

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MERSİN İLİNDE ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT
GASTROENTERİTLERİNDE *CAMPYLOBACTER*
TÜRLERİNİN GÖRÜLME SIKLIĞI**

Dr. Çilem YILDIZ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Gönül ASLAN

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
BAP-SBE TM (ÇY) 2008-9 DR nolu proje olarak desteklenmiştir.

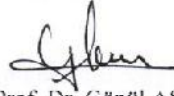
Tez No: 17

MERSİN – 2011

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

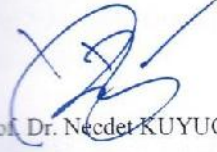
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi Programı çerçevesinde değerlendirilmiş olan “Mersin İlinde Çocukluk Çağı Akut Gastroenteritlerinde *Campylobacter* Türlerinin Görülme Sıklığı” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 15.12.2011

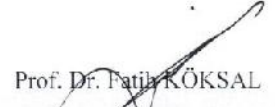


Prof. Dr. Gönlül ASLAN

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı/ Danışman



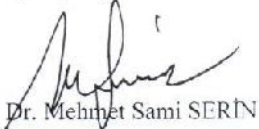
Prof. Dr. Necdet KUYUCU
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Pediatri Anabilim Dalı



Prof. Dr. Fatih RÖKSAL
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı



Doç. Dr. Nuran DELIALIOĞLU
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı



Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 03.03.2011 tarih ve 114...sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Ülke ÇOMELEKOĞLU

TEŞEKKÜR

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda eğitim sürem boyunca desteklerini gördüğüm, her konuda çok yakın ilgi ve desteklerini esirgemeyen başta Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ ve danışman hocam Sayın Prof. Dr. Gönül ASLAN olmak üzere emeği geçen tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi'ndeki öğrencilik hayatımdan yüksek lisans ve doktora eğitimime kadar olan süre içinde her konuda desteğini gördüğüm, tez çalışmalarım sırasında engin tecrübelerini ve görüşlerini benimle paylaşan, laboratuvar olanaklarından yararlanmamı sağlayan çok değerli hocam Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Fatih KÖKSAL'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca laboratuvar ortamında sonsuz desteklerini gördüğüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda görev yapan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Uzun ve zorlu eğitim sürem boyunca desteklerini hiç esirgemeyen anne ve babama, ablam Prof. Dr. Çiğdem ARIKAN'a, kardeşlerim Doç. Dr. Murat AKYILDIZ'a, Diş Hek. Dr. Selçuk AKYILDIZ'a, Yüksek İnş. Müh. Sercan AKYILDIZ'a ve tıp fakültesinde öğrenciliğimden itibaren hep yanımda olan hayatımın her aşamasında olduğu gibi tez dönemim boyunca büyük bir sabırla beni destekleyen sevgili eşim Prof. Dr. Altan YILDIZ'a ve biricik kızlarım Yeşim ve Selin'e teşekkürü borç bilirim.

Dr. Çilem YILDIZ

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	4
2.1. Tanım ve Tarihçe	4
2.2. Sınıflandırmaya ve Taksonomi	5
2.3. Mikrobiyolojik Özellikler	7
2.3.1. Morfolojik Özellikleri	7
2.3.2. Biyokimyasal Özellikleri	8
2.3.3. Hücre Duvarı ve Antijenik Özellikleri	10
2.3.4. Genomik Özellikleri	11
2.3.5. Kültür Özellikleri	11
2.3.6. <i>Campylobacter</i> 'lerin Gelişimini Etkileyen Faktörler	13
2.4. Patogenez ve Virülans	13
2.5. Antibiyotik Duyarlılığı	19
2.6. <i>Campylobacter</i> İnfeksiyonları	19
2.6.1. <i>Campylobacter</i> İnfeksiyonlarının Lokal ve Sistemik Komplikasyonları	20
2.7. Bulaşma ve Taşınma Yolları	23
2.8. Bağışıklık	24
2.9. Laboratuvar Tanısı	26

2.9.1.1. Örneklerin Toplanması, Taşınması ve Saklanması	26
2.9.1.2. Direk İnceleme	27
2.9.1.3. İzolasyon	27
2.9.1.3.1. İzolasyonda Kullanılan Besiyerleri	28
2.9.1.3.2. Besiyerlerine Ekim ve İnkübasyon	31
2.9.1.3.3. <i>Campylobacter</i> 'lerin İdentifikasyonu	31
2.9.1.3.4. Dışkıda Antijen Arayan Testler	32
2.9.1.3.5. Moleküler Yöntemler	32
2.9.1.3.6. Serolojik Yöntemler	35
2.10. Epidemiyoloji	35
2.11. Korunma	37
3. GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	39
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	39
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	40
3.1.3. Kullanılan Standart Suş	41
3.2. Besiyerleri, Ayıraçlar ve Katkı Maddelerinin Hazırlanması	41
3.2.1. Mikroaerofilik ortam	41
3.2.2. Besiyerleri	42
3.2.2.1. Taşıma Besiyerleri	42
3.2.2.1.1. Modifiye Carry-Blair Besiyeri	42
3.2.2.1.2. Üretim Besiyerleri	43
3.2.2.1.2.1. Modifiye <i>Campylobacter</i> Blood-Free Selective Agar: Modified Charcoal Cefoperazon Deoxycholate Agar (mCCDA)	43
3.2.2.1.2.2. Sefaperazon, Amfoterisin B, Teikoplanin (CAT) Suplementli mCCDA Besiyeri	43
3.3. Ayıraçların Hazırlanması	44
3.3.1. Sodyum Hippurat Solüsyonu	44
3.3.2. Ninhidrin Ayıracı	44
3.3.3. Oksidaz Ayıracı	44

