS), hemolitik üremik sendrom (HUS), obstrüktif hepatit, reaktif arthrit, pankreatit, peritonit, meningit, proktit ve abort gibi ekstra intestinal komplikasyonlara da neden olmaktadır (47).

Campylobacter enfeksiyonlarında diyare bol ve sulu hal ile başlayıp, daha çok kanlı, mukuslu ve lökosit içeren dizanteri formunda seyredebilmektedir. Hastalığın inkübasyon dönemi, alınan mikroorganizmanın miktarı ve virulansına göre değişmekle beraber, 1-7 gün arasında değişiklik göstermektedir. Hastalığın başlangıcında 12-24 saat süren ateş, baş ağrısı, miyalji, kırıklık ve bazen de kanlı

yumuşak dışkılamanın eşlik ettiği prodrom dönemi görülmektedir. Bu dönemin ardından 2 yada 3 gün süren ishal, ateş, karın ağrısı ve bazen de bulantı ve kusmanın görüldüğü intestinal evre başlamaktadır (48). Genellikle sekretuar tipte başlayan ishal vakalarının % 30'unda kanlı ve mukuslu dizanterik form oluşmaktadır (49). *Campylobacter* vakalarında ishallere eşlik eden ateş 39-40 dereceye kadar çıkabilmekte, çocuklarda febril konvülsiyonlara neden olabilmektedir. Karın ağrısı şiddetli olup, kramp şeklinde tüm batında hissedilmektedir (50). *Campylobacter*lerin neden olduğu enterit tablosu genellikle 5 ile 7 günde kendiliğinden düzelmekte, nadiren uzamış enfeksiyonlara neden olmaktadır (51).

3.7.3.2. Hayvanlarda Campylobacteriosis

Campylobacter türleri çiftlik hayvanlarından koyun, keçi ve sığırlarda; septik aborta, diyare ve mastitise, kanatlılarda hepatitise, pet hayvanları ve domuzlarda gastroenteritise neden olmaktadır. *C. jejuni*'nin insanlarda görülen gastroenteritlerin önemli sebeplerinden biri olduğu belirtilmiştir (52). Tavuk, hindi, ördek ve kaz gibi insan beslenmesinde önemli yeri olan evcil kanatlılar ile doğada serbest yaşayan kanatlı türlerinin *Campylobacter jejuni*'nin doğal rezervuarı olduğu ve kanatlılarda kommensal olarak bulunduğu bildirilmiştir (53). *Campylobacter* spp. enfeksiyonlarında horizontal bulaşma çok önemli bir rol oynamaktadır. Rodentler, insektler, pet hayvanları, intensif kanatlı yetiştiriciliği, su ve yem maddelerinin önemli enfeksiyon kaynakları olduğu bildirilmiştir (54, 55).

3.7.4. Campylobacter Enfeksiyonlarında Tanı

Gerek sekretuar tip bakteriyel ve viral, gerekse dizanterik tip *E. histolytica* gastrointerstinal sistem enfeksiyonlarından klinik olarak ayırt edilemeyen Campylobacter enteritlerinin laboratuvar tanısı uygun tedavi ve kontrol tedbirlerinin alınabilmesi için son derece önemlidir. Diğer taraftan makrolid grubu antibiyotiklere duyarlı olduğu bilinen Campylobacterler de değişen antimikrobik duyarlılık paterninin izlenebilmesi için de bakterinin klinik örneklerden izolasyonu gereklidir. Campylobacter enfeksiyonlarının tanısı ya dışkı örneklerinde, mikroorganizmanın izolasyonu, mikroorganizma genomuna ait spesifik dizilerinin ya da mikroorganizma antijenlerinin gösterildiği direkt yöntemlerle veya hasta serum ve sekresyonlarında *C. jejuni* veya *C. coli* - spesifik antikorların arandığı serolojik testlerle yani indirekt yöntemlerle konmaktadır (38).

3.7.4.1. Direkt Tanı Yöntemleri

Amaç klinik materyallerde Campylobacterleri taze veya boyalı preparatlarda göstermek, bakteriyi uygun besi yerlerinde izole ederek identifiye etmek ve bakteriye ait spesifik gen bölgeleri veya antijenleri göstermektir (56).

3.7.4.1.1. Örnek Alınması

Campylobacter'lerin başarılı bir şekilde izolasyonu için öncelikle gerekli klinik örneklerin uygun bir şekilde alınması ve uygun koşullarda laboratuvara getirilmesi gerekmektedir. Klinik materyal genellikle dışkı veya rektal sürüntüdür. Eğer klinik materyal dışkı ise, dışkının kanlı mukuslu yerinden 2-3 gr numune alınmalıdır. Klinik materyal olarak rektal sürüntü kullanılacaksa, rektal

sfinkterden 2-3 cm içeri sokulan eküvyon, rotasyonel hareketler yaptırılarak kriptlerle temas ettirilmelidir. Daha sonra yine rotasyonel hareketlerle rektumdan çıkarılmalı ve uygun taşıma kapları içerisinde laboratuara iletilmelidir (57).

Örneklerin laboratuvara transferi ve işlenmeleri 2 saatten daha uzun sürecekse, alınan örnekler modifiye Carry-Blair taşıma besi yerine alınmalı ve laboratuvara ulaştırılincaya kadar 4°C' de korunmalıdır. Her ne kadar ilk bir iki günden sonra seçici besiyerine yapılan ekimlerde mikroorganizmanın izolasyon şansı büyük oranda azalmaktaysa da *Campylobacter* türleri Carry-Blair taşıma besi yerinde +4°C 'de 2 hafta canlı kalabilmektedir. Modifiye Carry blair besiyeri dışında, Amies besiyeri, Stuart besiyeri ya da kömür tozu içeren yarı katı besi yerleri de taşıma besi yeri olarak kullanılabilir. *Campylobacter*lerle enfekte hastalar dışkılarında yüksek miktarlarda mikroorganizma bulundurduklarından genellikle ön zenginleştirme yöntemlerine gerek yoktur. Ancak, bakteri atılımının az olduğu akut dönemi geçirmiş hastalarda izolasyon şansını artırmak için Preston, Campy-thio gibi zenginleştirici besi yerlerinin kullanılması önerilmektedir (56).

3.7.4.1.2. Mikroskopik İnceleme

Klinik materyal, taze numunelerle ve boyama yapıldıktan sonra *Campylobacter* hareket veya görünümünün tespiti açısından değerlendirilmelidir. Dışkı ve rektal sürüntü örneği alındıktan sonraki ilk iki saat içinde, karanlık alan mikroskobu veya faz-kontrast mikroskobunda incelenir. Bu incelemede *Campylobacter*lerin tirbuşon tarzında, hızla hareket eden ve batıp çıkmış tarzdaki tipik hareketlerinin görülmesi tanıya yardım eder. Direkt mikroskobide bol eritrosit ve nötrofillerin görülmesi de dizanterik form için yardımcı bulgu olarak değerlendirilebilir. Diğer taraftan dışkıdan alınan materyallerle hazırlanan ve

alkolle tespit edilen preparatlar, Gram boyama veya sadece % 1'lik bazik fuksin ile boyanarak; soluk pembe renkte, martı kanadı S veya virgül şeklindeki tipik morfolojik özellikler gösteren mikroorganizmalar yönünden incelenir (38).

3.7.4.1.3. Kültür Ortamında İzolasyon

Campylobacter türleri bağırsak florasında bulunan diğer mikroorganizmalardan daha geç ve güç ürer. Bu sebeple kolay üreyerek kültür plağına hâkim olan flora bakterilerinin kültür ortamından elimine edilmesi için örnekler ya direkt selektif besi yerine ekilmeli ya da membran filtrasyon yönteminde olduğu gibi 0.65 µm çaplı selüloz asetat filtrelerden süzildükten sonra süzüntünün veya süzüntü 0.45-0.25 µm membran filtreden tekrar süzildükten sonra membranın uygun besi yerlerine koyulması sureti ile ekim yapılmalıdır (58). Ancak dışkı florasında bulunan Proteus gibi hareketli bakteriler de filtreden kolayca geçtiğinden membran filtrasyon yöntemi ile Campylobacterlerin izolasyon şansı seçici kültür yöntemine göre daha düşüktür. Ancak bu yöntemde filtreden süzülen dışkı kanlı agar yerine seçici besi yerlerine ekildiğinde yöntemin şansı artmaktadır (59).

I- Campylobacter İzolasyonunda Kullanılan Besi Yerleri

Campylobacter'lerin dışkı ve rektal sürüntü gibi karışık floralı örneklerden izolasyonunda, Brucella Agar, Blood Agar Base No: 2, Columbia Agar, Thiogycollate besi yeri, Campylobacter Agar Base gibi temel besi yerlerine antibiyotik kombinasyonları ve üremeyi arttırıcı çeşitli katkı maddeleri eklenerek hazırlanan seçici besi yerleri kullanılmaktadır (Tablo 3). Besi yerlerinin seçici aktivitesini; temel besi yerinin içeriği, ilave edilen üremeyi arttırıcı maddeler ve

antibiyotik kombinasyonları belirlemektedir. İlk izolasyonlarda besi yerlerine %5-10 oranında defibrine koyun ya da at kanı ilavesi üremeyi arttırmaktadır (60).

Besiyerine katılakn katkı maddeleri içerisinde yer alan antibiyotiklerden sefalosporinler (cephalothin, cefaperazon) geniş spekturuma sahiptir. Enterobacteriaceae ailesine ait bakterilerin ve enterokok hariç Gram pozitif bakterilerin çoğuna etkilidirler. Trimeteprim ise özellikle proteus ve Gram pozitif bakterilere karşı inhibitör aktivite gösterir. Ancak bakterilerde timin sentezini inhibe ederek etkisini gösteren trimeteprimin, timidin içeren besi yerlerine etkinliği beklenenden daha düşük olmaktadır. Bu tür besi yerleri kullanıldığında, besi yerine trimetepriime sinerjik etkisi nedeni ile polimiksin B ilave edilmektedir. Besiyerlerine ilave edilen diğer antibiyotiklerden; vankomisin Gram pozitiflere, rifampisin hem Gram pozitif hem Gram negatif bakterilere, teicoplanin ise enterokoklara karşı etkilidir. Örneklerdeki maya ve küflerin üremesini engellemek içinde besiyerine sikloheksimit, amfoterisin B ve nistatin, gibi antifungal ajanlardan birisi ilave edilmelidir (61).

Campylobacter türlerinin çoğu, besi yerine ilave edilen, önerilen konsantrasyondaki antibiyotiklere dirençlidir. Ancak, sefalotin, kolistin ve polimiksin B'nin *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus subsp. fetus*, *C. jejuni subsp. doylei* ve *C. upsaliensis*'in bazı suşlarının üremesini baskıladığı bildirilmektedir. Bu nedenle, son yıllarda seçici besi yerlerinde sefalotin yerine, dışkı florasını baskılama gücü daha iyi olan sefaperazonun kullanılması önerilmektedir. Nitekim sefaperazonun dışkının normal florasında yer alan bakterilerin çoğu için belirlenen MIK (Minimal inhibitör konsantrasyon) değeri 8 mg/l iken klinik örnekten izole edilen çok sayıda *C. jejuni* ve *C. coli* suşu için MIK değeri ise 128 mg/l dir.

Ancak, *C. upsaliensis*' in bazı suşlarının, sefaperazon için MIK değerinin 16 mg/l olduğu, bu nedenle 32 mg/l sefaperazon içeren mCCDA gibi seçici besi yerlerinde bu *Campylobacter* türünün üreyemeyeceği bildirilmektedir. Diğer termofilik türlerin yanısıra *C. upsaliensis*'de izolasyonu için kullanılan, CAT (Sefaperazon, Amfoterisin B, Teicoplanin) gibi seçici besi yerine 8 mg/ml sefaperazon ilavesi önerilmektedir (62).

II- Besi Yerlerine Ekim ve İnkübasyon

Numunelerden alınan dışkı örnekleri eküvyon ile selektif besi yerlerinin üst 1/4'üne sürülür ve sürüntü materyali plakların geri kalan kısmına tek kullanımlık plastik öze kullanılarak azaltma yöntemi ile yayılır. Kültür için seçici besiyerleri kullanılır. Ancak mümkün ise her örnekten birisi kanlı, diğeri kan içermeyen en az 2 ayrı selektif besi yerine , ekim yapılması başarı şansını artırır. Ekim sonrası besi yerleri % 5 O₂ % 10 CO₂ ve % 85 N₂ içeren mikroaerofilik ortamda 37 °C' de inkübe edilir. İnsanlarda ishale yol açan *Campylobacter*lerin nerede ise tamamını termofilik türler oluşturmaktadır. Bu sebeple termofilik *Campylobacter*'lerin daha kolay üretilibilmeleri ve identifiye edilebilmeleri için her örnek için en az 2 besi yerine ekim yapılmalı ve 2. besiyerleri de yine mikroaerofilik şartlarda 42°C' de inkübe edilmelidir. *Campylobacter*lerin üremesi için gerekli mikroaerofilik atmosfer, mikroaerofilik gaz karışımı sağlayan ve ticari olarak temin edilebilen Campy-Pak (BBL No: 271034), Campy-Gen (Oxoid 0025A) gibi gaz depo kitleri ile veya anaerobik kavanozların havası boşaltıldıktan sonra ilave edilecek uygun gaz karışımı ile sağlanır (38).

Tablo 3. *Campylobacter jejuni* izolasyonu için seçici besi yerlerinin içerikleri (38).

BESİ YERİNİN ADI	TEMEL BESİ YERİ	KATKI MADDELERİ
Butzler'in selektif besiyeri	Sıvı Thioglikolat besiyeri (Difco)	Agar (%3) Koyun kanı (%10) Basitrasın (25.00 IU/l) Novobiosin (5 mg/l) Kolistin (10.000 IU/l) Sefalotin (15 mg/l) Aktidion (50 mg/l)
Blaser'in besiyeri (Campy-BAP)	Brucella Agar Base	Koyun kanı (%10) Vankomisin (10 mg/l) Trimethoprim (5 mg/l) Polimiksin B (2.500 IU/l) Sefalotin (15 mg/l) Amfoterisin B (2 mg/l)
Skirrow Kanlı Agar Besiyeri	Blood Agar Base (temel kanlı agar) No: 2 (Oxoid)	At kanı (%7) Vankomisin (10 mg/l) Polimiksin B (2.500 IU/l) Trimethoprim (5 mg/l)
Butzler virion besiyeri	Columbia Agar Base (Oxoid CM331)	Defibrine koyun kanı Sefoperazon (15mg/l) Rifampin (10 mg/l) Kolistin (10.000 IU/l) Ampoterisin B (2 mg/l)
*Preston (1) supplement	Nutrient buyyon no: 2 (Oxoid CM 67) % 1.2 New Zealand Agar	Sodyum deoksikolat Demir sülfat Sodyum piruvat Kazein hidrolizat Sefoperazon (32 mg/l)
**Preston(2)	Nutrient buyyon no: 2 (Oxoid CM 67) % 1.2 New Zealand Agar	Sodyum deoksikolat Demir sülfat Sodyum piruvat Kazein hidrolizat Sefoperazon (32 mg/l)
***Preston (3)	Nutrien buyyon No: 2 (Oxoid)	Sefoperazon (32 mg/l) Amfoterisin (2 mg/l) Campylobactergrowht supplement (Oxoid)
**Şarkoal (charcoal)-Bazlı selektif besiyeri	Columbia Agar Base (GIBCO)	Hematin (0.032 g/l) Sodyum piruvat (0.1 g/l) Vankomisin (20 mg/l) Sefaperazon (32 mg/l) Sikloheksimid (100 mg/l)

*: %5 defibrine at kanı + Saponinli, **: Kansız, şarkoallı, ***: %7 defibrine at kanlı.

III-Seçici Besi Yerlerindeki Koloni Morfolojisi

Campylobacter'ler kanlı agarda 24-48 saatlik inkübasyon periyodu sonunda, 0.3-0.5 mm çapında, su damlası gibi nemli, gri/beyaz, agarın yüzeyine yayılmış bir tabaka şeklinde üreme gösteren, hemoliz yapmayan tipik koloniler oluştururlar. Kan içermeyen, kömür tozu içeren besi yerinde ise; 0.5 mm çapında, grimsi renkte, bazen metalik refle veren düz yüzeyle ancak yayılma eğilimi gösteren gözle görülebilir koloniler 72-96 saatlik inkübasyon süresi sonunda şekillenir (38).



Şekil 1. *C. jejuni* 'nin besi yerindeki görüntüsü.

3.7.4.1.4. Campylobacter'lerin İdentifikasyonu

Katı besi yerlerinde üretilen şüpheli koloniler koloni morfolojilerine, mikroskopik özelliklerine, oksidaz ve katalaz aktivitelerine, ısı, tuz ve glisin tolerans testlerine, antibiyotik duyarlılık testleri ile hippuratu hidrolize edebilme özelliklerine göre identifikasyonları yapılmaktadır (Tablo 2.4). İdentifikasyon testleri ilk izolasyondan çok, mikroskopik özellikleri Campylobacterlerle uyumlu olan kolonilerin subkültürlerinden yapılmalıdır (63).

Tablo 4. *Termofilik campylobacter* türlerinin identifikasyonu.

<i>C. Jejuni</i>					
	<i>Subsp.jejuni</i>	<i>Subsp.doylei</i>	<i>C. coli</i>	<i>C.lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Hippurat hidroliz	+	+	-	-	-
Katalaz	+	+	+	+	-/W
Nitrate redüksiyon	+	-	+	+	+
TSI agarda H₂S üretimi	-	-	-/W	-	-
Nalidiksik asit direnci	S	S	S	R	S

W: zayıf reaksiyon ; S: duyarlı ; R: dirençli .

3.7.4.1.5. Dışkıda Antijen Aranması Esasına Dayanan Testler

Campylobacter’lerin hızlı tanısında, dışkıda Campylobacter antijenlerinin araştırılmasını hedefleyen, ProSpecT Campylobacter enzim immunoassay (Campylobacter EIA) Campyslide sistem, Meritec-Campy ve Microscreen gibi presipitasyon temelli çok sayıda ticari test geliştirilmiştir. Direkt dışkı örneklerinin yanı sıra zenginleştirici besi yerindeki dışkı örneklerinin de değerlendirilebildiği, Campylobacter EIA testinde Campylobacter’lerin iki yüzey antijenlerine karşı geliştirilmiş poliklonal antikorlar kullanılmaktadır. Campyslide testi ile dışkı örneklerinden antijen tespitinde, Campylobacter’lerin hücre duvar antijenlerine karşı üretilmiş anti-campylobacter antikorları ile kaplı lateks partikülleri kullanılmaktadır. Meritec Campy testinde ise antiflageller antikorları ile kaplanmış lateks partikülleri kullanılmaktadır. Ancak bu testlerden hiçbirinin duyarlılığı kültür yöntemi kadar yüksek değildir (64, 65, 66, 67).

3.7.4.1.6. Moleküler Tanı Yöntemleri

Campylobacter enfeksiyonlarının tanısında etkenin izolasyon “altın standart” olarak kabul edilmekle birlikte, 24 saatten daha kısa süre içerisinde Campylobacter’leri tür düzeyinde tanımlayan, uygulaması kolay,

tekrarlanabilirliği, çevresel faktörlerden daha az etkilenen nükleik asit amplifikasyon esasına dayanan, PCR/RFLP, multipleks-PCR, AFLP, PCR-hibridizasyon gibi moleküler temelli ile DNA dizi analizi ve mikroarray gibi modifiye moleküler yöntemler daha sık kullanılmaya başlanmıştır (68).

Moleküler tanı yöntemleri ile *Campylobacter* türlerinin genom düzeyinde tanımlanması ve tiplendirilmesinin yanı sıra, patogenezi ve antibiyotik direncinden sorumlu genler ve gen mutasyonlarının tespiti de mümkün olabilmektedir (69, 70).

I. Nükleik Amplifikasyon Esasına Dayanan Yöntemler

Düşük metabolik aktiviteleri sebebiyle *Campylobacter*'lerin *invitro* şartlarda üretilmeleri ve fenotipik yöntemlerle identifikasyonları uygun alt yapı ve tecrübeli personele sahip laboratuvarlarda dahi son derece düşük duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. Konvensiyonel tanı yöntemlerinde karşılaşılan ve bakteriden kaynaklanan bu olumsuzlukların giderilmesi amacı ile alternatif yöntemlere başvurulmuş, bu doğrultuda PCR gibi nükleik asit çoğaltma yöntemleri birçok araştırmacı tarafından denenmiştir. Bu çalışmalarda *Campylobacter*'lerin; 16S rRNA, 23S rRNA, *hipO*, *ceuE*, *mapA*, *cadF*, *glyA* ve *groEL* genleri üzerindeki spesifik dizileri hedef alan primerlerin kullanıldığı, PCR, multipleks PCR, real-time PCR ve PCR-ELISA gibi, değişik amplifikasyon bazlı moleküler yöntemler kullanılmıştır. Ayrıca klinik materyalden *Campylobacter*'lerin direkt tanısı ve tür düzeyinde identifikasyonuna imkân veren PCR ile kombine DNA hibridizasyon ve PCR-RFLP gibi yöntemler de tanıda başarı ile kullanılmaktadır (68,71,72,73,74). Nükleik asit amplifikasyon testlerinin duyarlılık ve özgüllüğünü, hedef bölge, uygun primerlerin kullanılması, internal ve eksternal kontrol kullanımı, kullanılan DNA ekstraktının kalitesi, DNA polimeraz enzimi,

reaksiyon tamponu, Mg^{+2} konsantrasyonu, ısı döngü cihazının performansı ve uygulayıcının becerisi gibi, çok sayıdaki faktör etkilemektedir (75).

II. Hedef Bölge ve Primerlerin Seçimi

Campylobacter türlerine spesifik hedef bölgelerin belirlenmesinde tam genom dizi analizlerinden faydalanılmaktadır. Amplifiye edilen hedef DNA dizisi cins, tür, alt tür hatta suş seviyesinde özgüllük göstermelidir. Bu bakımdan ilk ve en çok çalışılan gen bölgeleri, filogenetik olarak korunmuş bölgelerin yanı sıra mozaik bölgeler de içeren, 16S rRNA ve 23S rRNA genleri olmuştur. Cins düzeyinde son derece duyarlı sonuçlar elde edilen bu bölgelerin çoğaltılması ile tür düzeyinde tanıda istenen sonuçlar elde edilememiştir. Mesela, türler arasında % 97'nin üzerinde homolog olan ve genus hatta cins düzeyinde spesifik diziler taşıyan 16S rRNA tür ayrımı için uygun bir çoğaltma hedefi değildir (76) . Bir çalışmada, 16S rRNA üzerindeki 1,004 bp'lik bir bölgenin çoğaltılması ve elde edilen DNA'nın *DdeI*, *TaqI* ve *BsrI* restriksiyon endonükleazları ile kesilmesi sonucu elde edilen DNA fragmentlerinin homolojisini esas alan PCR-RFLP yöntemi ile ancak Campylobacter, Arkobacter ve Helikobacter cinsi bakteriler arasında bir ayrımın mümkün olduğu, fakat Campylobacter cinsi içerisindeki türlerin ayrımının mümkün olmadığı öngörülmüştür (77). Daha sonra yapılan araştırmalarda 16S rRNA geni üzerinde farklı bölgelerin çoğaltılması ile yapılan PCR-RFLP temelli çalışmalarla Campylobacter'lerin tür düzeyinde tanımlanmalarına çalışılmış, ancak *C. jejuni* ve *C. coli*'nin identifikasyonu için henüz sensitivitesi yüksek 16S rRNA PCR-RFLP yöntemi belirlenememiştir (70) .

Campylobacterlerin tanı ve identifikasyonunda sık kullanılan bir diğer önemli hedef 23S rRNA geni içerisindeki spesifik dizilerdir. İlk çalışmalarda 23S

rRNA geninde *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* ve *C. upsaliensis* gibi termofilik Campylobacter türleri için oldukça spesifik bir gen bölgesi olduğu, her bir tür için farklı dizayn edilmiş primerlerin kullanılması ile bu türler için spesifik bölgelerin çoğaltılarak identifiye edilebileceği gösterilmiştir (78). Daha sonra 23S rRNA geni üzerinde 491 bp uzunluğunda ve *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* türlerinde ortak olan bir gen bölgesinin varlığı tespit edilmiştir. Bu bölgenin spesifik primerlerle amplifikasyonu sonucu elde edilen ampliconların, *AluI* ve *Tsp509I* restriksiyon endonükleaz ile kesimi ile elde edilen DNA fragmentlerinin homolojileri dikkate alınarak “Tek tüp PCR-RFLP” ile tür düzeyinde, yüksek duyarlılık ve özgüllükte tanı mümkün olmaktadır (79).

Bu iki gen bölgesi dışında, *hipO*, *ceuE*, *mapA*, *cadF*, *glyA* ve *groEL* genleri üzerindeki spesifik dizileri hedef alan primerler yardımı ile tür düzeyinde tanıya yönelik PCR, PCR-RFLP, multipleks PCR gibi modifiye yöntem çalışmaları denenmiştir (80, 81, 82, 83, 84, 85, 86).

Campylobacter türlerinin tanı ve identifikasyonunda en uygun PCR yönteminin tespiti için yapılan bir araştırmada, farklı gen bölgelerini hedef alan veya farklı primer dizaynlarının kullanıldığı 11 PCR temelli yöntemin duyarlılık ve özgüllük sonuçları, fizikokimyasal değişiklikler ve suşlar arasındaki varyasyonların testlerin performansı üzerine etkileri araştırılmıştır. Araştırmada *C.jejuni* tanısı için dizayn edilmiş 6 PCR testinin duyarlılık aralığı % 84 -100, özgüllük aralığı % 88 -100 olarak tespit edilmiştir. *C. coli*’ye spesifik PCR testlerinin tamamında ise duyarlılık ve özgüllük % 100 olarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan bazı testler, *C. jejuni*’nin referans suşları ile kıyaslandığında klinik izolatlar ile daha değişken sonuçlar alınmış, tanıda daha güvenilir sonuçlar

üretebilmek için, farklı genetik dizileri hedef alan primerlerin kullanıldığı, birden fazla PCR testinin eş zamanlı olarak kullanılması önerilmiştir. Sokak suşları ile görülen bu şekildeki değişken sonuçlar, *C. jejuni* genomunun şarta bağlı olarak gösterdiği aşırı değişkenlik ile açıklanmıştır (75).

III. Dışkıdan Nükleik Asit Ekstraksiyonu

Kompleks mikrobiyal flora içermesi, diyetle alınan gıda bileşenleri ve endojen içeriğinden dolayı dışkı örneklerinden nükleik asitlerin saf olarak ekstraksiyonu, diğer klinik örneklerle göre daha zordur. Dışkıda, safra tuzları, gıda içerisinde bulunan bitkisel kaynaklı kompleks polisakkaritler gibi PCR ve diğer moleküler yöntemlerin duyarlılığını düşüren çok sayıda ve miktarda inhibitörler bulunmaktadır (75).

Dışkı örneklerindeki inhibitörlerin uzaklaştırılması için, örneklerin lizis tamponu içerisinde kaynatılması ve diferansiyel santrifügasyonu, PCR reaksiyon karışımına % 0,5 bovin serum albumin ilave edilmesi veya ekstraktın polivinil piroolidin ile pürifikasyonu önerilmektedir.

Geleneksel fenol-kloroform yöntemi ile dışkıdan DNA izolasyonunda, gerek dışkıdaki inhibitörleri gerekse fenolü ekstraktan tam olarak uzaklaştırmak mümkün olamamaktadır. Bu sebeple fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen DNA kalıplarının kullanıldığı PCR testlerinin duyarlılığı son derece düşüktür. DNA ekstraksiyonunda bakterinin lizisi için Guanidium isotiyosiyanatın kullanıldığı, DNA'nın silika matrikse bağlanarak ard arda yıkamalarla protein kalıntılarının uzaklaştırıldığı bir yöntem tanımlanmış ve bu yöntemin fenol-kloroform yöntemine göre daha başarılı olduğu ileri sürülmüştür (87) .

Konvensiyonel in-house tekniklerin yanı sıra, son yıllarda dışkıdan DNA izolasyonu için çok sayıda standardize edilmiş ticari kit geliştirilmiştir. Bu kitler iyi standardize edilmiş olup 200 ng üzerinde DNA eldesine imkân sağlayacak biçimde dizayn edilmiştir. Ancak dışkıda flora bakterilerinin yoğunluğu, dışkının sıvı içeriği ve içerikdeki inhibitör konsantrasyonu gibi değişkenler, gerek konvensiyonel, gerekse ticari olarak temin edilen DNA ekstraksiyon kitleri ile yapılan ekstraksiyon işlemlerinde sonuçları etkilemektedir (86).

3.7.4.2. İndirekt Tanı Yöntemleri

Campylobacter antijenlerine karşı konakçı serum ve sekresyonlarında sIgA ve IgG türü antikorların tespiti amacı ile KBR (Kompleman birleşme reaksiyonu) ve ELISA bazlı serolojik testler denenmiş, ancak bu testlerin tanı değerlerinin düşük olduğu görülmüştür. Son yıllarda geliştirilen ve *C. jejuni*'nin rekombinant P18 ve P39 antijenlerine karşı konakçıda gelişen antikor cevabını tespit eden ELISA testinin yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu ileri sürülmüştür. Ancak, *C. jejuni*'nin heterojen antijenik yapısından dolayı bu testlerden hiç biri standardize edilmiş seropozitiflik kriterlerine sahip değildir. Campylobacter enfeksiyonlarının tanısında serolojik testler epidemiyolojik amaçlı doğrulama testleri olarak kullanılmaktadır (88).

3.7.5. Campylobacter Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi

Campylobacteriosis gelişmişlik farkı gözetmeksizin bütün dünyada görülen, sıklıkla zoonotik karakterli, gıda yolu ile bulaşan bir hastalıktır. Campylobacteriosis'in epidemiyolojisi, tarıma dayalı ekonomi, kişi ve çevre hijyenine verilen önem gibi toplumların sosyo-ekonomik ve sosyo kültürel

özellikler ile temas yaşı, endemik bölgelere seyahat ve meslek gibi kişisel özelliklerden etkilenmektedir (89) .

Campylobacteriosis, geçimini tarım ve hayvancılık gibi toprağa dayalı olarak temin eden, içme ve kullanma sularının sanitasyonunda ve gıda denetiminde yetersizlikler görülen az gelişmiş veya gelişmekte olan toplumlarda hiperendemiktir.

Campylobacter epidemiyolojisinde rol oynayan en önemli etkenlerden birisi de hayvancılıktır. Endüstrileşmiş toplumlarda tüketilen gıdaların önemli bir bölümünün gelişmekte olan ülkelerde üretilmesi, bu ülkelerde gıda üretim aşamalarındaki kontrollerin yerel yasa ve kurullar tarafından denetlenmesi, et ve gıda güvenliği hususunda denetlenebilir standartların bulunmaması veya yetersizliği, daha önceleri gıdaları koruduğuna inanılan kurutma, tuzlama, soğukta saklama gibi yöntemlerin güvenli olmayışı ve gıda yolu ile bulaşan mikroorganizmaların hayvan barınaklarından uzaklaştırılmalarının mümkün olamayışı, gıda yolu ile bulaşan hastalıkların endüstrileşmiş toplumlarda da halk sağlığı yönünden risk oluşturmaya devam edeceği görülmektedir. Campylobacteriosisın 1990 yılından itibaren tüm dünyada giderek arttığı birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir.

Campylobacter enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde, gelişmekte olan ülkelerle gelişmiş ülkeler arasındaki en önemli farklardan biriside olguların yaş gruplarına göre dağılımıdır. Gelişmekte olan ülkelerde çocukların toprakla ve gıda kaynaklı hayvanlarla erken dönemde teması, çocukluk yaşlarında hastalığa karşı özgül bağışıklığın gelişmesine ve böylece toplumdaki asemptomatik taşıyıcıların artışına yol açmakta, ileri yaşlardaki enfeksiyonlarda daha sakin seyretmektedir.

Bu ülkelerde erken yaşta asemptomatik taşıyıcılık görülen çocuklar, dışkıları ile bol miktarda etkeni çıkarmaktadırlar (49).

Gelişmiş ülkelerde ise Campylobacteriosis üç ayrı yaş grubunda artış göstermektedir. İlk artış, bir yaş altı bebeklik döneminde, ikinci artış 15-29 yaş arası gençlik döneminde, üçüncü artış ise 60 yaş ve üzerindeki yaşlılık dönemlerinde görülmektedir. Gelişmekte olan ülkelerin aksine gelişmiş ülkelerde asemptomatik taşıyıcılık oranı bir hayli düşüktür (89).

Campylobacter enfeksiyonlarında her cinsin eşit oranda etkilendiği belirtilmekle beraber bazı çalışmalarda gençlerde fast-food beslenme alışkanlığının yaygın olmasıyla ilişkili olarak erişkin dönemde enfeksiyonun erkeklerde daha yaygın olarak görüldüğü bildirilmiştir (90).