3.3.4.	Katalaz Ayıracı	45
3.3.5.	Triple Sugar Iron Agar	45
3.4.	Yöntem	45
3.4.1.	Çalışma Grubunu Oluşturan Örnekler	45
3.4.2.	Örneklerin Toplanması	46
3.4.3.	Dışkının Makroskopik İncelemesi	46
3.4.4.	Dışkının Direkt Mikroskopisi	46
3.5.	Kültür	47
3.5.1.	Dışkı Örneklerinin Seçici Besiyerlerine Ekimi ve İnkübasyonu	47
3.5.2.	Ekimlerin Değerlendirilmesi	47
3.5.2.1.	<i>Campylobacter</i> Suşlarının İdentifikasyonu	47
3.5.2.2.	Oksidaz Testi	48
3.5.2.3.	Katalaz Testi	48
3.5.2.4.	Hippurat Hidroliz Testi	49
3.5.2.5.	Sefalotin Duyarlılık Testi	49
3.5.2.6.	Nalidiksik Asit Duyarlılık Testi	50
3.5.2.7.	Triple Sugar İron Agarda H ₂ S Oluşumunun Değerlendirilmesi	50
3.5.2.8.	<i>Campylobacter</i> Tür Ayırımı	50
3.5.2.9.	<i>Salmonella</i> ve <i>Shigella</i> Türlerinin İdentifikasyonu	51
3.6.	Moleküler Uygulamalar	53
3.6.1.	DNA Ekstraksiyonu	53
3.6.1.1.	Dışkı örneklerinden DNA Ekstraksiyonu	53
3.6.1.2.	Kültürde İzole edilen suşlardan DNA Ekstraksiyonu	54
3.6.2.	Termofilik Bölgenin Amplifikasyonu	55
3.6.3.	Agaroz Jel Elektroforezinin Uygulaması	56
3.6.4.	RFLP Uygulamaları	57
3.6.4.1.	<i>AluI</i> Restriksiyon Endonüklea Enzimi ile Amplikonların Kesimi	57
3.6.4.2.	<i>Tsp 509I</i> Restriksiyon Endonükleazı İle Amplikonların Kesimi	58
3.6.5.	RFLP Sonuçlarının Yorumlanması	58

3.7. İstatiksel Yöntem	59
4. BULGULAR	60
4.1. Çalışma Grubunun Demografik Özellikleri	60
4.2. Dışkı Örneklerinin Makroskopik ve Mikroskopik Bulguları	61
4.3. Kültür Sonuçları	61
4.4. PZR Sonuçları	67
4.4.1. RFLP Sonuçları	69
5. TARTIŞMA	71
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	79
7. KAYNAKLAR	81
8. EKLER	
8.1. Ek 1	94
ÖZGEÇMİŞ	95

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Modifiye <i>Campylobacter</i> Blood-Free Selective Agar besiyerinde üretilen <i>Campylobacter</i> kolonilerinin görünümü	63
Şekil 4.2. Hippurat Hidroliz Testinin değerlendirilmesi	64
Şekil 4.3. PZR amplifikasyon ürünlerinin %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü	68
Şekil 4.4. PZR-RFLP yöntemi ile elde edilen kesim ürünlerinin agaroz jeldeki görünümü	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. rRNA superfamily IV'e göre <i>Campylobacteraceae</i> sınıflandırması	6
Çizelge 2.2. <i>Campylobacter</i> türlerinin önemli biyokimyasal özellikleri	9
Çizelge 2.3. <i>Campylobacter</i> türlerinin meydana getirdikleri infeksiyonların özellikleri	22
Çizelge 2.4. <i>Campylobacter</i> 'lerin izolasyonunda kullanılan besiyerleri	29
Çizelge 3.1. TSI ve LIA besiyerlerinde <i>Salmonella</i> türü bakterilerin üreme özellikleri	52
Çizelge 3.2. TSI ve LIA besiyerlerinde <i>Shigella</i> türü bakterilerin üreme özellikleri	52
Çizelge 3.3. <i>Campylobacter</i> gen bölgesinin PZR reaksiyon karışımı	55
Çizelge 3.4. <i>Campylobacter</i> türlerinin gen bölgesinin amplifikasyonunda kullanılan PZR koşulları	56
Çizelge 3.5. <i>Engwall</i> ve <i>Fermer</i> tarafından belirlenen, PZR-RFLP fragment polimorfizmine göre <i>Campylobacter</i> tiplendirilme kriterleri	59
Çizelge 4.1. Dışkı örneklerinin cinsiyete göre dağılımı	60
Çizelge 4.2. Dışkı örneklerinin yaş gruplarına göre dağılımı	61
Çizelge 4.3. <i>Campylobacter</i> izole edilen olguların yaş gruplarına göre dağılımı	62
Çizelge 4.4. <i>Campylobacter</i> izole edilen olguların aylara göre dağılımı	62
Çizelge 4.5. Seçici besiyerlerinden izole edilen <i>Campylobacter</i> izolatlarının fenotipik özellikleri	65
Çizelge 4.6. <i>Campylobacter</i> izole edilen olguların türlere göre dağılımı özellikleri	65
Çizelge 4.7. <i>C. jejuni</i> izole edilen 22 olgunun yaş gruplarına göre dağılımı	66
Çizelge 4.8. <i>C. jejuni</i> izole edilen hastalarda başvuru semptomları	67
Çizelge 4.9. PZR ile 491 bp. Uzunluğunda bant tespit edilen örneklerin ekstraktın özelliğine göre dağılım	68

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADT	Antibiyotik Duyarlılık Testleri
AFLP	Amplified fragment length polymorphism analysis
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
CadF	<i>Campylobacter</i> adhesion to fibronectin
CAT	Sefaperazon, Amfoterisin B Teicoplanin
CCDA	Charcoal Cefoperazone Desoxycholate Agar
CDC	Centers for Disease Control
CDT	Cytolethal Distending Toksin
Cfu	Colony forming unit
Cia	<i>Campylobacter</i> invasion antigen
CLDT	Cytolethal distending toksin
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	deoksiribonükleotid Trifosfat
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
Et-Br	Etidyum Bromid
EagEC	Enteroggregative <i>E.coli</i>
EHEC	Enterohaemorrhagic <i>E. coli</i>
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
FALP	Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism
FDA	Food and Drug Administration
GBS	Guillain-Barre Sendromu
IL-1β	Interleukin-1 β
KB	Kompleman birleşme reaksiyonu
LOS	Lipooligosakkarit
LPS	Lipopolisakkarid
mCCDA	Modified Charcoal Cefoperazon Deoxycholate agar

MEE	Multilocus Enzyme Electrophoresis
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MLTS	Multilocus Sequence Typing
NAA	Nükleik Asit Amplifikasyon
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEB1	Periplasmic binding protein
PFGE	Pulsed-field jel elektroforez
RAPD-PCR	Random amplification of polymorphic DNA-PCR
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RSKK	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
SSA	Skirrow Selektif Agar
TNSA	Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırması
TSI	Triple Sugar Iron agar
VBNC	Viable but non-culturable

ÖZET

Mersin İlinde Çocukluk Çağı Akut Gastroenteritlerinde *Campylobacter* Türlerinin Görülme Sıklığı