Campylobacteriosis'in epidemiyolojisinde mevsimsel farklılıkların da etkinliği görülmektedir. Gelişmiş ülkelerde özellikle yaz ve sonbahar aylarında daha sık görülen enfeksiyonun, gelişmekte olan ülkelerin çoğunun iklimler arası ısı farkının az olduğu tropikal bölgelerde yer alması nedeniyle bu ülkelerin insidans oranları arasında belirgin bir fark yoktur (49).

Araştırmalar sonucunda insandan insana bulaştığı da bilinmekte olup, genel olarak Campylobacteriosis bir zoonoz olarak kabul edilmekte ve primer kaynak, başta kümes hayvanları olmak üzere, enfekte hayvanların ürünleridir. Campylobacter türü mikroorganizmalar; gıda amacı ile beslenen, başta kümes hayvanları olmak üzere pek çok memeli hayvan ve yabani kanatlıların, üreme ve gastrointestinal sisteminde erken dönemlerden itibaren kolonize olmaktadır. Hayvanlardaki kolonizasyon genellikle asemptomatik olarak başlayıp hayat boyu sürmekte, nadiren klinik belirtilere bazen de intermittan yayılıma yol açmaktadır.

Daha düşük oranlarda da olsa kedi ve köpek gibi ev hayvanlarının gastrointestinal sistemlerinde kolonize olan *Campylobacter* türleri, bu hayvanlarda da normal flora bakterisi gibi davranmakta ancak stres, yaş, kolonize suşun tipi ve enfektif doza bağlı olarak bu hayvanlarda hafif, kendi kendisini sonlandıran ishalli klinik tablolara yol açabilmektedir. Ancak *Campylobacter*lerin hayvanlardaki intestinal kolonizasyonunda, genel olarak prognozu neyin etkilediği tam olarak anlaşılamamıştır (91). *Campylobacter* türlerinin doku tropizmi yanı sıra konak tropizmi göstermeleri kolonizasyonda reseptör bağımlılığını düşündürmektedir (Tablo 5).

Tablo 5. *Campylobacter* türlerinin konak tropizmi

Rezervuar	Tür
İnsan	<i>C. jejuni</i> , <i>C.sputorum</i> biovar <i>sputorum</i> , <i>C.conciscus</i> , <i>C.curvus</i> , <i>rectum C.showae</i> , <i>C.gracilis</i>
Büyük baş hayvan	<i>C. jejuni</i> , <i>C.fetus subs.fetus</i> or <i>C.fetus subsp. venerealis</i> , <i>C.hyointestinalis</i> , <i>C.sputorum</i> biovar <i>paramureolyticus</i> , biovar <i>faecalis</i>
Koyun	<i>C. fetus</i> , <i>C.sputorum</i> biovar <i>faecalis</i>
Domuz	<i>C. coli</i> , <i>C.hyointestinalis</i> , <i>C.mucosalis</i>
Kümes hayvanları	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> , <i>C. lari</i>
Evcil hayvanlar (Kedi, Köpek)	<i>C.jejuni</i> , <i>C.lari</i> , <i>C.upsaliensis</i> (özellikle köpek), <i>C.hyointestinalis</i> <i>C. helveticus</i>

C.jejuni'ni başta tavuk, hindi ve kesim amaçlı beslenen kümes hayvanları olmak üzere, sığır, domuz ve nadiren de olsa kedi ve köpek gibi evcil hayvanların intestinal sistemine kolonize olabilmektedir. Kümes hayvanlarında vücut ısısının 42°C gibi yüksek bir ısıya sahip olması, termofilik bir tür olan *C.jejuni* için ideal bir üreme ortamı oluşturmaktadır (92). Yapılan çalışmalarda *C.jejuni*'nin tavuklarda 10-40 cfu gibi düşük dozda alınsa bile, kursak, sekum ve ince barsak lümeninde, epitel yüzeyini örten mukus tabakası içerisinde ve enterositlerin

üzerinde aheze olarak kolonize olduğunu ve kısa sürede burada çoğalarak 10^9 Cfu/gr gibi yüksek konsantrasyonlara ulaştığını göstermiştir. Kümes hayvanlarında kolonizasyon hayatın 2. veya 3. haftasında başlamakta olup genç civcivlerde kolonizasyon görülmemiştir. Deneysel olarak yapılan enfeksiyonlarda 1. haftadan itibaren düşük oranda ve kısa süreli kolonizasyonun mümkün olabildiği gösterilmiştir. Doğal yolla kolonizasyondaki gecikmenin anneden geçen ve yumurta sarısında yüksek düzeylerde gösterilen antikorlara, kursak ve intestinal sistemdeki flora bakterilerinin türü ve sayısına ve intestinal sistemin reseptörler ve anatomik yapılarındaki matürasyonla ilişkili olduğu bildirilmiştir (93).

Kümes hayvanlarında 3. haftadan itibaren kolonizasyon oranı süratle artmakta ve kesime gelen broiler cinsi tavuklarda oran % 0-95'e ulaşmakta, bu dönemdeki tavukların dışkılarındaki *C.jejuni* yoğunluğu 10^9 CFU/gr'a ulaşmaktadır. Marketlerde yapılan çalışmalarda tüketime hazırlanmış et ürünlerinde kontaminasyon oranı % 100'ü bulmaktadır. Gerek doğal beslenen ev tipi kümes hayvanları gerekse büyük işletmelerde üretilen hayvanlarda kolonizasyonun başlama yaşı ve sıklığı arasında fark gösterilememiştir. Kolonizasyonun süresi konağa ve suşa göre değişebilmektedir (93, 94).

3.7.5.1. Epidemiyolojik Açıdan Tiplendirme Yöntemleri

Son yıllarda, özellikle moleküler epidemiyolojik yöntemlerin geliştirilmesi ile Campylobacteriosis epidemiyolojisi ile ilgili bilgilerin önemli ölçüde arttığı görülmektedir. Mikroorganizmanın fenotipik özellikleri ile genotipik özelliklerinin karşılaştırıldığı çalışmalarda, bir salgında izole edilen suşlar arasındaki bulaşıcılık yönünden görülen farklılıkların sebebi, salgınların varsa

hayvan rezervuarları veya diğer potansiyel kaynakları ile yayılma yolları belirlenebilmektedir (95) .

3.7.5.1.1. Fenotipik Yöntemler

Campylobacter'lerin hastalık etkeni olarak ilk izolasyonundan bugüne kadar geçen süre içerisinde yapılan süveyans çalışmalarında uygulama güçlüğü, zamana dayalı sonuç üretme ve genetik yapıdaki değişimlere bağlı olarak izolatların biyokimyasal özelliklerinden çok salgına neden olan suşların antijenik özellikleri ve faj duyarlılıklarına göre identifikasyonunu baz alan fenotipik yöntemler kullanılmıştır. Antijenik özelliklere göre yapılan süveyans çalışmalarında Penner ve Lior'un antijenik sınıflandırmasını esas alan serolojik identifikasyon yöntemleri baz olarak alınmıştır. Orijinal Penner yönteminde indirekt hemaglutinasyon (IHA) tekniği kullanılır ve Campylobacter izolatları ısıya dirençli (TS/HS) antijenlerindeki homolojiye göre identifiye edilirler (96). Bu yöntemin en önemli dezavantajı antijenik benzerlik sebebi ile diğer Gram negatif barsak bakterileri ile çapraz reaksiyonlara bağlı yalancı pozitiflik oranının yüksek oluşudur. Bu sebeple yöntem daha sonra modifiye edilmiştir. Bakteri aglutinasyonuna dayalı bir yöntem olan, Modifiye Penner yönteminde özgül olmayan açık şekilli ve çapraz reaksiyonların en aza indirilebilmesi için, Campylobacterlerin HS atijenlerine karşı geliştirilmiş absorbe serumlar ve bakteri süspansiyonları kullanılmaktadır (97). İngiltere başta olmak üzere Avrupa'da bulunan referans merkezlerinde Campylobacterlerin fenotipik özelliklerine göre tiplendirilmelerinde Modifiye Penner yöntemi, Faj tiplendirme yöntemi ile birlikte kullanılmaktadır. Lior yönteminde ise ısıya duyarlı (TL/HL) antijenler lam aglutinasyon testi ile araştırılmaktadır (98). Ancak anti serum panellerinin çok

olması, tiplendirilemeyen izolatların varlığı, yöntemlerin maliyetinin ve iş yükünün fazla olması gibi nedenlerden dolayı fenotipe dayalı sürveyans çalışmalarında serotiplendirme yöntemlerinin uygulanabilirliği, referans laboratuvarları ile sınırlı kalmıştır. Ayrıca genetik materyalin horizontal transferi nedeni ile farklı genotipe sahip *Campylobacter*'ler suşlarının zaman zaman aynı antijenik profili sergilemeleri ya da aynı genotipe sahip *Campylobacter* suşlarının farklı antijenik özelliğe sahip olmaları sebebi ile hatalı pozitif veya negatif sonuçların elde edilmesi, izolatların çoğunun sık karşılaşılan birkaç serotip içerisinde yer alması, buna karşılık bazı izolatların mevcut anti-serumlarla tespit edilememesi, antijenik homolojiyi esas alan tiplendirme yöntemlerinin en önemli boşluğu olarak kabul edilmiştir ve bundan dolayı daha duyarlı subtiplendirme metodlarına ihtiyaç duyulmuştur (99). Günümüze kadar serotiplendirmenin yanı sıra kullanılmak üzere çok sayıda faj tiplendirme şeması önerilmiştir. İlk faj tiplendirme şeması ABD'de geliştirilmiştir.(Grajewski ve ark 1985) Daha sonra İngiltere'de Salama ve arkadaşları (1990) ile Kanada'da Khakhria ve Lior (1992) tarafından geliştirilen faj tiplendirme şemaları çok sayıdaki çalışmada epidemiyolojik tiplendirme yöntemi olarak serotiplendirme ve antimikrobiyal duyarlılık profillerine göre yapılan tiplendirme ile birlikte kullanılmıştır. Bu üç şemada major fajlar ortak olup daha az rastlanan faj tiplerinde farklılıklar görülmektedir. ABD'de geliştirilen orijinal faj tiplendirme şeması kümes hayvanlarının dışkılarından izole edilen 14 virülan bakteriyofaj kullanılarak oluşturulmuştur. İngiltere'de geliştirilen faj tiplendirme şemasında ise orijinal faj tiplendirme şemasında da kullanılan 6 bakteriyofaj ile birlikte domuz dışkılarından, gübre ve su gibi çevresel örneklerden izole edilen 10 farklı bakteriyofaj da şemaya

dahil edilmiştir (Faj Tip 1). Khakhrih ve Lior'un önerdiği faj tiplendirme şemasında ise, orijinal faj tiplendirme şemasındaki 10 bakteriyofaja 9 minor faj eklenmiş ve böylece tiplendirmede kullanılan faj sayısı 19'a çıkarılmıştır. Faj tiplendirilmesinde kullanılan bu üç şemadan en çok kabul gören İngiltere'de kullanılan şemadır. Bu şemaya göre 76 farklı faj tipi bulunmaktadır. Giderek artan sayıdaki faja rağmen serotiplemede olduğu gibi epidemiyolojik olarak ilişkisiz suşlar arasında aynı faj tiplerinin tespit ediliyor olması bu testlere olan güveni de azaltmıştır (100, 101, 102). Khakhria ve Lior 17 farklı ülkeden gönderilen insan ve çeşitli hayvan dışkı örneklerinden izole edilen 672 *C. jejuni* ve 82 *C. coli* izolatı ile genişletilmiş bakteriyofaj şemasını kullanarak yaptıkları bir araştırmada izolatların ancak % 80,6'nın tiplendirilebildiğini, bu suşların birden çok faj duyarlılığı gösteren 46 farklı faj (PT) tipi sergilediklerini belirtmişlerdir. Tiplendirilen izolatların % 57'sinin 9 faj tipi içerisinde yoğunlaştıklarını (3, 5, 10, 11, 18, 19, 23, 26, 44) insanlardan izole edilen *C.jejuni* izolatları arasında en yaygın faj tipinin PT-11 olduğunu bildirmişlerdir. Ancak genişletilmiş bu şemaya rağmen izolatların % 19,4'ünde faj tipine göre ilişkilendirme yapılamamıştır (102).

Campylobacterlerin epidemiyolojik amaçlı tiplendirmelerinde, hızlı ve kolay bir alternatif olarak, antimikrobiyal duyarlılık profillerindeki homolojiyi dikkate alan antibiyotiplendirme de denenmiştir. Ancak genotipik yöntemlerle yapılan kıyaslamalı çalışmalarda mikroorganizmayı üretme aşamasında kullanılan besiyerinin özellikleri, tuz konsantrasyonu, kalınlık, inkübasyon şartları ve inokülüm miktarındaki standartsızlık gibi testlere ait intrinsik sebeplerden dolayı bu yöntemin duyarlılığının tek başına düşük olduğu, fenotipik tanımlamada diğer

testlerle birlikte anlamlı olabileceği görülmüştür. Wittwer ve ark. (2005) tarafından yapılan, hayvanlar ve çevresel örneklerden izole edilen 139 *Campylobacter* suşunun tiplendirilmesinde, antibiyotipleme ile Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) ve *flaA*-RFLP yöntemlerinin kıyaslandığı çalışmada, AFLP’de 48, *flaA*-RFLP de 29 ayrı patern gösteren suşların, 8 farklı antimikrobiyal kullanılarak yapılan antimikrobiyal duyarlılık testlerine göre 13 ayrı antimikrobiyal direnç profili gösterdiği tespit edilmiştir. Tiplendirilen suşların hiç birisinde genotipik profiller ile antimikrobiyal direnç profilleri arasında korelasyon gösterilmemiştir (103). Benzer bir başka çalışmada Han ve ark. *Campylobacter* suşunu pulsed field gel elektroforezi (PFGE), *flaA*-tiplendirme ve tetrasiklin, nalidiksik asit, siprofloksin’e karşı direnç profillerine göre tiplendirmeye çalışmışlar, sonuç olarak test kombinasyonları ile suşların toplam 87 farklı grup içerisine dağıldıklarını bildirmişlerdir. Bu grup, genotipik testlerin suşlar arasındaki farklılıkları ortaya koymada daha ayırt edici olduğunu ayrıca genetik özelliklere göre yapılan gruplandırmanın anti mikrobik duyarlılık testlerine göre yapılan gruplandırma ile hiç uyuşmadığını belirtmişlerdir. Bu durum *Campylobacter* suşları arasında çoklu direncin yaygın olarak görülebilmesi ile ilişkilendirilmiştir (104).

Sonuç olarak, faj duyarlılığına göre, antijenik özelliklere göre ve antimikrobiyal duyarlılık testlerine göre identifikasyonu esas alan fenotipik tiplendirme yöntemleri, gerek taksonomik gerekse epidemiyolojik çalışmalar için yeterli duyarlılık ve özgüllüğe sahip değildir. Bu sebeple özellikle epidemiyolojik çalışmalarda, salgınlardan izole edilen suşların tiplendirilmesi ve ilişkilendirilmesinde genotipik yöntemlerin kullanılması önerilmektedir (99).

3.7.5.1.2. Genotipik Yöntemler

Campylobacter izolatlarının genomundaki nokta mutasyonları ve/veya delesyon mutasyonlarının tespitini esas alan Pulsed-Field Jel Elektroforezi (PFGE), *fla* gen tipleme, Multilocus Sequence Typing (MLST), kısa palindromik tekrarlayan diziler arasındaki bölgelerin (clustered regularly interspaced short palindromic repeats - CRISPRs) dizi analizi, RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA) ve fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis (FAFLP) gibi çeşitli restriction fragment length polymorphism (RFLP) yöntemlerin sürveyans çalışmalarında yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip oldukları gösterilmiştir. Epidemiyolojik tiplendirme metodları kısa süreli epidemilerde ve uzun süreli ve geniş alana yayılan büyük epidemilerde enfeksiyonun kaynağı ve major tipin tespit amacı ile kullanılabileceği gibi, bir salgından izole edilen major tipin daha sonraki salgınlarla muhtemel ilişkisini tespit amacı ile de kullanılmaktadır. Bu sebeple seçilecek olan tiplendirme metodunun, hem kabul gören subtiplendirme şemalarını oluşturan grupları tanımlayabilme özelliğine, hem de yüksek ayırım yeteneğine sahip olması gereklidir (99).