Akut gastroenteritler bütün dünyada çocuklar için önde gelen morbidite ve mortalite nedenleridir. *Campylobacter* türleri çocukluk çağı gastroenteritlerinin önde gelen nedenleri arasında yer almaktadır. *Campylobacter*'lerin kültürleri özel koşullar gerektirdiği ve maliyeti yüksek olduğu için ülkemizde rutin olarak yapılamamakta ve görülme sıklığı tam olarak bilinmemektedir. Çalışmamızda 0-14 yaş grubu çocukluk çağı gastroenteritlerinde, *Campylobacter* türlerinin sıklığının tespit edilmesi ve *Campylobacter* türlerinin klasik ve moleküler yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır. Akut gastroenterit yakınması ile başvuran 0-14 yaş grubunda 537 hastanın dışkı örneği termofilik *Campylobacter* türleri yönünden konvansiyonel kültür yöntemleri ve PZR-RFLP yöntemi ile incelendi. Selektif besiyerleri kullanılarak yapılan kültür yöntemleri ile 24 (%4,46) hastada *Campylobacter* izole edilirken, direk dışkıdan PZR-RFLP yöntemi ile 22 (%4,09) hastada *Campylobacter* izole edildi. Klasik ve moleküler yöntemle 24 suştan 22'si *C. jejuni* 2'si *C. coli* olarak tiplendirildi. İzolatlarımızın %50'si 0-2 yaş grubunda olup 0-2 yaş grubunda *Campylobacter* izolasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0,05$) saptanmıştır. *Campylobacter* türlerinin izolasyonunun yaz aylarında arttığı en sık izolasyonun Temmuz ayında olduğu belirlenmiştir. Bölgemizde çocukluk çağı gastroenteritlerinde *Campylobacter* türleri rutin dışkı kültürlerinde araştırdığımız diğer enterik bakteriyel patojenlerden daha sık görülmektedir (%4,46). Bu nedenle de rutin dışkı kültürlerine *Campylobacter* türlerinin izolasyonuna yönelik seçici besiyerlerinin eklenmesinin ve bunun yanı sıra moleküler laboratuvar imkanlarına sahip ünitelerde moleküler yöntemlerin de tanı amacı ile kullanılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Campylobacter*, izolasyon, identifikasyon, PZR-RFLP

ABSTRACT

The Frequency of *Campylobacter* Species in Childhood Acute Gastroenteritis in Mersin City

Acute gastroenteritis is most common cause of morbidity and mortality worldwide. *Campylobacter* species are special causes of childhood gastroenteritis. *Campylobacter* culture needs special conditions and cost of the culture is expensive so *Campylobacter* culture does not apply routinely therefore its frequency is unknown in our country. The aim of this study is to detect frequency of *Campylobacter* species in 0-14 age childhood gastroenteritis and to identify *Campylobacter* species by classical and molecular methods. In this study, a total of 537 faecal samples obtained from between 0-14 age groups which suffering acute gastroenteritis over a thirteen-month period were investigated by culture and PCR-RFLP for *Campylobacter* species. While *Campylobacter* was isolated 24 (4,46%) of patients by using selective culture methods, *Campylobacter* was isolated 22 (4,09%) of patients from direct stool samples by PCR-RFLP. The 22 of 24 strains were identified as *C. jejuni* and two of 24 strains were identified as *C. coli* by classical and molecular methods. The 50% of isolates are in 0-2 age group and there is significant difference in this age group ($p<0,05$). It was determined that isolation of *Campylobacter* species are increasing in summer period especially in July. *Campylobacter* species were more seen than other bacterial pathogens in childhood gastroenteritis in our region (4-46%). Therefore it was supposed that adding selective mediums for isolation of *Campylobacter* species to routin stool cultures and using molecular techniques as a diagnostic tool would be useful in unites having molecular laboratories.

Key words: *Campylobacter* spp., isolation, identification, PCR-RFLP

1. GİRİŞ

Akut gastroenteritler bütün dünyada sağlık kurumlarına başvurunun en sık nedenlerindedir. Dünya genelinde yılda yaklaşık 2-3 milyar olgunun gastroenterite yakalandığı, beş yaş altındaki çocukların yılda ortalama 3,2 kez gastroenterit oldukları bildirilmiştir. Avrupa’da ise üç yaş altındaki çocuklarda gastroenterit insidansı yılda çocuk başına 0,5 ile 1,9 arasında değişmektedir. Gastroenteritler gelişmekte olan ülkelerde çocukluk çağı ölüm nedenleri arasında ön sırada yer almakta, her yıl beş yaş altındaki her 1000 çocuktan 4,9’u gastroenterit nedeniyle hayatını kaybetmektedir (1).

Ülkemizde son yıllarda sağlık alanında iyileşmeler sağlanmış olmakla birlikte Sağlık Bakanlığı istatistiklerine göre Türkiye genelinde 2005 yılının ilk altı ayında 509297 ishal olgusuna karşılık ishale bağlı yedi ölüm vakası bildirimi yapılmıştır (2).

İshal etkenlerinin tanısında ülkemizdeki laboratuvarların yeterince ve doğru kullanılmaması nedeniyle bu hastalıkların çoğu bildirilemediğinden ya da bildirim standart tanımlara göre yapılmaması nedeni ile problemin gerçek boyutları bilinmemektedir. Kişisel çabalarla yürütülen çalışmalar bir fikir verse de ülke çapında ve özellikle salgınlara ait yeterli veriye ulaşmak mümkün olmamaktadır. İshal etkenlerine ait yeterli verinin olmaması halk sağlığı açısından bu infeksiyonların öneminin ortaya konmasını ve etkin tedbirlerin alınmasını güçleştirmektedir (3).

Ülkemizde Öztürk ve ark. (4) tarafından 1994, Özbal ve ark. (5) tarafından 1990, Tanyüksel ve ark. (6) tarafından 1992 yılında ishalleri hastalarda yapılan çeşitli çalışmalarda %5,7-30,6 oranında etken izole edilebilmiştir. İzole edilen etkenler incelendiğinde en sık saptanan bakteriyel etkenler sırası ile *Campylobacter spp.*, *Esheria coli (E. coli)*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Aeromonas spp.* ve *Vibrio cholerae* olarak tespit edilmiştir (2).

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde infeksiyöz gastroenteritlerin başta gelen nedenlerinden biri olan *Campylobacter* türleri zoonotik etken olarak evcil hayvanlar ile kümes hayvanlarının bağırsak florasında bulunmaktadır (7). Termofilik *Campylobacter* türleri son yıllarda, tüm dünyada insanlarda meydana gelen gıda kaynaklı infeksiyonların en önemli etkenleri arasında bulunduğu bildirilmektedir. Bu nedenle etkenler “Emerging Pathogen” olarak nitelendirilmektedirler (7).