Tüm bakteri genomunun restriksiyon enzimi ile kesilerek, ortaya çıkan bant profillerindeki polimorfizmin değerlendirildiği macrorestriction profile-pulsed-field jel elektroforezi (mrp-PFGE) Campylobacter izolatlarının genotiplendirilmesin de altın standart olarak gösterilmektedir. Bu yöntemde Campylobacter DNA'sı parçalanmadan bir bütün olarak izole edildikten sonra, SmaI veya KpnI restriksiyon enzimi ile kesilerek elde edilen DNA parçaları elektroforezle yürütülmekte ve ortaya çıkan paternler karşılaştırılarak çok sayıda suş aynı anda değerlendirilebilmektedir. DNA'nın SmaI restriksiyon enzimi ile

kesilmesi ile büyüklükleri 40 ila 400 bp arasında değişen 4 ile 20 bant ortaya çıkmaktadır. Ancak DNA'nın Kpn I enzim ile kesilmesi sonucunda daha çok bant profili elde edildiği, bu nedenle bu enzimin kullanıldığı PFGE' in ayırım gücünün daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Bazı araştırmacılar *Campylobacter* izolatlarının genotiplerinin belirlenmesinde eş zamanlı olarak her iki enzimin kullanıldığı mrp-PFGE yöntemlerinin kullanılmasını ve sonuçların korele edilmesini önermektedir. Diğer taraftan PFGE yönteminin yüksek ayırım gücü, *C.jejuni* genomunun stabil olmaması ve genomik yapının sürekli olarak mutasyona uğraması sebebi ile uzun süren global epidemilerde, standart indeks suş tayini ve indeks sapmalarının yorumlanmasını güçleştirmektedir. Bu sebeple PFGE yöntemi ancak kısa süreli epidemilerde, suşlar arası genetik ilişki ve indeks suş ile kaynak tespitinde yardımcı olabilmektedir. Yine PFGE yöntemi ile total genom analizi yapıldığı için iyi korunmuş yapısal genler-housekeeping- ile ilgili spesifik bilgi edinilememektedir. Böylece bu yöntemle değerlendirilen suşların farklılıkları ortaya konmakta ancak filogenetik ilişkilendirme yapılamamaktadır (105).

Global moleküler epidemiyolojik çalışmalarda filogenetik ilişkiyi de ortaya koyan en uygun yöntemler arasında yer alan Multilocus Sequence Typing (MLST) ve Multilocus Enzyme Electrophoresis (MEE) yöntemleri, suptiplendirmede indeks oluştururken, sırası ile, *Campylobacter*lerde ki çok sayıdaki housekeeping gene ait çeşitli lokusların dizi analizi ve bu genlerinin kodladığı enzimlerdeki polimorfizmin tespitini baz alır. Yani MEE ile MLST birbirinin analoğu olan iki yöntemdir. Housekeeping genlerdeki mutasyonlar çok yavaş gelişir ve sıklıkla sessiz mutasyonlardır. Yani meydana gelen mutasyonlar enzimin tabiatını değiştirmez. Bu sebeple MEE ve özellikle MLST bazlı metodlar,

tiplendirilen suşlar arasındaki filogenetik ilişkiyi de ortaya koymaları sebebi ile global epidemilerde başarı ile kullanılmaktadır. Multilocus sequence typing (MLST) ile dizi analiz yapılan lokuslardan elde edilen her allele bir kod verilerek, her suş için bir dizi tipi (ST) belirlenmekte ve elde edilen veri tabanları dijital ortamda saklanmaktadır. Bu metod, otomatize sistemlerde dizi analizinin kolaylıkla yapılabilmesi, daha yüksek ayırım gücüne sahip olması, hedef lokuslarda yavaş gelişen mutasyonlar sebebi ile daha stabil ve tekrarlanabilir sonuçların üretilebilmesi ve elektronik ortama taşınabilen sonuçlarla daha stabil indeks oluşturulabilmesi sebebi ile yaygın kullanım alanı bulmuştur (106).

Genotiplendirmede yaygın olarak kullanılan nükleik asit amplifikasyon metodlarından AFLP (Amplified Fragment Lengthpolymorphism Analysis)/FAFLP (Fluorescent Amplified Fragment Lengthpolymorphism Analysis) prensip olarak PFGE ve MEE'ye benzemektedir. Yüksek ayırım gücüne sahip olduğu bildirilen AFLP yönteminde pürifiye edilmiş tüm *Campylobacter* genomu 6 baz dizisini tanıyan Bg/II veya Hind III ya da dört baz dizisini tanıyan Csp 61, HhaI veya MfeI gibi restriksiyon enzimleri ile kesilmekte, enzim kesim bölgeleri spesifik oligonükleotidlerle (adaptör oligonükleotid) işaretlenmektedir. Aynı tüp içerisinde geliştirilen bu iki reaksiyonun ardından farklı büyüklükteki gen parçaları, adaptör oligonükleotidlere komplementer floresan boya ile işaretli primerler kullanılarak amplifiye edilmekte, amplifikasyon ürünleri, poliakrilamid jel elektroforezi ile ya da otomatize floresansı okuyan sekans analiz cihazlarında görüntülenmektedir (FAFLP). AFLP yöntemi ile mrp-PFGE yönteminin duyarlılıklarının karşılaştırıldığı 91 salgın suşunun değerlendirildiği bir çalışmada, 4 bazlık bir bölgeyi tanıyan BgIII ve MfeI restriksiyon endonükleazların kullanıldığı AFLP yönteminin SmaI restriksiyon enziminin kullanıldığı PFGE

yöntemine göre daha yüksek ayırt etme gücüne sahip olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada AFLP yöntemi ile uzunlukları 50-500 bp arasında değişen, farklı büyüklükte 20-25 bant oluşturduğu, bu bant profillerine göre çalışmaya dahil edilen izolatların 40 farklı AFLP gen kümesi oluşturduğu, PFGE ile elde edilen band profiline göre ise sadece 20 gen kümesi oluşturduğu bildirilmiştir (107).

Campylobacter izolatlarının moleküler epidemiyolojisinde kullanılan PCR bazlı bir diğer yöntemde, Random amplified polymorphic DNA typing (RAPD-DNA) yöntemidir. Bu yöntemle AT yönünden zengin, 8-10 bp uzunluğunda primerler kullanılarak, yüksek tuz konsantrasyonu ve düşük ısıda izolat genomundaki non-spesifik DNA fragmentlerinin amplifikasyonu ve ampliconlar arasındaki polimorfizmin tespiti amaçlanmaktadır. Aynı genotipe sahip suşlar, primerler aynı gen bölgelerine bağlanacağı için ortak ampliconlar üreteceklerdir. Yapılan bir çalışmada RAPD-DNA ve PFGE ile tiplendirilen suşların yüksek derecede benzer profiller verdikleri tesbit edilmiştir. Kolay uygulanabilir oluşu ve düşük maliyeti sebebi ile bu yöntem epidemiyolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bant paternlerinin DNA konsantrasyonundan etkilenmesi ve yorumlanamayan minör bantların oluşumu bu yöntemin en önemli dezavantajları olarak bildirilmektedir (108).

Campylobacter salgın izolatlarının genotipilendirilmesinde *fla* geninin varyasyonlarını ortaya koyan amplifikasyon bazlı *fla*-RFLP ve *fla* genindeki kısa değişken bölgelerdeki (SVA) polimorfizmi belirleyen dizi analiz yöntemleri de kullanılmaktadır.

4. MATERİYAL VE METOT

4.1. Materyal

Bu çalışmada Malatya ilindeki özel bir broiler kesimhanesinden tavuktan kesim esnasında alınan 100 bağırsak ve 100 safra içeriği *C. jejuni* ve *C. coli* yönünden incelendi. Kesim esnasında alınan her numune ayrı ayrı varlığı steril poşetlere konularak vakit geçirmeden laboratuara getirildi. Bağırsak ve safra kesesi ekim, kasım ve aralık ayları arasında 10 defa kesimhaneye gidilerek 10 farklı sürüden numuneler toplandı. Aseptik koşullarda hazırlanmış olan Campylobacter Blood - Free Selective Agar Base'ye ekimi yapıldıktan sonra fazla nemi engellemek amacıyla 2,5-3 saat süreyle etüvde bekletildi. Daha sonra hava sızdırmayan mumlu kavanoza koyularak oksijensiz ortam sağlamak suretiyle ağzı sıkıca kapatılarak 42 °C' de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda besi yeri yüzeyinde üreyen 0,3-0,5 mm çaplı gri, şeffaf, hemoliz yapmayan şüpheli koloniler, Gram boyama ile boyanarak mikroskopik morfolojileri yönünde değerlendirildi. Gram negatif, kıvrımlı veya virgül şeklinde görülen koloniler Campylobacter yönünden değerlendirilmek üzere ayrıca hazırlanmış olan kanlı agara (Blood Agar) ekildi ve aynı şartlarda inkübasyona bırakıldı. Üreme görülen bakteri termofilik Campylobacterler yönünden incelendi. Kanlı agarda üreyen makroskopik ve mikroskopik morfolojik özellikleri Campylobacter yönünden uyumlu koloniler (saf olarak üremiş olanlar) deneme amaçlı olarak 5'er ml' lik fizyolojik tuzlu suda (FTS) süspanse edildi ve DNA ekstraksiyonu yapılarak PCR' da kullanılmak üzere 3'erli eppendorflarda -20 °C' de saklandı.

4.2. Çalışmada Kullanılan Besi Yerleri

Çalışmada bağırsak ve safra içeriklerinde Campylobacter izolasyonu için selektif supplement içeren Campylobacter Blood-Free Selective Agar Base (CCDA agar) ve %7'lik koyun kanı ile zenginleştirilmiş Campylobacter Blood Agar kullanılmıştır.

I.Campylobacter Blood-Free Selective Agar Base

(CCDA)

Agar:

- Nutrient broth No. 2 25 g
- Bacteriological charcoal 4,0 g
- Casein hydrolysate 3,0 g
- Sodium deoxycholate 1,0 g
- Ferrous sulphate 0,25 g
- Sodium pyruvate 0,25 g
- Agar 12,0 g
- Distile su 1000 ml

Supplement :

CCDA Selective Supplement (Oxoid, SR0155)

- Cefoperazone 32 mg/L
- Amphotericin B 10 mg/L

Hazırlanması:

1. 22,75 gr besiyeri tartılarak 500 ml distile su eklendi.
2. Isıtılarak kaynama noktasına getirildi.
3. 121 derecede 15 dk otoklavlanarak sterilize edildi.

4. 50°C'ye soğutuldu.
5. Steril koşullarda 500 ml besi yerine 16 mg cefoperazone ve 5 mg amphotericin B içeren 1 şişe CCDA Selective Supplement (SR0155) eklendi.
6. İyice karıştırılıp, 90 mm çapındaki petri plaklarına 20-25 ml miktarda döküldü.
7. Oda ısısında katılaşmaya bırakıldı.
8. Kullanılincaya kadar +4°C' de muhafaza edildi.

II. Campylobacter Blood Agar

Kanlı agar base	37 gr
Distile su	1000 ml
Defibrine koyun kanı	%7

Ticari olarak temin edilen kanlı agar besi yeri, distile su içerisinde benmaride eritildikten sonra otoklav da 121 °C' de 15 dk sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Oda ısısında soğumaya bırakılan besi yerinin ısısı yaklaşık 50°C 'ye kadar soğutuldu ve 37°C' ye kadar ısıtılmış %7'lik koyun kanları besi yerine karıştırıldı ve petri kutularına eşit şekilde dökülerek katılaşmaya bırakıldı.

4.3. Campylobacter İzolasyonu

Laboratuvara getirilen bağırsak ve safra numuneleri sırasıyla numaralandı (Bağırsak 1, Safra 1). Daha sonra önce bağırsak numunesinin jejunum kısmından kızgın spatulayla dağlanmış bir bölgesi steril bistürüyle kesilerek swab ile alınan bağırsak içeriği ve ince uclu pipet yardımıyla delinerek alınan safra içeriği ayrı ayrı CCDA yüzeyine inoküle edildi. İnokülasyon yapılan besi yerleri sızdırmayan

bir kavanozun içerisinde mum yakılarak oluşturulmuş mikroaerofilik ortamda 42°C’de 48 saat inkübe edildi. Üreme olmayan numuneler 24 saat daha bekletilerek 48 saatte *Campylobacter* üremesi yönünden tekrar değerlendirildi. Üreme görülmeyen petri kutularının inkübasyonuna son verildi. Bu süre sonunda, grimsi renkte, bazen metalik yansıma veren, düz yüzeyli ancak yayılma eğilimi gösteren koloniler, *Campylobacter* yönünden şüpheli görülerek kanlı agara tek koloni ekimleri yapıp saf kültürleri elde edildi. Saf kültürleri elde edilip şüpheli kabul edilen izolatlar Gram boyama tekniği yapıldı ve ışık mikroskopunda immersiyon objektifinde incelendi. Mikroskop incelenmesinde Gram negatif kıvrımlı veya virgül şeklinde görülen bakteriler *Campylobacter* şüphesiyle Polymerase chain reaction (PCR) yöntemiyle doğrulanmak üzere eppendorflarda 1,5 ml sıvı besi yeri içerisinde yoğun süspansiyonları yapılarak - 20°C’de muhafaza edildiler. Saf olmadığı gözlenen kültürler CCDA agara yeniden tek koloni düşürmek yöntemiyle saflaştırılarak aynı işlemler tekrarlandı. Üremenin olmadığı plaklar ise atıldı.

4.4. Moleküler Analiz

4.4.1. DNA Ekstraksiyonu

Campylobacter şüpheli izolatlardan PCR ile identifikasyonu ve RFLP yöntemiyle genotiplendirilmesinde kullanılmak üzere DNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi.

DNA ekstraksiyonunda yöntem olarak proteinaz K ile desteklenen fenol ekstraksiyon yöntemi uygulandı. Saf olarak üretilip ekstraksiyon işlemi için - 20°C’ de saklanan numuneler oda sıcaklığında çözdürüldü. Daha sonra aşağıdaki

basamaklar gerçekleştirilerek DNA ekstraksiyonu yapıldı.

1. Oda ısıssında çözdürülen bakteri süspansiyonları 11.000 rpm'de 5 dk. santrifüje tabi tutuldu.
2. Ekstraksiyon için STE buffer (100 µM NaCl, 50 µM Tris-HCL, 1µM EDTA) hazırlandı.
3. Her bir numunenin üzerine 400 µl STE buffer, 20 µl %20'lik SDS, 5 µl Proteinaz K (20mg / ml) karışımı ilave edildi.
4. Karışım iyice vortekslendi ve 50 °C'de 4 saat inkübe edildi. Her 30 dk'da bir karıştırıldı.
5. Karışım su banyosunda 10 dk. kaynatıldı.
6. Numuneler soğuduktan sonra karışımın üzerine 400 µl phenol + kloroform + izoamil alkol (2,5: 2,1: 1) ilave edildi. İyice vortekslendikten sonra 13.000 rpm'de 8 dk. santrifüj edildi.
7. Süpernatant (300 µl) yeni bir tüpe aktarıldı ve DNA'nın presipitasyonu amacıyla süspansiyona (0,1 hacim 30 µl) 3M Na-asetat ve (2,5 hacim 750 µl) saf alkol ilave edilip karıştırıldıktan sonra -20 °C' de 1 gece bekletildi.
8. Dondurucudan çıkartılan örnekler 13.000 rpm'de 20 dk. santrifüj edildi.
9. Üst kısım döküldükten sonra pelet üzerine 500 µl %70'lik alkol ilave edilerek 13.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi.
10. Alkol döküldükten sonra pelet kurumaya bırakıldı ve daha sonra 100 µl distile su ilave edilerek PCR işleminde hedef DNA olarak kullanıldı.

4.5. Şüpheli İzolatların PCR İle İdentifikasyonları

Şüpheli izolatların PCR ile identifikasyonu amacıyla *C. coli* ve *C. jejuni*'nin ortak *ceuE* genine spesifik, *C. jejuni*'de 793 bp uzunluğunda, *C. coli*'de

ise 894 bp uzunluğunda gen bölgelerini amplifiye eden primerler (*C. coli* için COL1 (5'- ATG AAA AAA TAT TTA GTT TTT GCA – 3') ve COL2 (5' – ATT TTA TTA TTT GTA GCA GCG – 3'), *C. jejuni* için JEJ1 (5' – CCT GCT ACG GTG AAA GTT TTG C – 3') ve JEJ2 (5' – GAT CTT TTT GTT TTG TGC TGC – 3') primerleri kullanıldı (109).

PCR işlemi 25 µl toplam hacimde gerçekleştirildi. Karışım 3.5 mM MgCl₂, 50 mM KCL, 10 mM Tris – HCL, 0.2 mM dNTP karışımı, her bir primerden 1 µM ve 0,5 U Taq DNA polymerase enzimi (Fermantas, Litvanya) ile hazırlandı. 22,5 µl PCR karışımına 2.5 µl DNA ilave edilerek toplam 25 µl hacim elde edildi. PCR işlemi TECHNE Thermal Cyder kullanılarak her siklusu 94 °C'de 30 s. denatürasyon, 57 °C' de 30 s. primer bağlanması ve 72 °C' de 1 dk. sentez basamaklarından oluşan 30 siklus halinde uygulandı.