Campylobacter'ler intestinal ve ekstraintestinal sistemde infeksiyonlar oluşturmakta gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde çocukluk çağı gastroenteritlerinin en önemli nedenleri arasında yer almaktadır (7).

Campylobacter spp. ile olan infeksiyonlarda beş yaşından küçük olmak, erkek cinsiyet, çiğ ya da az pişmiş et, süt ve süt ürünlerinin tüketimi, kontamine suların içilmesi, evcil hayvanlar ve kümes hayvanları ile temas risk faktörleri olarak sorumlu tutulmaktadır (8, 9).

Campylobacter'lerin kapnofilik özellikleri ve dışkı florasında yer alan çok sayıdaki bakteri ile birlikte oluşları, bu bakterilerin uzun yıllar klasik kültür yöntemleri ile dışkı kültürlerinden izolasyonlarını engellemiştir. *Campylobacter* türlerinin gastroenterit etiyopatogenezinde önemli rol oynadığı ancak 1970'li yıllardan itibaren gösterilebilmiş ve selektif besiyerleri geliştirildikten sonra *Campylobacter*'lerle ilgili çalışmalar artmıştır (10).

Günümüzde hemen hemen tüm bakteriyoloji laboratuvarlarında dışkı örneklerinde *Salmonella* ve *Shigella* bakterileri araştırılmaktadır. Seçici kültür yöntemlerinin geliştirilmesiyle pek çok ülkede *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) çocukluk çağı gastroenteritlerinin en önemli etkenlerinden biri olarak tanımlanmıştır (11).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde ve diğer gelişmiş ülkelerde gastroenteritli olgularda *C. jejuni*'nin *Salmonella* ve *Shigella*'dan daha sık saptandığı bildirilmektedir (8).

Dünyada insidansı %1-35 oranında bildirilen *Campylobacter* infeksiyonlarının ülkemizde yapılan çalışmalarda görülme sıklığı %1,4-14,6 arasında değişmektedir. *Campylobacter* türlerinin neden olduğu gastroenteritlerin %90'ından *C. jejuni*, %5-10'undan da *C. coli* sorumlu bulunmuştur (8).

Campylobacter'ler hastanın yaşına ve suşun virulansına göre değişmek üzere özellikle beş yaşın altındaki çocuklarda periferik nöronlarda demiyelinizasyon ve güç kaybı ile seyreden klinik tablolara yol açmaktadır (12).

Yüksek mortalite ile seyreden çocukluk çağı gastroenteritlerinde; antibiyotik kullanımı için sınırlı endikasyonlar arasında yer alan *Campylobacter* infeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı, hasta kayıplarının en aza indirilmesi ve etkili bir tedavi planının oluşturulması açısından önemlidir (13).

Klinik örneklerde bakteriyel gastroenterit etkenlerinin belirlenmesi gelişmiş laboratuvar olanaklarına ihtiyaç duyduğundan ve pahalı olduğundan rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında gastroenteritli olgulardan ancak belirli bakteriler izole edilebilmekte buna karşın *Campylobacter*'ler rutin kültürde araştırılmamaktadır (13).

Ülkemizde de fekal-oral yolla bulaşan infeksiyon hastalıkları ve infeksiyöz gastroenteritler önemini korumaktadır. Çocukluk çağı gastroenteritlerinin önemli bir sağlık sorunu olduğu ülkemizde bu konuyla ilgili epidemiyolojik çalışmalara gereksinim vardır.

Çalışmamızda 0-14 yaş grubu çocukluk çağı gastroenteritlerinde, *Campylobacter* türlerinin sıklığının tespit edilmesi ve *Campylobacter* türlerinin türlerinin klasik ve moleküler yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Tanım ve Tarihçe

Kampilobakteriyozis yaygın bir zoonoz olup vahşi ve evcil hayvanlarda intestinal ve genital sistem infeksiyonlarına neden olmakla birlikte kommensal olarak da bulunabilmektedir (11).

Campylobacter türleri tüm dünyada insana ait en yaygın bakteriyel etkenler arasında yer almakta, intestinal ve ekstraintestinal infeksiyonlara yol açmaktadır (14).

Campylobacter'in tarihçesi 1886 yıllarına dayanmaktadır. Escherich 1886 yılında ishalleri bir çocuğun dışkı örneklerinden *Campylobacter* benzeri bakterileri spiral bakteri olarak tanımlamış ve *Cholerae infantum* olarak adlandırmıştır. 1909 yılında McFaydean ve Stockman koyun atık materyalindeki fetus dokularından *Vibrio* benzeri olarak adlandırdığı *Campylobacter* etkenini izole etmiştir (15, 16).

Smith ve Taylor 1919 yılında sığır atık materyalinden izole ettikleri spiral bakteri olarak tanımlanan etkeni *Vibrio fetus* ismini vermişlerdir (17).

Jones 1931 yılında ineklerde, Doyle 1944 yılında domuzlarda, *Vibrio jejuni*'u izole etmiştir. 1938 yılında ABD'nde huzurevinde yaşayanlarda *C. jejuni* ve *C. coli*'nin neden olduğu salgın, insanlarda görülen ilk *Campylobacter* infeksiyonu olmuştur. Büyüyen şehirlerdeki yüksek popülasyon yoğunluğu ve olumsuz sağlık koşulları hava kaynaklı bu patojenin yayılmasında gerekli ortamı sağlamıştır (18). 1947 yılında Vinzent ve arkadaşları nedeni bilinmeyen ateş etyolojisi ile hastaneye yatırılan ve ikisi ölen üç gebe kadının kanından *V. fetus*'ü izole etmişlerdir (19).

King adlı araştırmacı ise 1957 yılında gastroenteritli bir çocuğun kan örneklerinden izole ettiği *Vibrio*'ların diğerlerinden farklı olarak daha yüksek sıcaklıklarda ürediğini saptamış ve etkeni termofilik *Vibrio* olarak tanımlamıştır (20, 21).

Termofilik türler içinde en sık görülen tür olan *C. jejuni* Dekeyser ve arkadaşları tarafından ateşli ve gastroenteritli bir kadının önce kanında, sonra dışkıında membran filtrasyon tekniği kullanılarak izole edilmiştir (22).

1977 yılında Skirrow adlı araştırmacı *Campylobacter*'lerin dışkıdan membran filtrasyon yöntemi kullanmadan kolayca izolasyonunu sağlayan selektif kültür

yöntemini geliştirmiş ve bu gelişme ile birlikte klinik ve çevresel örneklerden çok sayıda yeni *Campylobacter* türleri izole edilmiştir (23).

2.2. Sınıflandırma ve Taksonomi

Sebald ve Veron isimli araştırmacılar *Campylobacter* taksonomisi ile ilgili olarak ilk çalışmayı 1963 yılında başlatmış, *Vibrio* türleri içinde değerlendirilen ve bugün *Campylobacter sputorum* olarak bilinen *C. bubulus* ve *C. fetus*'u *Campylobacter* cinsi içine dahil etmişlerdir. Araştırmacılar bu adlandırmayı, Hugh ve Lefson'un fermentatif metabolizma testleri ve DNA tabanlı dizilimi dikkate alarak gerçek *Vibrio* türlerinden ayırt etmek için kullanmışlardır (24).

Veron ve Chatelain adlı araştırmacılar 1973'te mikroaerofilik *Vibrio* benzeri mikroorganizmaların taksonomisi üzerine yaptıkları kapsamlı bir çalışmada *C. jejuni* ve *C. coli*'yi aynı grup içine dahil etmişlerdir (25).

Pasteur ve Dewhirst adlı araştırmacılar 1988'de *Campylobacter* cinsi içinde 16S rRNA sekansı, flajella yapısı, yağ asiti ve menakinon yerleşimini kullanarak birkaç farklı yapısal grup tanımlamışlardır. Bu grupta 1989 yılında Goodwin *C. pylori*'yi insan ve *C. mustalea*'nin de gelincik gastrik mukozasından izole edilmesiyle yeniden sınıflandırılmasını ve *Helicobacter* cinsi içine dahil edilmesini önermiştir. Pasteur ve Dewhirst daha sonraları *Wolinella recta*, *W. curva*, *Bacteriodes gracilis* olarak bilinen bazı türleri *Campylobacter* içerisine ve *W. succinogenes*'i de *Helicobacter* türlerinin içine dahil etmişlerdir (26). Trust ve ark. (26) 1994 yılında yapılan bu çalışmalar ışığında *Arcobacter*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Wolinella* ve *Bacteroides* türlerini, DNA-rRNA hibridizasyon, 16S rRNA sekans analizi ve immünotiplendirme sistemleri kullanılarak, "rRNA superfamily IV" olarak adlandırılan benzer filogenetik grup içerisine dahil edilmesini önermişlerdir (26). Bu grupta RNA homolojisi olarak üç gruba ayırmıştır: rRNA homoloji grup I (*Campylobacter* ve *Bacteroides ureolyticus*), rRNA homoloji grup II (*Arcobacter*) ve rRNA homoloji grup III (*Helicobacter*, *Wolinella* ve diğerleri). Ribozomal RNA homolojilerine göre bu sınıflandırma Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir. Bu mevcut sınıflandırmada Vandamme ve ark. rRNA homoloji grup I ve II'yi arasındaki yakın benzerlik açısından *Campylobacteraceae* ailesi içine

konulmasını önermiştir. Vandamme 1991 yılında saprofitik olan ve sülfürü indirgeyen *Spirillum* türlerini rRNA superfamily VI'e genetik olarak benzerlik gösterdiğinden daha sonraları *Sulphurospirillum* olarak adlandırarak yeni bir cins tanımlamışlardır (26).

Çizelge 2.1. rRNA superfamily IV'e göre *Campylobacteraceae* sınıflandırması (26).

rRNA Homoloji Grup I	rRNA HomolojiGrup II	rRNA HomolojiGrup III
<i>C. fetus</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>Helicobacter türleri</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>W. succinogenes</i>
<i>C. coli</i>	<i>A. nitrofigilis</i>	
<i>C. lari</i>	<i>A. skirrowi</i>	
<i>C. hominis</i>	<i>Sulfospirillum türleri</i>	
<i>C. gracilis</i>		
<i>C. sputorum</i>		
<i>C. concisus</i>		
<i>C. showae</i>		
<i>C. rectus</i>		
<i>C. curvus</i>		
<i>C. upsaliensis</i>		

Klinik ve çevre örneklerinden yeni türlerin izole edilmesi ile cins içerisine çok sayıda yeni tür ve alt tür ilave edilmiştir. *H. pylori* ilk tanımlandığı 1983 yılında *C. pylori* olarak adlandırılıp *Campylobacter* cinsi içerisinde sınıflandırılmış, ancak hücre duvarı yağ asitleri, DNA zincir yapısı ve enzimatik aktivitelerindeki farklılıklar sebebi ile diğer helikobakter türleri ile birlikte 1989 yılında "*Helicobacter*" cinsi içerisinde yeniden sınıflandırılmıştır (27).

Bakterilerin son sınıflandırmasında fenotipik özelliklerden çok, bakteri genomundaki (DNA) yüksek derecede korunmuş dizilerin, baz olarak alındığı genotipik yöntemler kullanılmaktadır. DNA-RNA hibridizasyon yöntemi, 16S rRNA sekans analizleri ve immün tiplendirme teknikleri kullanılarak *Campylobacter*ler, *Campylobacter*'lerle ilişkili diğer bakterileri ve isimlendirilemeyen *Campylobacter* benzeri mikroorganizmalar, *Proteobacteria* takımı içerisinde "rDNA superfamily VI" adlı yeni bir filogenetik gruba dahil edilmiş ve superfamily VI içerisindeki bakterileri,

gösterdikleri filogenetik heterojeniteye göre, kendi aralarında üç RNA homoloji gurubuna ayırmışlardır. RNA homoloji I'de gerçek *Campylobacterler* ve *Bacteroides ureolyticus*, rDNA homoloji II'de *Arcobacter* cinsi, rDNA homoloji III'de *Helicobacter* cinsi ve *Wollinella succinogenes* yer almaktadır. rDNA homoloji grup I ve II içerisindeki bakteriler filogenetik olarak yakın ilişkili olduklarından *Campylobacteraceae* familyası içerisinde yer almaktadır (27).

Campylobacter concisus, *C. showae*, *C. curvus*, *C. rectus*, *C. gracilis*, *C. sputorum* ve *C. hominis* gibi hidrojene gereksinim gösteren türler aynı zamanda filogenetik olarak ta birbirlerine benzerdirler. Bunlar içinde *C. concisus*, *C. showae*, *C. curvus* ve *C. rectus* periodontal patojen olarakta bilinmekle beraber bu dört türün tek rezervuarı insandır (28).

2.3. Mikrobiyolojik Özellikleri

2.3.1. Morfolojik Özellikleri

Campylobacter 0,2-0,9 µm genişliğinde ve 0,5-5 µm uzunluğunda kıvrık, sarmal veya S şeklinde basillerdir. Tek istisnası *C. hominis* düz görünümlü basil şeklindedir. *Campylobacter*'in eski kültürlerinde veya hava ile uzun süre temas halinde, Gram negatif sporsuz basil veya kokobasil şeklini de alabilmektedir (29).