C. coli ve *C. jejuni* şüphesiyle izole edilen suşlardan ekstrakte edilen DNA'lar önce saf olarak PCR işleminde kullanıldı. Negatif bulunan örnekler, DNA yoğunluğu nedeniyle hatalı negatiflik ihtimaline karşı 1/10 oranında sulandırılarak PCR işlemi tekrarlandı.

4.6. PCR Ürünlerinin Jelde Yürütülmesi

Amplifikasyon işlemi sonrasında hedeflenen bölgeyi temsil eden büyüklükteki ampliconların varlığını tespit amacı ile ampliconlar elektrikli ortamda agaroz jelde yürütüldü. Bu işlem aşağıdaki şekilde yapıldı:

1. % 1,5'luk agaroz jel 1X TBE solüsyonu ile hazırlandı.
2. 1,5 g agaroz tartılarak üzerine 100 ml 1X TBE ilave edildi. Ve karışım homojenizasyon sağlamak için mikrodalga fırında eritildi.
3. Oda ısısında 60 °C' nin altına düşmeyecek şekilde bekletilerek soğutuldu.

4. Hazırlanan ıltılmış jel önceden hazırlanmış ve tarakları uygun olarak yerleştirilmiş jel kalıp tepsisinin üzerine yavaşça döküldü.
5. Oda sıcaklığında 20-30 dk. bekletilerek agaroz jelin katılaşması sağlandı.
6. Katılaşmış agaroz jel elektroforez tankına yerleştirilerek taraklar çok dikkatli bir şekilde çıkartıldı.
7. Örneklerden 10 µl alınarak parafilm üzerinde 2 µl 6x ile Leading dye ile karıştırıldı ve kuyucuklara yüklendi. İlk kuyucuğa PCR ürününün büyüklüğünü tespit amacıyla 100bp DNA ladder yüklendi. 100 V'da 2 saat yürütüldü.
8. Agaroz jel ethidium bromid ile boyanarak UV transilluminatörde incelendi.
DNA ekstraksiyonu ve PCR işlemlerinin sağlıklı bir şekilde yürüdüğünü kontrol etmek için *C. coli* ve *C. jejuni* referans suşları pozitif kontrol olarak kullanıldı. Negatif kontrol olarakda distile su kullanıldı.

4.7. RFLP Uygulamaları

4.7.1. Fla Gene Spesifik PCR

RFLP uygulaması için *C. jejuni* ve *C. coli* olarak identifiye edilen izolatlardan elde edilen DNA örnekleri kullanılarak *fla* genindeki polimorfizmi ortaya koymak amacıyla *fla* genine spesifik PCR işlemi gerçekleştirildi.

PCR işlemi 50 µl toplam hacminde ve 5 µl kalıp DNA, 10 X PCR buffer (750 mM Tris-HCL, 200 mM (NH)SO₄, % 0,1 Tween 20), MgCl₂ (2,5 mM), 1 mM reverse ve forward primerler (FLA1 5'–ATG GGA TTT CGT ATT AAC AC -3', FLA2 5' – CTG TAG TAA TCT TAA AAC ATT TTG -3'), deoksinükleosid

trifosfatdan (200 mM) ve Taq DNA polymerase (1.25 U; 5U/ml, Fermantas, Lithuania).

PCR işleminde touchdown thermal cyclers (Hybaid, Middlesex, England) aleti kullanıldı. PCR karışımı 94°C’de başlangıç denatürasyon basamağını takiben 35 siklus olarak her siklus 94°C’de 15 s. denatürasyon, 45°C’de 45 s. bağlanma (annealing) ve 1 dk zincir uzaması ve 72°C’de 5 dk son zincir uzaması uygulandı. PCR ürünlerinden 10µl alınarak %1’lik agaroz jel yüklendi. *Fla* genine spesifik 1.7 kb uzunluğunda bantların görülmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

4.7.2. Restriksiyon Endonükleaz ile fla-geninin Kesilmesi

C. jejuni ve *C.coli* olarak identifiye edilen izolatların PCR işlemi ile *fla* genindeki genetik polimorfizmini ortaya koymak amacıyla iki farklı restriksiyon endonükleaz enzimi kullanıldı.

fla gen polimorfizmini saptamak amacıyla *Hinf* ve *PtsI* restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanıldı. Restriksiyon analizi için enzim üretici firmanın tavsiye ettiği protokol uygulandı.

Restriksiyon enzimi (<i>Hinf</i> , <i>PtsI</i>)	0,5µl
RE Buffer	2 µl
Asetilated BSA	0,2 µl
DNA	10 µl
Distile su	7,3 µl
Toplam hacim	20 µl

Reaksiyon karışımları, enzimin optimum düzeyde aktivasyonu için Thermal Cycler’da 37 °C’ de 4 saat inkübe edildi.

İnkübasyon sonucunda restriksiyon endonükleaz enzimlerinin etkisiyle ortaya çıkan DNA fragmentlerini ortaya koymak suretiyle *fla* genindeki polimorfizmi belirlemek ve dolayısıyla izolatlar arasındaki genetik farklılığı ortaya koymak amacıyla restriksiyon endonükleaz enzimleriyle DNA ürünleri agaroz jelde yürütüldü.

Her iki enzim kullanılarak optimal şartlarda kesilen ampikonların, kesim yerlerine göre oluşturdukları fragmentlerin büyüklükleri, kesim sonrası ortaya çıkan bant sayısı ve büyüklükleri örneklerin agaroz jelde yürütülmeleri ile belirlendi.

5. BULGULAR

5.1. İzolasyon Bulguları

Bu çalışmada 100 adet Broiler piliçten kesim esnasında alınan 100 bağırsak ve 100 safra numunesi *C. jejuni* ve *C. coli* yönünden incelendi. Çalışmada bağırsak ve safra örneklerinden *Campylobacter* izolasyonu için, *Campylobacter* Blood-Free Selective Agar (CCDA) besi yeri ile % 7 koyun kanlı agar besi yerleri kullanıldı.

İzolasyon çalışmaları sonucunda incelenen 100 bağırsak ve 100 safra içeriğinden oluşan toplam 200 örnekten 40'ı safra ve 52'si bağırsak olmak üzere 92 numuneden *Campylobacter* şüpheli izolatlar elde edildi (Tablo 6).

Tablo 6. İzolasyon Bulguları

	Safra (n= 100)	Bağırsak (n= 100)	Toplam (n= 200)
Campylobacter şüpheli izolat sayısı	40 (%43.4)	52 (%56.5)	92 (%46)
<i>C.coli</i> ile <i>C.jejuni</i> olarak identifiye edilen izolatlar	19 (%20.7)	36 (%39.1)	55 (%27.5)

5.2. İzolasyon esnasında Karşılaşılan Problemler ve Yapılan işlemler

1) Etüvde 42 °C’ de 24 saat bekletilen örnekler incelendiğinde; üzerlerinin bir miktar sulandığını ve üremenin koloniler halinde değil, tüm petri yüzeyine yaygın şekilde gerçekleştiği görüldü. Bireysel kolonilerin oluşmadığı bu tip besi yerlerinde saf izolat elde etmek mümkün olamadı. Bu durumun hangi nedenlerden kaynaklandığını belirlemek amacıyla aşağıdaki ihtimaller değerlendirildi.

- Etüv sıcaklığı uygun olmayabilir.
- Mumlu kavanozun içine uygun nemli ortamı sağlamak amacıyla yerleştirilmiş olan su dolu petriden kaynaklanabilir.
- Sadece mum yakıp gaz pak sistem kullanılmamasına bağlı olabilir.
- Kullanılan kavanoz çatlak olup hava kaçırmış olabilir.
- Besi yerine katılan supplant’lerin etkisi azalmış olabilir.

Bu sebeplere çözüm amacıyla besi yeri, mumlu kavanoza nem sağlamak amaçlı boş petri kutusunda koyulan su çıkarılıp, sağlam hava sızdırmadığından emin olunan yeni bir kavanoz alındı ve bu şekilde tekrar bu kez 37 °C’ de etüve koyuldu. Ertesi gün tekrar sonuçlara bakıldı fakat yine sulanma probleminin devam ettiği görüldü. Bunun üzerine besi yerleri atıldı. Yeni getirilen numuneler tekrar besi yerine ekimi yapıldı fakat bu kez besiyerlerinin sulanmalarını engellemek için mumlu kavanoza koymadan önce besi yerleri kullanılmadan önce

etüvde bir gün bekletilerek ve yine boş petriye az bir miktar su koymak suretiyle mumlu kavanoza yerleştirildi 42°C’de 24 saat inkübe edilerek incelendiğinde sulanmanın olmadığı ve sorunsuz olarak bireysel kolonilerin şekillendiği görüldü.

2) Karşılaşılan bir diğer problem ise; sulanma problemini aşmak amacıyla etüvde iyice kurutulan besi yerlerine yapılan ekimlerde karışık bir takım bakteriler ürettiği fakat bunun yanında hiçbirinde *Campylobacter* ümediği sadece referans suş olarak kullanılan *C. jejuni*’nin ürettiği görüldü. Bu durumun;

- Nem oranının çok düşük olması nedeniyle besi yerlerinde oluşan kuruluştan kaynaklanabileceği düşünüldü.

Karışık üremenin görüldüğü besi yerleri atıldı ve referans suş olan *C.jejuni* yenilenerek 42°C de etüve yerleştirildi. Nem oranları kontrol edilerek yeni numunelerle tekrar çalışıldı ve uygun koşullarda üremenin kimi saf kimi karışık olarak *Campylobacter* içerdiği görüldü.

Sonuç itibariyle besi yerlerinin ve bulundukları ortamın nem oranının çok kritik bir öneme sahip olduğu kanısına varıldı. Fazla nemin besi yerinin sulanmasına ve dolayısıyla bireysel kolonilerin oluşmayıp kolonilerin tüm yüzeye yayılmasına neden olduğu gözlemlendi. Yetersiz nemin ise *Campylobacter*lerin üremesine engel olduğu, diğer kontaminant bakterilerin üremesine fırsat verdiği görüldü. Bu nedenle başarılı bir izolasyon gerçekleştirmek için, *Campylobacter* izolasyonunda kullanılacak besi yerlerinin hazırlandıktan sonra bir gece 37 C’de etüvde bekletildikten sonra hava geçirmez steril kaplarda +4 C’de buzdolabında saklanması ve bir hafta içinde kullanılması gerekmektedir.

5.3. PCR identifikasyonu

Campylobacter şüpheli izolatlardan fenol ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen DNA'larla bu iki türde mevcut olan *ceuE* genine spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR işlemi sonucunda, COL1 ve COL2 primerleriyle test edilen izolatlardan 894 bp uzunluğunda *C. coli*'ye spesifik, aynı şekilde JEJ1 ve JEJ2 primerleriyle yapılan PCR işleminde de 793 bp uzunluğunda *C. jejuni*'ye spesifik bantlar elde edildi. İzolatlarla birlikte kullanılan pozitif kontrollerle de kullanılan primerlere uygun uzunlukta pozitif bantlar elde edildi. Negatif kontrol olarak kullanılan distile su ile herhangi bir pozitif reaksiyon gözlenmedi (Şekil 2).

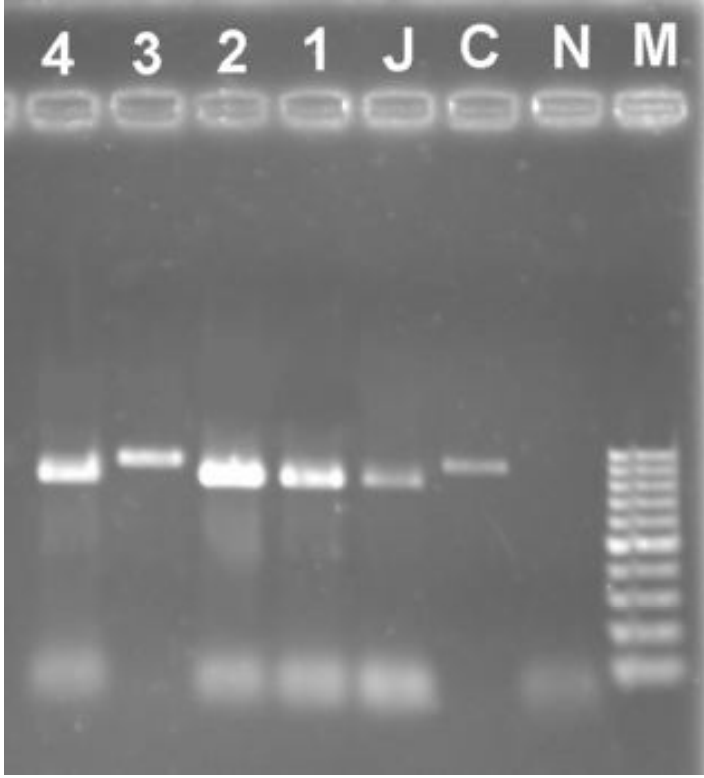
C.coli ve *C.jejuni*'ye spesifik olarak yapılan PCR işlemi neticesinde incelenen toplam 200 örnekten elde edilen şüpheli 92 (%46) izolatın 51 (%55,4) tanesinin *C. jejuni*, 4'ünün (%4,3) ise *C. coli* olduğu belirlendi. Şüpheli izolatların 37 tanesinden ise pozitif bant tespit edilmedi.

İncelenen 100 barsak numunesinin 36'sından (%36) Campylobacter şüpheli izolat elde edildi ve bu izolatlardan 34'ü (%94,4) *C. jejuni*, 2'si de (%5,5) *C.coli* olduğu belirlendi.

İncelenen 100 safra numunesinden ise 19 (%19) Campylobacter şüpheli izolat elde edildi ve bu izolatlardan 17'si (89,4) *C. jejuni*, 2'si (10,5) *C. coli* olarak belirlendi (Tablo 7).

Tablo 7. Şüpheli Campylobacter izolatlarına uygulanan PCR sonuçları

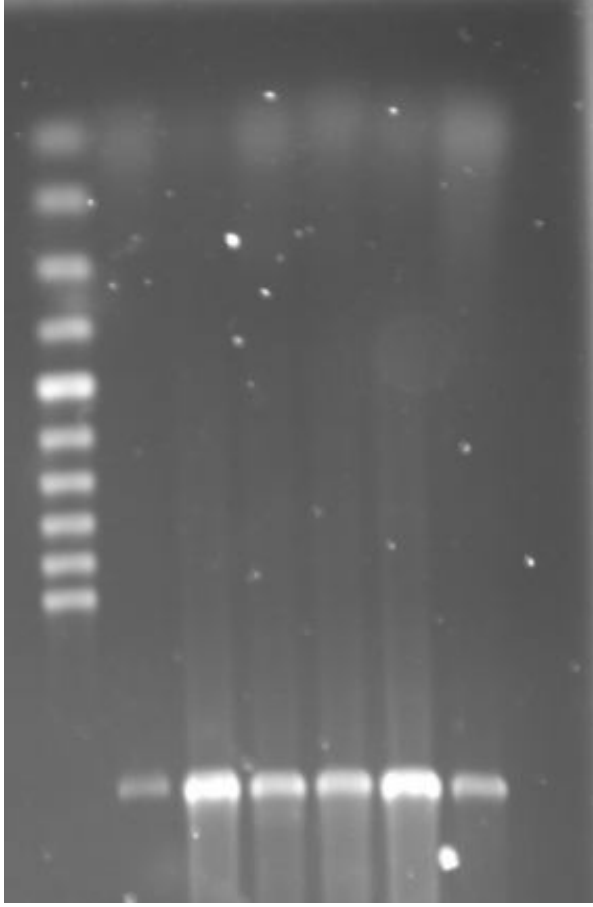
Numune adı	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>	Toplam
Bağırsak (n: 100)	2 (% 5.5)	34 (% 94.4)	36 (% 39.1)
Safra (n: 100)	2 (% 10.5)	17 (% 89.4)	19 (% 20.7)
Toplam (n: 200)	4 (% 4.3)	51 (% 55.4)	55 (% 59.7)



Şekil 2. *C.jejuni* ve *C. coli*'ye ait agaroz jel elektroforez jel görüntüleri

5.3. *fla* PCR sonuçları

İncelenen 92 şüpheli izolatla yapılan PCR ile *C.jejuni* veya *C. coli* olarak identifiye edilen 55 izolattan seçilen 38 (4'ü *C.coli*, 34'ü *C.jejuni*) izolata *fla* spesifik PCR işlemi uygulandı. *fla* genine spesifik PCR sonucunda 1.7 kb uzunluğunda bantların oluşması pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi (Şekil 3).