Katı besiyerinde üretilen yeni kolonilerden hazırlanan preparatlarda spiral veya flemantöz şekilde gözlenirken, eskimiş kültürde veya yüksek oksijenli ortamda kokoid "Dormand" şekle dönüşebilirler. Polar veya bazı türlerde bipolar olabilen kılıfsız flajellaları ile oldukça hızlı hareketlidirler. Taze preparatlarda faz-kontrast veya karanık alan mikroskopunda tirbüşon tarzında hızlı hareketleri tipiktir (11).

Kokoid form aynı zamanda ısı, pH değişiklikleri vb. gibi olumsuz koşullarda *Campylobacter* türlerinin metabolik olarak aktif ancak kültür ile üretilemeyen bir şekle dönüştüğünde de görülür (30).

Klinik örneklerden hazırlanan preparatlarda "uçan bir martı" şeklinde görülür. *Campylobacter* türleri, bir ucunda veya her iki ucunda tek polar flajeli sayesinde

hareketli bir bakteridir. Ancak flajellasız olabileceği gibi birden fazla flajellasıda olabilir (30).

2.3.2. Biyokimyasal Özellikleri

Termofilik *Campylobacter* türleri selenit indirgeyen, indol negatif, katalaz ve sitokrom oksidaz pozitif bakterilerdir. Jelatin ve üreyi hidrolize edemezler, metil red ve Voges proskauer negatiftir. Lipaz aktiviteleri olmayıp, nitratı indirgerler ve pigment oluşturmazlar. Yüksek miktarda sitokrom b ve c'ye sahiptirler (31).

Campylobacter türleri karbonhidratları oksidatif ve fermentatif olarak biyokimyasal reaksiyonlarda kullanamaz ve enerji gereksinimlerini glutamin, glutamik asit, asparajin ve aspartik asit gibi amino asitlerin yıkımından, trikarboksilik asit siklusunun ara ürünlerinden, hidrojenin oksidasyonundan ve formiattan sağlarlar. *C. jejuni*'nin H₂S oluşturmamasına karşın, *C. jejuni* biyotip 2'nin H₂S oluşturduğu ve epidemiyolojik çalışmalarda bu farkdan yararlandığı bildirilmiştir (32).

Hippurat ve nitrat redüksiyon testi pozitifdir (Çizelge 2.2). *C. jejuni* ve *C. coli* nalidiksik aside duyarlı, sefolotine dirençlidir. Fakat *C. jejuni* spp. *doylei* farklı olarak sefolotine duyarlıdır. *C. lari* nalidiksik aside dirençli oluşuyla, diğer türlerden ayrılır (32).

Çizelge 2.2. Termofilik *Campylobacter* türlerinin önemli biyokimyasal özellikleri (26).

Tür veya Alt Tür	Katalaz	Nitrat redüksiyonu	Nitrit redüksiyonu	H ₂ gereksinimi	TSI'de H ₂ S	Hippurat hidrolizi	İndoksil asetat hidrolizi	Üreme				Duyarlılık	
								25°C'de	42°C'de	%3.5 NaCl	%1 Glisin	Nalidiksik asit	Sefalotin
<i>C. jejuni subspjejuni</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	S	R
<i>C. jejuni subsp doylei</i>	d	-	-	-	-	d	+	-	-	-	+	S	S
<i>C. coli</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	S	R
<i>C. fetus subsp fetus</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	d	S
<i>C. fetus subsp verealis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	S
<i>C. laridis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	R	R
<i>C. upsaliensis</i>	z	+	-	-	-	-	+	-	+	-	d	S	S
<i>C. hyointestinalis</i>	+	+	-	d	+	-	-	+	+	-	+	R	S
<i>C. sputorumbiovar sputorum</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	S	S
<i>C. sputorum biovar bubulus</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	R	S
<i>C. sputorum biovar fecalis</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	R	S
<i>C. helveticus</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	+	d	d	S	S
<i>C. mucosalis</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	R	S
<i>C. concisus</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	R	R
<i>C. curvus</i>	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	S	?
<i>C. rectus</i>	-	+	+	+	+	-	+	-	z	-	+	S	?
<i>C. showae</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	d	R	S
<i>C. gracilis</i>	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	S	R
<i>C. hyoilei</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	S	R

d: Değişken
z: Zayıf
R: Dirençli
S: Duyarlı

2.3.3. Hücre Duvarı ve Antijenik Özellikleri

Campylobacter hücre duvarı dışta lipoprotein tabaka, ortada lipopolisakkarit (LPS) tabaka ve içte mukopeptid tabakadan *Campylobacter* türlerinin, majör yüzey antijenlerini içermektedir. LPS tabakada yer alan ve tekrarlayan oligosakkarit ünitlerinin lineer birleşmesinden oluşan O-polisakkarit zinciri, O-antijenine özgünlüğü kazandırır (31).

Klinik ve çevresel örneklerden elde edilen *C. jejuni* suşlarının üçte ikisinde, hücre duvarında LPS yerine O-polisakkarit zinciri içermeyen, kor-oligosakkarit ve lipid A'dan oluşan ve bu nedenle daha düşük moleküler ağırlığa sahip olduğu bildirilen lipooligosakkarid (LOS) yapı bulunur. *C. jejuni*'nin bazı suşlarında kor-oligosakkariti, diğer prokaryotlarda bulunmayan, insanda özellikle periferik sinir sisteminde GM1, GM1b, GD1a, GalNAc-GD1a ve GQ1b gibi gangliositlerin yüzeyinde bulunan D-galaktoza bağlı N-asetil nöraminik asit (sialik asit) rezidüleri içermektedir (33). *Campylobacter* enfeksiyonu sırasında bakteriye ait bu antijenik determinantlara karşı gelişen immün cevap, sinir hücresi myelin tabakasındaki gangliozid reseptörlerinin tahribine sebep olur. Bu şekilde, Guillain-Barre sendromu (GBS) ve Miller-Fisher sendromu olarak tanımlanan periferik sinir hücrelerinde myelin kaybına bağlı olarak gelişen nörolojik komplikasyonlar ortaya çıkar (33).

Campylobacter'lerin önemli yüzey antijenlerinden biride *Campylobacter* flagellasını oluşturan ve flagelin adı verilen proteindir. Enfeksiyonlar sırasında, flageline karşı intestinal (IgA) ve serum (IgM, IgG) antikorlarının oluştuğu bildirilmektedir (34).