Şekil 3. Fla genine spesifik PCR sonucunda elde edilen 1700 bp uzunluğudaki pozitif bantlar

5.4. Restriksiyon (fla-RFLP) Analiz Sonuçları

C. jejuni ve *C. coli* olarak identifiye edilen izolatlardan *fla* genine spesifik yapılan PCR uygulamasında (*fla* genindeki polimorfizmi belirlemek amacıyla) güçlü pozitif bant veren 38'i (37 *C. jejuni*, 1 *C. coli* PtsI ve Hinf restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildi.

38 (37 *C. jejuni*, 1 *C. coli*) izolata ait PCR ürünlerinin *Hinf* ve *PtsI* enzimleri kullanılarak yapılan restriksiyon analizi (RFLP analizi) sonucunda;

PtsI enzimi ile yapılan analiz işleminde toplam 4 farklı band profili elde edildi. Bu profiller A,B,C, ve D olarak adlandırılan *C. jejuni*'ye ait A profili 8 bağırsak, 5 safra izolatında, B profili 5 bağırsak, 3 safra izolatında, C profili 9 bağırsak, 3 safra izolatında, D profili de 2 bağırsak, 2 safra izolatında tespit edildi. Bunların dışında bağırsaktan izole edilen 1 adet *C.coli* izolatının B profiline ait olduğu görüldü.

Hinf enzimi kullanılarak yapılan analiz işleminde ise toplam 2 farklı profile rastlandı. Bu profiller a ve b şeklinde adlandırıldı. *C. jejuni*'ye ait a profili 23 bağırsak, 10 safra izolatında, b profili ise 2 bağırsak, 2 safra izolatında belirlendir. Benzer şekilde bağırsaktan izole edilen 1 adet *C. coli*' nin A profiline ait olduğu saptandı.

Seçilmiş 38 izolatının yapılan *PtsI* enzimi ile yapılan restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim sonuçlarına bakıldığında en yaygın profillerin A ve C profilleri olduğu görüldü. Daha az yaygın olarak da B ve D profilleri saptandı. Aynı izolatların *Hinf* enzimi ile yapılan restriksiyon analizinde ise sadece iki profilin varlığı saptandı ve bu profillerden en yaygın olarak a profilinin varlığı gözlemlendi.

6. TARTIŞMA

Campylobacterler insan ve hayvan sağığı bakımından büyük öneme sahiptirler. Campylobacter'lerin gerek gastrointestinal sistemde oluşturdıkları primer infeksiyonlar ve komplikasyonları, gerekse intestinal sistem dışında yaptıkları hastalıklarla ilgili önemli bulgular vardır (10). Akut gastroenterit olgularının büyük bir çoğunluğundan *C.jejuni* (%90) ve *C.coli* (%5-10) sorumlu tutulmaktadır (110). Bu durum Campylobacter enfeksiyonlarının önemini artırmakta ve dolayısıyla bu mikroorganizmaların etkin moleküler yöntemler kullanılarak tespiti, identifikasyonu ve genetik poliformizminin belirlenmesi oldukça önem taşımaktadır.

Bu çalışmada klasik kültür yöntemi kullanılarak *C. coli* ve *C. jejuni*'nin broilerlerden izolasyonu, PCR yöntemi ile identifikasyonu ve PCR-RFLP (*fla* typing) yöntemi kullanılarak genotiplendirilmesi gerçekleştirildi.

Evcil hayvanlarda ve insanlarda çeşitli sistemlerde meydana gelen Campylobacter enfeksiyonlarının zoonotik özellikte oldukları kesinlikle ortaya konulmuştur. Başta kanatlılar olmak üzere birçok hayvan türü bu mikroorganizmayı taşıyıcı durumundadır. *C.jejuni* ve *C.coli* bu hayvanların normal bağırsak florasında bulunabildiğı gibi evcil türlerin tümünde enterit, mastitis ve abortuslara neden olduğu çalışmalarla ortaya konulmuştur. İnsan infeksiyonları için en önemli Campylobacter kaynakları, evcil hayvanlar ve hayvansal kaynaklı besin maddeleridir. Özellikle hijyenik koşulların yetersiz olduğu ortamlarda portör hayvanlarla direkt temas, gelişmiş ülkelerde de hayvansal gıdalar önemli enfeksiyon kaynaklarını oluşturmaktadır (1).

Campylobacterlerin bağırsaklarda yüksek oranlarda bulunmasından dolayı tavuk karkaslarının çeşitli bölümlerinden çok sayıda termofilik Campylobacter türleri izole edilebilmektedir (111). Kinde ve ark. (112), tavuk kanatlarından % 82 oranında, Shanker ve ark. (113), işlenmiş 40 broiler karkasının 18'inden, Flynn ve ark. (114) ise inceledikleri tavuk kanatlarının %64.7'sinden *C. jejuni* ve *C.coli* izole etmişlerdir. Willis ve ark (115) bir yıl boyunca piyasadan temin ettikleri broiler karkaslarında %69 oranında *C. jejuni* izole ettiklerini, pozitif örnek sayısının Haziran ve Temmuz aylarında en yüksek (% 97), Aralık ayında ise en düşük (% 7) olduğunu bildirmişlerdir. Atanassova ve ark (116) Almanya'da yaptıkları çalışmada Campylobacter pozitif broiler karkaslarının oranını % 45.9 olarak belirlemişlerdir. Uyttendaele ve ark. (117) ise Belçika perakende piyasasını temsilen toplam 772 adet tavuk eti ve ürününün % 36.5'inin *C. jejuni* ve % 28.5'inin ise *C. coli* ile kontamine olduğunu tespit etmişlerdir.

Türkiye'de tavuk eti ve ürünlerinde *C.jejuni* varlığı ile ilgili yapılan çalışmalarda, Yıldız ve ark (118) hazır tavuk karkaslarının göğüs, boyun, kanat ve butlarından yaptıkları izolasyon çalışmalarında birbirine çok yakın oranlarda (% 96, % 98, % 99 ve % 98) *C. jejuni* tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Koç (119), kesim periyodundaki 7-9 haftalık broilerlerin % 45'inden Campylobacter izolasyonu yapıldığını ve bunların % 55.8'inin *C. jejuni*, % 44.1'inin ise *C. coli* şeklinde identifiye edildiğini belirtmiştir. Aynı araştırmacı izole edilen *C. jejuni* suşlarının Lior biyotiplendirme sistemine göre 3 biyotipe, *C. coli* suşlarının ise 2 biyotipe ayrıldıklarını (120), Skirrow-Benjamin biyotiplendirme sistemine göre 2 biyotipe ayrılan *C. jejuni* suşlarının çoğunluğunun biyotip I olduğunu tespit etmiştir (121). Yıldırım (122), paketlemeye hazır kuru kesim broilerlerde % 84,

ıslak kesim broilerlerde ise % 100 oranında *C. jejuni* bulunduğunu belirlemiştir. Ergün ve ark. (123), kesim şartları, teknik ve hijyenik açıdan birbirinden farklı 4 tavuk mezbahasında, mikrobiyolojik olarak karşılıklı kontaminasyonun yüksek olduğu safhalardan (tüyler yolunduktan, iç organlar çıkarıldıktan ve yıkamadan sonra) alınan boyun, kanat, renal ve but svap örneklerinin % 100'ünün *Campylobacter* yönünden pozitif bulunduğunu, bunların % 70.4'ünün *C. jejuni*, % 29.6'sının ise *C. coli* olarak identifiye edildiğini bildirmişlerdir. Diğer bir çalışmada Özer ve ark (124), İstanbul piyasasında satışa sunulan çiğ ve ısı işlemi görmüş toplam 250 adet tavuk eti ve ürününü *C. jejuni* varlığı yönünden incelemişler ve analiz edilen 50 adet çiğ tavuk karkasının 48'inden (% 96), 40 adet çiğ işlenmiş tavuk eti ürününün 26'sından (%65) ve ısı işlemi görmüş 60 adet tavuk dönerin 3'ünden (%5) *C. jejuni* izole etmişlerdir. Yapılan identifikasyon çalışmaları sonucu 97 (% 39) adet pozitif çiğ örneğin 49 (% 52)'unda *C. jejuni*, 18'inde (% 16) *C. coli* ve 27 (% 28) *C. laridis* tanısı koymuşlardır. 3 adet pozitif pişmiş örneğin 2'sinde (% 67)'sinin *C. jejuni*, 1'inin (% 33) ise *C. coli* olduğunu belirlemişlerdir. Farklı diğer bir çalışmada da, Ertaş ve ark. 200 broilere ait 200 karaciğer ve 200 bağırsakörneği olmak üzere toplam 400 numune ile çalışmışlar ve bu örneklerin 57'inin (% 14.25) *C.jejuni* ve 45'inin (%1.25) *C.coli* olduğunu belirtmişlerdir (125). Çeşitli araştırmacılar kanatlılardaki *Campylobacter* sayılarının incelenen organa, kesim yöntemine, örnek alma, taşıma şekline ve izolasyonda kullanılan besi yerine göre değişiklikler gösterdiğini bildirmişlerdir (37, 126, 127). Lior (120), bütün *C.jejuni* ve *C. coli* suşlarının çoğunluğunun biyotip 1'e ait olduğunu bildirmiştir. Skirrovv-Benjamin (121), kendi

geliştirdikleri sisteme göre kanatlı orijinli *C. jejuni* suşlarının %52'sinin biyotip II olduğunu bildirmişlerdir.

Elde ettiğimiz izolasyon bulgularını değerlendirdiğimizde, *C. jejuni*'nin (%55,4), *C. coli*'ye (% 4,3) göre daha yüksek oranda olduğunu görmekteyiz. Çalışmada karşılaşılan bu sonuçlar Dünyada ve Türkiye'deki sonuçlarla uyumluluk göstermektedir. Yukarıda sonuçları aktarılan çalışmaların tümünde *C. jejuni*'nin diğer *Campylobacter* türlerine göre daha yüksek oranda izole edildiği görülmektedir. Bizim  alışmamızda literatür verilerine uyumlu bir şekilde *C. jejuni* izolasyon oranı (%55,4), daha yüksek elde edilmiştir.

Yapılan  alışmalarda *Campylobacter* izolasyon oranlarının %100'e yakın olarak tespit edildiği bildirilmiştir. Bu çalışmada elde edilen % 59,7 izolasyon oranının diğer bazı çalışmaların sonuçlarından düşük olduğu dikkati çekmektedir. Sonu larımızdaki bu farklılık diğer çalışmalara göre farklı materyaller kullanmış olmamıza bağlanabilir. İzolasyon oranlarının çok yüksek olduğu çalışmalarda çoğunlukla kesim sonrası broiler karkaslarından etken izolasyonu yapılmış. Broiler karkası kesim esnasında diğer bütün karkasların içinden geçtiği yıkama ve tüy yolma sistemlerini ortak olarak kullanmaktadır. Binlerce broiler karkasının geçtiği yoğun kontamine olmuş kesim üniteleri, içinden geçen bütün karkasları kontamine edebilmektedir. Dolayısı ile kontamine olmayan hayvanların karkasları kesimhane süreçlerinde kontamine olabilmektedir. Bu numunelerden elde edilen izolasyon oranları da doğal olarak yüksek olacaktır. Bu çalışmada ise kesimhane kontaminasyonunun etkilemediği bağırsak ve safra kesesi gibi organlar kesimden hemen sonra izolasyon amacıyla incelenmiştir. Çalışmadaki izolasyon oranlarının diğer bazı çalışmalardan düşük olması bu farklılıklara bağlanabilir.

Farklı araştışıcılar kanatlılardaki *Campylobacter* oranlarının incelenen organa, kesim yöntemine, örnek alma, taşıma şekline, izolasyonda kullanılan besi yerine göre değişiklikler gösterdiğini bildirmişlerdir (37,126,127). Çalışmamızda, *Campylobacter* izolasyonu amacıyla yaygın olarak kullanılan, selektif supplement ilaveli CCDA agar kullanılarak doğrudan ekim yöntemi ile etken izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Aynı numunelerin birden fazla izolasyon yöntemi kullanmak suretiyle izolasyon oranlarının arttırılması mümkün olabilir. Zira farklı izolasyon yöntemlerinde kullanılan kimyasallar, inhibitör antibiyotikler ve zenginleştirme aşamaları, daha az sayıda mikroorganizmanın tespitini mümkün kılmaktadır.

Campylobacter türü mikroorganizmaların, dışkı örneklerindeki varlıkları ile tür ve tip düzeyinde tanımlanmalarının yapılmasında kültür bazlı konvansiyonel yöntemler güncelliğini korumakla birlikte son yıllarda PCR ve hibridizasyon gibi nükleik asit amplifikasyonu esasına dayanan yöntemler de yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Dışkı örneklerinden bakterinin izolasyonuna gerek duymaksızın tür ve tip düzeyinde tanıyı mümkün kılan bu yöntemlerle, bakteri sayısının kültürde izolasyon için gerekli olan sınırın altında olması halinde bile yüksek duyarlılıkta pozitif sonuçlar elde edilebilmektedir. Moleküler yöntemlerin, klinik örneklerdeki *Campylobacter* türlerinin tanısındaki duyarlılıklarını belirlemeye yönelik çok sayıdaki araştırmada bakteri genomundaki; 16SrRNA *hipO*, *glyA*, *asp*, *cadF*, *lpx*, *ceuE*, *mapA* geni gibi tür, grup veya tip spesifik gen dizilerini hedef alan primerler kullanılmıştır. Bu araştırmalarda PCR bazlı yöntemlerin başarısını etkileyen en önemli iki unsurun dışkıdaki inhibitörler ve hedef bölgenin doğru seçimi olduğu bildirilmiştir (75).

Bu çalışmada izolasyon işlemi sonrası şüpheli izolatların identifikasyonu amacıyla PCR identifikasyon yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada kullandığımız PCR yöntemiyle *C.jejuni* ve *C. coli* türlerinin aynı PCR işleminde başka bir yöntemle gerek duyulmadan oldukça hızlı ve doğru şekilde identifikasyonu sağlanmıştır. Her iki türde de mevcut olan *ceuE* geninden aralarında yaklaşık 100 bp fark bulunan iki ayrı bant oluşturacak biçimde seçilmiş primerlerden faydalanılarak aynı PCR işleminde bu iki türün birbirinden ve diğer *Campylobacter*lerden ayırımı mümkün olmuştur. Bu primerler kullanılarak etkili bir DNA ekstraksiyon metodu uygulandığı takdirde saf kültürler yerine doğrudan klinik numunelerle de bu tekniğin uygulanması mümkün olacaktır. Böylece izolasyon basamaklarında gerekli olan selektif besi yerleri, mikroaerofilik ortam gaz kitleri gibi masraflardan ve bununla birlikte izolasyon basamaklarında harcanan zamandan tasarruf sağlanmış olacaktır.

Karşılaştırmalı genomik çalışmalar, klinik ve çevresel örneklerden izole edilen *C.jejuni*, *C.coli* ve *C.lari* suşlarının genomunun yüksek düzeyde homoloji gösterdiğini ve üç tür arasındaki homolojinin PCR bazlı testlerin performansını etkileyeceğini ortaya koymuştur. Mesela *C. jejuni*, *C. coli* ve *C.lari*'nin 16S rRNA gen dizisinin çok yüksek oranda benzerlik gösterdiği ve bu nedenle bu gen bölgesini hedef alan PCR yöntemlerinin, üç türün ayırımı için elverişsiz olduğu belirtilmiştir (76). Aynı benzerlik 23S rRNA geninde de gösterilmiştir. Bu tür yüksek homoloji gösteren gen dizilerinin hedef alındığı tiplendirme çalışmalarında, tip tayini için, şayet çoğaltılan bölge polimorfik ise, uygun restriksiyon endonükleaz enzimlerinin kullanıldığı PCR-RFLP yöntemi ile tanıya gitmek mümkündür. Engvall ve ark (1999) (79), *Campylobacter*ler'in 23S rRNA

geni üzerinde 43 ile 69. heliksler arasında kalan ve termofilik *Campylobacter*ler için tür spesifik olan 491 bp'lik polimorfik bir bölgenin amplifikasyon ürünlerinin, *AluI* ve *Tsp509I* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmesi sonucu oluşan DNA fragmentlerinin polimorfizminin, termofilik *Campylobacter*ler için tanı değerine sahip olduğunu göstermişlerdir. Araştırmada; daha önce çevresel örneklerden izole edilmiş ve tür tanımlaması yapılmış , 77 *C.jejuni*, 17 *C.coli*, 10 *C.lari* ve 14 *C.upsaliensis* suşu ile termofilik olmayan 7 *Campylobacter* suşu ile içlerinde *Helicobacter pylori*, *Salmonella* türleri ve *Escherichia coli*'nin yer aldığı 30 farklı suş, 23S rRNA PCR-RFLP yöntemi ile tiplendirilmiştir. Termofilik *Campylobacter* türleri dışındaki test suşlarının hiçbirisinde hedef bölge amplifikasyonu gerçekleşmemiştir. Hedef bölgeleri amplifiye olan suşların amplikonlarının restriksiyon endonükleaz enzim analizinde ise; çalışma öncesi fenotipik yöntemlerle *C.jejuni* olarak tanımlanan bir suş *C.coli* ve *C.coli* olarak tanımlanan bir suş ise *C.jejuni* olarak tanımlanmış, bu iki suş dışındaki diğer bütün termofilik suşlar fenotipik yöntemlerle uyumlu bant polimorfizmi vermiştir.

Campylobacter izolatlarının genotiplendirilmesinde RAPD, PFGE, RFLP, gibi yöntemler kullanılmaktadır. RAPD (random amplification of polymorphic DNA) yöntemi tüm genomu hedef olarak kullanmasına rağmen, kullanılan primerler doğru seçilmediği durumda yeterli bağlanma noktası bulamaması sonucu yetersiz band profilleri elde edilmesi gibi sorunlarla karşılaşılabilir. *Campylobacter* izolatlarının genomundaki nokta mutasyonları ve/veya delesyon mutasyonlarını esas alan Pulsed-Field Gel Elektroforezi (PFGE), yöntemi son yıllarda popüler olan, ayırım gücü ve tekrarlanabilirliği oldukça yüksek ve kıyaslanabilir bir yöntem olmasına rağmen

pahalı ekipmanlara ve sarf malzemelere ihtiyaç duyulması ve uzman personel gereksinimi gibi zorlukları vardır. Tiplendirme yöntemleri içinde PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) yönteminin ise diğer yöntemlere göre kolay uygulanabilmesi, tüm genom yerine değişkenlik gösteren *fla* genini hedef alması ve doğru enzimler seçildiği takdirde yeterli ayırıcı güce sahip olduğu bilinmektedir. Bu tiplendirme metodları kısa süreli epidemilerde, uzun süreli ve geniş alana yayılan büyük epidemilerde enfeksiyonun kaynağı ve major tipin tespit amacı ile kullanılabileceği gibi, bir salgından izole edilen major tipin daha sonraki salgınlarla muhtemel ilişkisini tespit amacı ile de kullanılmaktadır. Bu sebeple seçilecek olan tiplendirme metodunun, hem kabul gören subtiplendirme şemalarını oluşturan grupları tanımlayabilme özelliğine hem de yüksek ayırım yeteneğine sahip olması gereklidir (129).

Ertaş ve ark'nın (125) broilerlerin karaciğer ve bağırsak numuneleriyle yapmış olduğu çalışmada 45 *C.jejuni* ve 50 *C.coli* izolatına RAPD analiz yöntemi uygulanmış ve 5 farklı profil elde edilmiştir. Elde edilen profillerden 2. bant profilinde sadece *C. coli* gözlemlenirken, 4. bantta sadece *C. jejuni* gözlemlenmiştir. Diğer üç bant profilinde ise her iki türün varlığı tespit edilmiştir. Karenlampi ve ark. (130) *Campylobacter* türlerinin *groEL* geninde tür spesifik polimorfik dizilerin 517 bp uzunluğunda bir fragmanda yer aldığını, bu fragmentin PCR ile amplifikasyondan sonra *AluI* ve *ApoI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi sonucu oluşan polimorfik 87 fragment profillerinin termofilik *Campylobacter* türleri için spesifik bir tanı kriteri olduğunu bildirmişlerdir. Diğer bir çalışmada, akut ishallerde *Campylobacter* tanısı amacıyla PCR ile çoğaltılarak, 491 bp uzunluğundaki hedef bölge ile

uyumlu fragment büyüklüğüne sahip olan ampikonlar, tip tayini amacı ile *Alu I* ve *Tsp 509I* restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak RFLP analizi yapılmış, oluşan fragmentlerin polimorfizmi agaroz jel elektroforez işlemi ile görüntülenerek değerlendirilen örneklerden 18'inin (%81,8) profilinin *C.jejuni*, 4'ünün (% 18,2) profilinin *C.coli* ile uyumlu olduğu bulunmuştur.

Fla genine dayalı izolatlar arasındaki genotipik farklılıkları ortaya koymak amacıyla PCR-RFLP (*fla* typing) yöntemi kullanıldı. Bu amaçla seçilen 38 izolatın iki farklı restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak genotiplendirilmesi yapıldı. 4 *PtsI*, 2 *Hinf* olmak üzere 6 farklı profil elde edildi. Kullanılan *PtsI* enziminin profil sayısına bakılarak; yapılan ayırma işleminde bu enzimin *Hinf*'e göre daha iyi ayırt edici potansiyele sahip olduğu söylenebilir. Bu çalışmada da veriler diğer yapılan çalışmalarınki ile paralellik göstermektedir. Ancak çalışmamızda profil sayısı diğer bazı çalışmalara göre az bulunmuştur. Bunun nedeni olarak, incelediğimiz kümeslerin tek bir işletmeye ait olması, kümes bakım koşulları, aynı bölge olması itibariyle coğrafi koşulların ve iklim şartlarının aynı olması beslenme türlerinin de yine aynı şekilde olması gibi nedenlerin etkili olduğu düşünülmektedir.

PCR-RFLP yöntemi ile daha fazla sayıda genotipik farklılığın ortaya konulması için daha fazla sayıda enzim ya da enzim kombinasyonlarının kullanılması düşünülebilir. Farklı restriksiyon enzimlerinin farklı kesim noktalarına sahip olması nedeniyle oluşacak bant sayıları ve dolayısıyla bant profillerinin sayısında farklılıklar ortaya çıkabilir.

Bu çalışmada sağlıklı görünen proiler piliçlerin bağırsak ve safralarının insanlar için enfeksiyon kaynağı olan *Campylobacter* türleri ile önemli oranda

kontamine olduğu tespit edildi. Bu durum, kesim esnasında ve kesim sonrasında, depolama, nakliye ve parçalama gibi aşamalarda elde edilen tüm ürünleri kontamine etme ihtimalini ve insan sağlığı açısından hastalık potansiyelini arttırmaktadır. Campyolacter izolatlarının identifikasyonunda PCR yönteminin klasik yöntemlere göre daha hızlı sonuç verdiği, daha az işgücü gerektirdiği görüldü. İzolatların genetik karakterizasyonu amacıyla yapılan tiplendirme çalışmalarında ise birden fazla genotipin yaygınlığı dikkati çekmektedir. Bu durum kanatlı kümeslerinin çok farklı genotipte etkenler tarafından kontamine edildiğini göstermektedir.

Campylobacterlerin kanatlılardaki kolonizasyonu, enfeksiyon kaynakları, taşınma yolları ve patogenezesinin aydınlatılması için daha kapsamlı ve daha gelişmiş yöntemlerin kullanıldığı araştırmaların yapılması gerekmektedir.

Ayrıca elde edilen sonuçlara ve devam eden çalışmalara da bakılarak broilerlerin potansiyel bir sağlık riski oluşturduğu dikkate alınmalıdır. Halk sağlığını korunmasına yönelik broiler üretiminde uygun hijyenik ve teknolojik koşullar sağlanmalıdır. Özellikle çocukluk döneminde sekretuvar veya dizanterik formda seyreden ishallerde termofilik Campylobacter türlerinin mutlaka araştırılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

- 1) Arıkoğlu Ç, Aydın F. Kars Yöresinde Evcil ve Yabani Hayvanlarda *Campylobacter jejuni*'nin Prevalansı. Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg. 1997; 2(3): 173-180.
- 2) Darka Ö, Yılmaz Y.A, Tavuk Eti ve *Campylobacteriosis*. Hacettepe Tıp Dergisi. 2004; 35: 100-102.
- 3) Yılmaz A.A, Tuğrul H.M, Edirne 'de İshal Etkenleri Arasında *Campylobacter* Türlerinin Yerinin ve Antimikrobiklere Duyarlılıklarının Araştırılması. Turkish Journal of Infection. 2005; 19(1): 53-59.
- 4) Blaser, M. H, Powers, H, Wang, B. Survival of *Campylobacter jejuni* in biological milieus. J. Clin. Microbiol 1980; 127: 309-313.
- 5) Russell RG, et al. Early colonic damage and invasion of *Campylobacter jejuni* in experimentally challenged infant *Macaca mulatta*. J Infect Dis 1993; 168: 210-5.
- 6) Blaser M, Berkowitz I, LaForce F, Cravens J, Reller L, Wang W. *Campylobacter* enteritis: clinical and epidemiological features. Ann. Intern. Med. 1979; 91: 179-185.
- 7) Blaser M, Hardesty H, Powers B, Wang W. Extra intestinal *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections: host factors and strain characteristics. I. Infect. Dis. 1986; 153: 552-559.
- 8) Aarestrup FM, Engberg J. Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. Vet Res 2001; 32: 311-21.
- 9) Molina JM, Casin I, Hausfater P, Giretti E, et al. *Campylobacter* infections in HIV-infected patients: clinical and bacteriological features AIDS 1995; 9: 881.
- 10) Butzler JP, Dekeyser P, Detrain M, Dehaen F. Related vibrio in stools. J Pediatr. 1973; 82: 493-495.
- 11) Ghareeb K, Awad WA, Mohnl M, Porta R, Biarnés M, Böhm J, Schatzmayr G. Evaluating The Efficacy of an Avian-Specific Probiotic To Reduce The Colonization of *Campylobacter jejuni* In Broiler Chickens. Poultry Science, 2012; 91(8): 1825-32.
- 12) Çokal Y, Caner V, Çetin C, Şen A. Etlik Piliç Kümeslerin Su Hatlarında *Campylobacter coli* Varlığı. Kafkas Univ Vet Derg. 2011; 17 (6): 1035-1038.
- 13) Koluman A. Piliç Kümesleri ve Kesimhanelerinde *Campylobacter jejuni* Kontaminasyonunun belirlenmesi. Türk Hijyen Ve Deneysel Biyoloji Dergisi. 2010; 67(2): 57-64.
- 14) McFadyean J, Stockman S. Report of the Departmental Committee Appointed by inquire into Epizootic Abortion. III. Abortion in Sheep London: HMSO, 1913.
- 15) Smith T. The etiological relation of *Spirilla* (V. Fetus) to bovine abortion. J Exp Med, 1919; 30: 313-323.
- 16) Jones FS, Orcutt M, Little RB. Vibrios (*Vibrio jejuni* n.sp.) Associated with intestinal disorders of cows and calves. J Exp Med 1931; 53: 853-864.
- 17) Doyle LP. A vibrio associated with swine dysentery. Am J. Vet Res 1944; 5: 3-5.

- 18) King EO. Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related vibrio. *J infect Dis* 1955; 101: 119-128.
- 19) Dekeyser P, Gossuin- Detrain M, Butzler JP, Sternon J. Acute enteritis due to a related vibrio: first positive stool cultures. *J Infect Dis* 1972; 125: 390-392.
- 20) Skirrow MB. *Campylobacter* enteritis: a 'new' disease. *BMJ* 1977; 2: 9-11.
- 21) On SLW. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* 2001; 90: 1-115
- 22) Veron M, Chatelain R. Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Verond and designation of the neotype strain for the type species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Veron. *International of Systematic Bacteriology* 1973; 23: 122-134
- 23) Hansson I. Bacteriological spp. In Swedish Broilers. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2007.
- 24) Smibert R M. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Ed. USA: Springer, 2005; 145- 1165.
- 25) Blaser MJ. *Campylobacter jejuni* and related species. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, eds. *Principles and practise of infectious diseases*. Fifth ed. Philadelphia: Churchill Livinstone, 2000: 2276-85.
- 26) Ketley MJ, Konkel ME. *Campylobacter Molecular and Cellular Biology*. First ed Norfolk: Horizon Bioscience, 2005.
- 27) Karin G, Bart C.J, Wouter VR, Anne P, et al. Functional polymorphisms in LPS receptors CD14 and TLR4 are not associated with disease susceptibility or *Campylobacter jejuni* infection in Guillain-Barre patients. *Journal of Neuroimmunology* 2004; 150: 132-138
- 28) Karlyshev AV, Linton D, Gregson NA, Wren BW. A novel paralogous gene family involved in phasevariable flagella-mediated motility in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology* 2002; 148: 473-480.
- 29) Corry JEL, Post DE, Colin P, Laisney MJ. Culture media for the isolation of *Campylobacters*. *Int J Food Microbiol*. 1995; 26(1): 43-76.
- 30) Kelly DJ. The physiology and metabolism of *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*. *J Appl Microbiol* 2001; 90: 16-24.
- 31) Gun M, Rennie J R. P, Thornley J., Richardson H H R, Hodge D, Lynch J. Laboratory and clinical evaluation of media for *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol*. 1987; 25: 2274-2277.
- 32) Hutchinson DN, Bolton FJ. Improved blood free selective medium for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faecal specimens *J. Clin. Pathol*. 1984; 37: 956-957.
- 33) Wang WL, Blaser M J. Detection of pathogenic *Campylobacter* species in blood culture systems. *J. Clin Microbiol*. 1986; 23(4): 709-714.
- 34) Cappelletti JM, Minet J. Magras C, Cowell R, Federighi RM. Recovery in embryonated eggs of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni* cells and maintenance of ability to adhere to hela cells after resuscitation. *Appl. Environ. Microbiol*. 1999; 65: 5154-5157.

- 35) Hebert G, Hollis D, Weaver R, Lambert M, Blaser M, Moss C. 30 years of Campylobacters: Biochemical characteristics and a biotyping proposal for *Campylobacter jejuni*. J. Clin. Microbiol. 1982; 15: 1061-1073.
- 36) www.mikrobiyoloji.org
- 37) Doyle MP, Roman DJ. Sensitivity of *Campylobacter jejuni* to drying. J. Food Protect. 1982; 45: 507-510.
- 38) Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G eds. Curved Gram negative bacilli and oxidase positive fermenters: Campylobacteraceae and Vibrionaceae. In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6 th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 2006: 321-361.
- 39) Allos BM, Blaser MJ. *Campylobacter jejuni* and the expanding spectrum. of related infections. J Clin Infect Dis. 1995; 20: 1092-101.
- 40) Moore J E, Wilson, T S, Wareing D R A, Humphrey T J, Murphy PG. Prevalence of thermophilic *Campylobacter* spp. In ready-to eat foods and raw poultry in Northern Ireland. J. Food Protect. 2002; 65(8): 1326-1328.
- 41) Darka Ö, Yılmaz Y A. Tavuk eti ve Campylobacteriosis. Hacettepe Tıp Dergisi. 2004; 35: 100-102.
- 42) Preliminary Food Net data on the incidence of food-borne illness-selected sites, US, 2001. MMWR mortal Wkly Rep. 51; 325-329.
- 43) Wj Snelling, Matsuda M, Moore JE. Under the Microscope *Campylobacter jejuni*. J. Appl. Microbiol. 2005; 41: 297-302.
- 44) Poly F, Threadgill D, Stintzi A. Genomic Diversity in *Campylobacter jejuni*: Identification of *C.jejuni* 81-176 Specific Genes. J Clin Microbiol. 2005; 43(5): 2330-2338.
- 45) Skirrow, MB. Epidemiology *Campylobacter* enteritis. Int. J. Food. Microbiol. 1991; 12: 9-16.
- 46) Altekruze, S.F, Stern, N.J, Fields, P.I, Swerdlow, D.L. *Campylobacter jejuni*- an emerging foodborne pathogen. Emerg. Infect. Dis, 1999; 5(1): 28-35.
- 47) Mansfield, L.S, Abner, S.R. Molecular mechanisms governing *Campylobacter* pathogenicity. In: Microbiol Foodborne Diseases (Eds). Jeffrey, W.C, Lins, J. E, Bhatnagar, D. Pennsylvania: Technomic Publishing company, Inc. Pp. 2000; 191-243.
- 48) Allos B m. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. Clin. Infect. Dis. 2001; 32: 1201-1206.
- 49) Blaser M J. Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. J Infect Dis 1997; 176: 103-105.
- 50) Blakelock RT, Beasley SW. Infection and the gut. Semin. Pediatr. Surg. 2003; 12:265-274.
- 51) Kendell EJ, Tanner EI. *Campylobacter* enteritis in general practice. J Hyg 1982; 88: 155-63.