C. fetus suşlarında diğer *Campylobacter* türlerinden farklı olarak, hücre yüzeyini kafes şeklinde örten, S-tabaka veya mikrokapsül olarak tanımlanan protein kapsül bulunur. Bu protein kapsül, kompleman C3b'ye bağlanmayı zayıflatarak, defektif fagositoza ve serum direncine yol açmaktadır. Genellikle küçük ve hafif olan mantar sporları, havada uzun süre asılı kalabilmektedirler (35).

2.3.4. Genomik Özellikler

C. jejuni NCTC 11168 suşu analizi yapılan ilk tür olmuş ve Parkhil ve ark. (36) bu suşun 1700 kb'lık küçük bir genoma sahip olduğu gösterilmiş ve bu tarihten sonrada RM 12-21 ve *C. jejuni* 81-176 suşlarında genom analizlerini yapmıştır (36).

Yapılan çalışmalarda *C. jejuni*'nin NCTC 11168 suşunun genomunun 1,641,481 bp uzunluğunda, 1654 açık okuma bölgesi (ORF) içerdiği, genomun G+C ortalamasının %29±47 olduğu tespit edilmiştir (37).

Yapılan bir çalışmada çevresel örneklerde elde edilen *C. jejuni* suşunun genomu ile *C. jejuni* NCTC 11168 suşunun genomu incelenmiş, 1654 gen bölgesinden 1300'nün tüm serotiplerde ortak olan tür spesifik genler olduğunu, 354 gen bölgesinin ise suş spesifik olup bir veya birden fazla serotipte bulunmadığını belirlemişlerdir. Bu araştırmada tür spesifik genlerin biyosentetik ve metabolik işlemleri düzenleyen proteinleri ayrıca; flagellanın yapısal proteini, fosfolipaz A, PEB antijenik yüzey proteini, *CiaB*, *CadF* ve *CheY* proteinlerinin de aralarında bulunduğu önemli virulans faktörlerini kodladığı, suş spesifik genlerin ise flagella, LOS ve kapsül gibi yüzey lokalize yapıların modifikasyon sistemlerini kodladığı belirlenmiştir (38).

Campylobacter'lerde plazmidlerin yanı sıra mobil genomik yapılar arasında bakteriyofajlarda yer almaktadır. Yapılan bir başka çalışmada *C. jejuni* suşlarının %89'u ile *C. coli* suşlarının %14'ünün bir bakteriyofajla enfekte olduğu bildirilmiştir. Bakteriyofajla enfekte olan suş sekans değişikliğine yol açmış bu durumdan tiplendirmede yararlanılmıştır (39).

2.3.5. Kültür Özellikleri

Campylobacter türleri yüksek düzeyde duyarlılığa sahip bakteriler oldukları için, izolasyonda besiyerlerinde özel supplementlere ve uygun inkübasyon koşullarına gereksinim duyarlar (40). Skirrow ve ark. *Campylobacter*'lerin dışkıdan izolasyonuna sağlayacak ilk besiyerini, kanlı agara selektif supplementler katarak sağlamış bunu daha sonraki yıllarda *Campylobacter* izolasyonunu artırılması amacıyla zenginleştirme buyyonları ve besiyerleri geliştirilmesi izlemiştir (40).

Tüm *Campylobacter* türleri mikroaerofiliktirler. En iyi 37°C'de % 5-10 CO₂, %5 H₂ ve %85 N₂ içeren atmosferde, 48-72 saate ürerler (40). Atmosferdeki CO₂ miktarı türler arasında üremenin optimizasyonu için önemlidir. Bu ortamı sağlamak için çeşitli firmalar, rutin kullanım için mikroaerofilik gaz ortamını sağlayan paketler üretmişlerdir. Üç gazlı inkübatör veya içeriğinin boşaltılıp uygun gaz karışımı konulan anaerobik jar/kavanozlar da rutin uygulamalarda kullanılabilir. *C. sputorum*, *C. concisus*, *C. mucosalis*, *C. curvus*, *C. rectus* ve *C. hyointestinalis* gibi *Campylobacter* türleri ilk izolasyon ve üreme için artmış hidrojene gereksinim duyarlar (28).

Campylobacter türlerininin tümü 37°C'de ürer bunun yanında termofilik *Campylobacter* türleri olan *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* ve *C. upsaliensis* 42°C'de de üreyebilmekte bu özelliklerinden dolayı diğer türlerden ayırt edilebilmektedirler. Termofilik türlerin 35°C altında üremeleri oldukça yavaşlamaktadır (30). *Campylobacter*'lerin neden olduğu enteritlerinin neredeyse tamamından termofilik türler sorumludur. Kültür plaklarının 42°C'de inkübasyonu ile dışkıda bulunan diğer *Campylobacter*'ler ve flora bakterilerinin üremesi baskılanırken termofilik türlerin izolasyonu kolaylaşmaktadır (30).

Campylobacter'leri dışkıdan izole ederken, istenmeyen flora bakterileri için örneğin ya 0,45 ve 0,25 µm çaplı membran filtrelerden süzülmesi ile veya üretme besiyerlerinin içerisine Basitrasin, Sefalothin, Sefazolin, Kolistin, Novobiosin, Polymiksin, Rifampisin, Trimethoprim ve Vankomisin gibi antibiyotiklerin ilavesi gereklidir (26). Besiyerinde *Campylobacter* kolonilerinin görülmesi için en az 2 günlük inkübasyon süresinin geçmesi gerekmektedir. *Campylobacter*'ler besiyerinin nem oranına göre çeşitli koloni formlarına sahip olabilir. Kuru besiyerinde düzgün kenarlı 1-2 mm çapında parlak pembemsi gri konveks koloniler oluştururken, nemli ve taze besiyerinde yaygın, basık ve düzensiz birbirine kaynaşmaya meyilli su damlasına benzeyen koloniler meydana getirir, *C. lari*, *C. jejuni* ve *C. coli*'ye göre daha yaygın koloni formuna sahiptir (28).

2.3.6. *Campylobacter*'lerin Gelişimini Etkileyen Faktörler

Campylobacter'lerin gelişimi üzerine başta sıcaklık, pH, nem, tuz, dezenfektan ve iyonize ışınlar olmak üzere bir çok faktör etkili olmaktadır. *Campylobacter* türleri steril içme suyunda 4°C'de 64 güne kadar yaşayabilmektedir (41).