- 52) Moore, J. E, Corcoran, D, Dooley, S.G, Fanning S, Lucey B, Matsuda, M, McDowell, D.A, Megraud, F, Millar, B.C, O' Mahony, R, O' Riordan, L, O' Rourke, M, Rao, J.R, Rooney, P.J, Sails, A, Whyte, P. *Campylobacter*. Vet. Res. 2005; 36(3): 351-382.
- 53) Smibert, R.M. Genus *Campylobacter*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (Eds). Krieg, N.R, Holt, J.G, Williams and Wilkins, Baltimore, London. 1984; pp: 111-118.
- 54) Newell, D.G, Feornley, C. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 63(8): 4343-4351.
- 55) Nachamkin, I. *Campylobacter jejuni*. In: *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*, 3rd Ed. (Eds). Doyle, M.P, Beuchat, L.R, ASM Press, Washington D.C 2007; pp: 237-248.
- 56) Nachamkin I, Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA. *Campylobacter and Arcobacter*. *Manual of Clinical Microbiology* 3.th ed, 1999: 716-722
- 57) *Campylobacter izolasyonu ve identifikasyonu Standart işlem prosedürü*, Refik, Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarı.
- 58) Steele T, McDermott S. N. The use of membrane filters applied directly to the surface of agar plates for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faeces. *Pathology*. 1984; 16: 263-265.
- 59) Piersimioni C, Bornigi A S, Curzi L, De Sio G. Comparison of two selective media and a membrane filter technique for isolation of *Campylobacter* species from diarrhoeal stools. *Eur. J Clin. Microbiol and Infect Dis.* 1995; 14: 539-542.
- 60) Enberg J, Gerner-Smidt P, On S.L.W, Harrington CS. Efficient isolation of *Ampylobacter* from stools *J. Clin. Microbiol*, 2000; 38 (7): 2798-2799
- 61) Cheryl A et al. Teimethorprim Activity in media Selective for *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol* 1982; 11: 808-812.
- 62) Aspinall ST, Wareing D R, Hayward PG, Hutchinson D N. Selective medium for thermophilic campylobacters including *Campylobacter upsaliensis*. *J Clin Pathol.* 1993; 46(9): 829-831.
- 63) Morris G K. Comparison of four hippurate hydrolysis methods for identification of thermophilic *Campylobacter* spp. *J. Clin. Microbiol* 1985; 22: 714-718
- 64) Hindiyeh M, Jense S. Rapid Detection of *Campylobacter jejuni* in Stool Specimens by an Enzyme Immunoassay and Surveillance for *Campylobacter upsaliensis* in the Greater Salt Lake City Area. *J. Clin Microbol.* 2000; 8: 3076-3079
- 65) Tolcin R, Lasalvia MM, Kirkley BA, Vetter EA, et al. Evaluation of the Alexon-Trend ProSpecT *Campylobacter* Microplate Assay *J. Clin. Microbol.* 2000; 10: 3853-3855
- 66) Hodinka RL, Gilligan PH Evaluation of the Campyslide agglutination test for confirmatory identification of selected *Campylobacter* species. *J Clin Microbiol.* 1988; 26: 47-49
- 67) Nachamkin I, Barbagallo S. Culture confirmation of *Campylobacter* spp. by latex agglutination. *J Clin Microbiol.* 1990; 28: 817-818

- 68) Wang G, Clifford G. Colony Multiplex PCR Assay for Identification and Differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C.coli*, *C.lari*, *C. upsaliensis* and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 12: 4744–4747
- 69) Fermér C, Engvall EO. Specific PCR Identification and Differentiation of the Thermophilic *Campylobacters*, *Campylobacter jejuni*, *C.coli*, *C.lari*, and *C.upsaliensis* *J. Clin. Microbol.* 1999; 37(10): 3370-3373
- 70) Kärenlampi RI, Tolvanen TP, Hänninen M L. Phylogenetic Analysis and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Identification of *Campylobacter* Species Based on Partial *groEL* Gene Sequences, *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 5731-5738.
- 71) Lawson AJ, Shafi M S, Pathak K, Stanley J. Detection of *campylobacter* in gastroenteritis: comparison of direct PCR assay of faecal samples with selective culture *Epidemiol. Infect.* 1998; 121, 547-553.
- 72) Kulkarni SP, Lever S, Logan J M J, Lawson A J, Stanley J, Shafi M S. Detection of *Campylobacter* species: a comparison of culture and polymerase chain reaction based methods *J Clin. Pathol.* 2002; 55: 749-753
- 73) Hounng HS, Sethabutr O, Nirdnoy W, Katz DE, Pang LW. Development of a *ceuE*-based multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for direct detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Thailand. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2001; 40(1-2): 11-9
- 74) Eastwood K, Schuster H, Gascoyne-Binzi D. Comparison of real-time PCR and direct culture for the detection of *Campylobacter* spp. from human faecal samplesç European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ICC, Munich, Germany, 2007: Abstract number: 17339
- 75) On SLW, Jordan PJ. Evaluation of 11 PCR Assays for Species-Level Identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Clin. Microbol.* 2003; 41(1): 330-336
- 76) Hill JE, Paccagnella A, Law K, Melito PL. Identification of *Campylobacter* spp. and discrimination from *Helicobacter* and *Arcobacter* spp. by direct sequencing of PCR-amplified *cpn60* sequences and comparison to *cpnDB*, a chaperonin reference sequence database. *J Med. Microbiol.* 2006; 55: 393–399
- 77) Marshall SM, Melito PL, Woodward DL, Johnson WM, Rodgers FG, Mulvey MR. Rapid identification of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter* isolates by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 4158-60.
- 78) Eysers M, Chapelle S, Van Camp G, Goossens H, De Wachter R. Discrimination among thermophilic *Campylobacter* species by polymerase chain reaction amplification of 23S rRNA gene fragments. *J Clin Microbiol.* 1993; 31(12): 3340–3343
- 79) Fermer CH, Engvall EO. Specific PCR identification and differentiation of the thermophilic *campylobacters*, *Campylobacter jejuni*, *C.coli*, *C.lari* and *C.upsaliensis*. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37: 3370–3373
- 80) Rönner AC, Engvall EO, Andersson L, Kaijser B. Species identification by genotyping and determination of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from humans and chickens in Sweden. *Int J Food Microbiol.* 2004; 96: 173-9.

- 81) Denis MC, Soumet K, Rivoal G, et al. Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *J. Appl Microbiol.* 1999; 29: 406–410
- 82) Al Amri A, Senok AC, Ismaeel AY, Al-Mahmeed A E, Botta G A. Multiplex PCR for direct identification, of *Campylobacter* spp. in human and chicken stools. *J Med Microbiol.* 2007; 56: 1350-1355
- 83) Nayak R, Stewart TM, Nawaz MS. PCR identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by partial sequencing of virulence genes *Molecular and Cellular Probes*, 2005; 19(3): 187-193
- 84) Klena J D, Parker C T, Konkel M E et al. Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* by a multiplex PCR developed from the nucleotide sequence of the lipid A gene *lpxA*. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(12): 5549-5557
- 85) Burnett TA, Hornitzky M A, Kuhnert P, Djordjevic S P. Speciating *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from poultry and humans using six PCR-based assays. *FEMS Microbiology Letters* 2002; 216: 201–209.
- 86) Persson S, Olsen KEP. Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples *Med Microbiol.* 2005; 54: 1043-1047
- 87) Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 1990; 28(3): 495–503.
- 88) Schmidt OR, Brass F. Improved serodiagnosis of *Campylobacter jejuni* infections using recombinant antigens. *J Med Microbiol.* 2005; 54: 761–767
- 89) Tenkate T D, Stafford RJ. Risk factors for campylobacter infection in infants and young children a matched case-control study *Epidemiol. Infect.* 2001; 127: 399-404
- 90) Tabak F. Erişkinlerde görülen akut gastroenteritlerin epidemiyolojisi. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Yaz ishalleri -Besin Zehirlenmeleri Sempozyumu, İstanbul, 1998: 73-88.
- 91) Evans J.S, et al. ntroduction and spread of termofilik *Campylobacters* important in veterinary medicine. *Vet.Record.* 1992; 131: 574-576.
- 92) Beery JT, Hugdahl MB, Doyle MP. Colonization of gastrointestinal tracts of chicks by *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol.* 1988; 54(10): 2365-70
- 93) Newell DG, Fearnley C. Sources of *Campylobacter* Colonization in Broiler Chickens. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69: 4343-4351.
- 94) Pearson A, Greenwood M, Feltham R, Healing T, Donaldson J, Jones D, Colwell R. Microbial ecology of *Campylobacter jejuni* in a United Kingdom chicken supply chain: intermittent common source, vertical transmission, and amplification by flock propagation. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62(12): 4614.
- 95) Levin RE. *Campylobacter jejuni*: A Review of its Characteristics, Pathogenicity, Ecology, Distribution, Subspecies Characterization and Molecular Methods of Detection. *Food Biotechnology*, 2007; 21: 271–347.

- 96) Penner JL, Hennessy JN. Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens. *J Clin Microbiol.* 1980; 12: 732-737
- 97) Frost JA, Oza AN, Thwaites R T, Rowe B. Serotyping Scheme for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Based on Direct Agglutination of Heat-Stable Antigens. *J Clin Microbiol.* 1998; 335-339
- 98) Lior H, Woodward DL, Edgar J A, Laroche LJ, Gill P. Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. *J Clin Microbiol.* 1982; 15: 761-768.
- 99) Wassenaar T, Newell D. Genotyping of *Campylobacter* spp. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66: 1-9
- 100) Grajewski B A, Kusek J W, Gelfand H M. Development of a bacteriophage typing system for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* *J Clin Microbiol.* 1985; 22(1): 13-18
- 101) Salama S, Bolton FJ, Hutchinson DN. Evaluation of methods for the enumeration of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* bacteriophages. *Letters in Appl Microbiol.* 1990; 10: 193
- 102) Khakhria R, Lior H. Extended phage-typing scheme for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Epidemiol Infect.* 1992; 108: 403-414
- 103) Wittwer M, Keller J, Wassenaar TM. Genetic Diversity and Antibiotic Resistance Patterns in a *Campylobacter* Population Isolated from Poultry Farms in Switzerland. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 1: 2840-2847
- 104) Sung Sik Jang HK et al. Prevalence, genetic diversity, and antibiotic resistance patterns of *Campylobacter jejuni* from retail raw chickens in Korea. *Int J food Microbiol.* 2007; 114: 50-59
- 105) On SLW, Nielsen EM, Engberg J, Madsen M. Validity of *Sma*I-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *Sal*I, *Kpn*I, and *Bam*HI polymorphisms: evidence of identical clones infecting humans poultry, and cattle. *S. Epidemiol. Infect.* 1998; 120: 231-237
- 106) Dingle KE, Colles FM, Wareing DRA, Ure R, Fox AJ, Bolton FE et al. Multilocus Sequence Typing System for *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol* 2001; 39: 14-23.
- 107) Lindstedt BA, Heir E, Vardund T, Melby KK, Kapperud G. Comparative Fingerprinting Analysis of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* Strains by Amplified-Fragment Length Polymorphism Genotyping. *J Clin. Microbiol* 2000; 38: 3379-3387.
- 108) Ono K, Kurazono T, Niwa H, Itoh K. Comparison of Three Methods for Epidemiological Typing of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Current Microbiology.* 2003; 47: 364-371
- 109) Ertaş HB, Çetinkaya B, Muz A, Öngör H. Tavuk Orijinli *Campylobacter coli* ve *Campylobacter jejuni*'nin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) İle İdentifikasyonu. *Türk J Vet Anim Sci,* 2002; 26: 1447-1452.
- 110) Tam CC, O'Brien SJ, Adak GK, Meakins SM, Frost JA: *Campylobacter coli* - An important foodborne pathogen. *J Infect,* 47, 28-32, 2003.

- 111) Pokumunski, S, N. Kass, E. Borochoovich, B. Morantz ve M. Rogol. 1986. Incidence of *Campylobacter* spp. in Broiler Flocks Monitored from Hatching to Slaughter. *Avian Pathol*, 15, 83-92.
- 112) Klінде, H, C.A. Denigeorgis ve M. Papaioanou. 1983. Prevalence of *Campylobacter jejuni* in Chicken Wings. *Appl. Environ. Microbiol*, 45, 1116-1118.
- 113) Shanker, S, A. Lee ve T.C. Sorrell. 1986. *Campylobacter jejuni* in Broilers: the Role of Vertical Transmission. *J. Hyg*, 96, 153-159.
- 114) Flynn, O.M.J, I.S. Blair ve D.A. McDovvey. 1994. Prevalence of *Campylobacter* Species on Fresh Retail Chicken VVings in Northern Ireland. *J. Food Protec*, 57 (4): 334-336.
- 115) Willis, W.L. ve C. Murray. 1997. *Campylobacter jejuni* Seasonal Recovery Observations of Retail Market Broilers. *Poultry Sci*, 76 (2): 314-317.
- 116) ATtanassova, V. ve C. Ring. 1999. Prevalence of *Campylobacterspp.* in Poultry and Poultry Meat in Germany. *Int. Food Microbiol*, 51 (2-3): 187-190.
- 117) Uyttendaele, M, P. De Troy ve J. Debevere. 1999. Incidence of *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Listeria monocytogenes* in Poultry Carcasses and Different Types of Poultry Products for Sale on the Belgian Retail Market. *J. Food Protec*. 62 (7): 735-740.
- 118) Yıldız, A. ve S.K. Diker. 1992. *Campylobacter* Contamination in Chicken Carcasses, *Turkish J. Vet. Ani. Sci*, 16, 433-439.
- 119) Koç, F. 1992. Normal ve Hepatitli Tavuklardan *Campylobacter* İzolasyonu Üzerine Çalışmalar. *Etlik Vet. Mikrobiol. Derg*, 7 (2): 29-48.
- 120) Lior, H. 1984. New Extended Biotyping Scheme for *Campylobacter coli* ve *Campylobacter laridis*. *J. Clin. Microbiol*, 20, 636-640.
- 121) Skirrow, M.B. ve J. Benjamin. The Classification of "Thermophilic" *Campylobacter*'s and Their Distribution in Man and Domestic Animals in *Campylobacter*. I. Ed. Nevvell, MTP Press Limited, Lancaster.D, 1982: 40-44,
- 122) Yıldırım, G. 1995. İstanbul ve Yöresinde Satışa Sunulan Hazır Tavuk Etleri ve Ürünlerinde *Campylobacter jejuni* Saptanması Üzerine İzolasyon ve İdentifikasyon Çalışmaları. İstanbul Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı. Doktora Tezi.
- 123) Ergün, A, H. Erturun, A. Yiğit, N. Akalın ve F. Mutlu. 1997. Ege Bölgesi Kanatlı Mezbahalarının Bazı Patojen Bakteriler Yönünden Kontrolü. *Bornova Vet. Kontr. ve Araşt. Enst. Md. Derg*. 22 / 36, 31-54.
- 124) Özer, D. ve Ö. Ergün. 1999. İstanbul Piyasasında Satışa Sunulan Çeşitli Kanatlı Eti ve Ürünlerinde *Campylobacter jejuni*'nin Varlığı Üzerine Araştırmalar. İstanbul Üniv. Vet. Fak. Dergi, 25 (1): 81-88.
- 125) Ertaş HB, Çetinkaya B, Muz A, Öngör H. Genotyping of broiler-originated *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates using fla typing and random Amplified polymorphic DNA methods. *International Journal of Food Microbiology*. 94 (2004) 203-209
- 126) Anders, BJ, Lauer BA, Paisley. J.W. 1981. *Campylobacter* Gastroenteritis in Neonates. *Am. J. Dis. Child*, 135, 900-902.

- 127) Blankenship LC, Craven SE, Chiu JY, Krumm GW. Sampling Methods and Frozen Storage of Samples for Detection of *Campylobacter jejuni* on Freshly Processed Broiler Carcasses. J. Food Protec, 1983; 46 (6): 510-513.
- 128) Steinhauserova I, et al. Identification of thermophilic *Campylobacter* spp. by phenotypic and molecular methods. J Appl. Microbiol. 2001; 90: 470-475
- 129) Wassenaar T, Newell D. Genotyping of *Campylobacter* spp. Appl Environ Microbiol. 2000; 66: 1-9
- 130) Kärenlampi RI, Tolvanen TP, Hänninen M L. Phylogenetic Analysis and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Identification of *Campylobacter* Species Based on Partial *groEL* Gene Sequences, J Clin Microbiol. 2004; 42: 5731-5738.
- 131) Polat E. Akut İshallerde *Campylobacter jejuni* ve Diğer Etiyolojik Ajanların Hızlı Tanısında Moleküler Yöntemlerin Değeri. Çukurova üniversitesi tıp fakültesi mikrobiyoloji anabilim dalı. Uzmanlık tezi. Adana 2008.

8. ÖZGEÇMİŞ

30.06.1981’de Malatya’da doğdum. İlk orta ve lise eğitimimi Malatyada tamamladım. 2000-2005 yıllarında Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesinde lisans eğitimimi aldım. 2011 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisansa başladım ve halen eğitimime devam etmekteyim.