Kuruluğa 2-10 saat kadar dayanıklıdır. Cansız ortamda ısı, nem ve oksijen gibi koşullardan çabuk etkilendiğinden 10 ila 20 gün kadar canlı kalabilirler. *C. jejuni* ve *C. coli* 55°C'de altı dakika canlı kalabilir. Ortam pH'sının 4.5'in altında olduğu ortamlarda canlı kalamazlar (42). Bu nedenle mide asiti enfeksiyonun gelişmesinde önemli bir engeldir. Ancak özellikle yağlı gıdalar, su ve süt gibi asiti nötralize edici maddeler ile alındığında pH yükseleceğinden enfeksiyon riski artmaktadır. *Campylobacter* türleri pastörizasyona duyarlıdır. Doğal sularda 2-3 hafta canlılığını koruyabilirken dezenfektan olarak kullanılan hipokloritler, fenoller, iyodoforlar ve dört değerli antimon bileşikleri *C. jejuni*'yi bir dakika içinde öldürmektedir (42).

Çevresel streslerin varlığında *Campylobacter* türlerinin canlı fakat bilinen yöntemlerle kültürde üretilmeyen bir forma dönüştüğünü bildirilmiş, bu şekle canlı, fakat kültürde üretilmeyen (Viable But Nonculturable-VBNC) form adı verilmiştir (43).

2.4. Patogenez ve Virulans

İnsan ve hayvanlarda gastrointestinal enfeksiyonlara sebep olan *C. jejuni* ve *C. coli* türlerinin patogenezi bugüne kadar tam olarak anlaşılamamıştır. *Campylobacter* türlerinin genomik yapılarının, yüksek düzeyde tür içi varyasyonlar göstermesi ve uygun hayvan modellerinin olmayışı virulansla ilgili faktörlerin tespitini zorlaştırmaktadır (44).

Birçok bakteri türünün oral yolla enfeksiyon oluşturabilmesi için yüzbinlerce sayıda bakterinin vücuda girmesi gerekirken, termofilik *Campylobacter*'lerin 500 adedi bile bağırsaklara kolonize olmak ve enfeksiyon oluşturmak için yeterlidir (45).

Fekal oral yolla bulaşan *Campylobacter*'ler duyarlı kişilerde öncelikli olarak ileum ve jejunum epiteli olmak üzere bağırsak epiteline kolonize olarak, akut lokalize

inflamatuvar cevaba yol açar. Sekretuvar tip gastroenterit tablosuna yol açan inflamatuvar cevap, kronik infeksiyonlarda, epitel hasarının da tabloya eklenmesi ile hastanın kliniğini dizanterik forma dönüştürebilmektedir. *Campylobacter* suşunun virülansı ve konağın duyarlılığı hastalığın prognozunu etkilemektedir (45, 46). *Campylobacter*'ler kontamine gıda ve suların konakçı tarafından alınması ile mide asit bariyerini aşarak bağırsaklara geçerler. Bağırsaklardaki etkenler penetrasyon yolu ile distal ileum ve kolon epitelini örten mukozaya kolonize olurlar. Bağırsak yüzeyine tutunan bu etkenler, epitel hücrelere saldırarak ve toksin üreterek direkt yolla ya da konakçıda inflamatuvar bir reaksiyon meydana getirerek indirekt yolla bağırsakların emilim kapasitesini bozarlar (47). *Campylobacter*'lerin bağırsaklara yerleşebilmesi için kemotaksis ve motiliteye ihtiyaçları vardır. Bu etkenler, konakçı bağırsak epitelinde inflamatuvar reaksiyon sonucu meydana gelen kimyasal maddeleri algılama ve inflamasyon bölgesine hareket etmelerini sağlayan mekanizmalara sahiptirler. *C. jejuni*'nin patogeneğinde invazyon, önemli bir role sahiptir. Bakteriyel protein sentezinin invazyon için gerekli olduğu ve *Campylobacter*'lerin hücre kültürlerinde üretildiklerinde invazyon yeteneğine sahip 14 protein sentezledikleri tespit edilmiştir (47). *Campylobacter*'lerin infeksiyon oluşturmaları için epitel hücrelerine yerleşmeleri ve bunun içinde öncelikle hücrelere yapışmaları gerekmektedir. *In vivo* ve *in vitro* ortamlarda yapılan çalışmalarda *Campylobacter*'lerin epitel hücrelere adhezyonunda rol oynayan en önemli faktörün flagella olduğu tespit edilmiştir (48). Flagella, *Campylobacter* kolonilerinin nemli ve mikroskopta hareketli görünmesini sağlayan bir virülans faktördür. Diğer bakterilerde olduğu gibi flagellar filamentler, flagellin proteinlerinin multimerlerini içerir ve bakterilerin hareket etmesinde bir motor görevi görürler. Flagellalar konakçı epitel hücrelerine yapışmayı sağlayan kanca proteinlerinden oluşurlar (48). Flagellaların hareketi, *Campylobacter*'leri konakçının peristaltik hareketlerinden korur ve epiteli örten mukoza tabakasına girmelerini ya da buradan geçmelerini sağlar. Flagellalar ayrıca epitel hücrelere invazyonda önemli rol oynarlar. Bu yüzden flagellaların sağladığı motilite, *Campylobacter*'lerin hücrelere ulaşmaları ve yakın temas kurmaları için gereklidir (49). *Campylobacter*'lerin intestinal epitele adezyonunda hücre duvarında yer alan lipopolisakkari (LPS) tabakada önemli rol almaktadır. *Campylobacter* LPS'lerinin lipid A komponenti endotoksik aktiviteye

sahiptir. *Campylobacter*'lerin sistemik infeksiyonlarında LPS tabakalarının parçalanmasından dolayı sepsis ve şoklar meydana gelmektedir (50).

C. jejuni'deki LPS, çok sayıda O-antijenlerinden birine sahiptir. Bu O-antijenler hem polisakkarid hem de oligosakkarid yan zincirleri ile benzerlik göstermektedirler bu nedenle *Campylobacter* türleri, LPS ya da lipooligosakkarid (LOS) veya her ikisini birlikte üretebilirler (51). LPS'ler fagositik yıkıma karşı direnç oluşumu ve hücre toksisitesine neden olarak infeksiyonun ilerlemesine katkı sağlamaktadır (47). *C. jejuni*'nin dış membranından elde edilen dört protein (PEB1, PEB2, PEB3, PEB4) Hep-2 hücrelerine yapışabilmektedir. PEB1 proteini, epitel hücrelerinde bulunan ve büyük bir yapışma proteini olan CEB1 ile benzerdir (52). Fibronektin glikoprotein yapısında gastrointestinal epitel hücrelerindeki ekstraselüler matriksin bir proteini olup ve gastrointestinal patojenlerin büyük bir çoğunluğu bu proteine bağlanma özelliğindedir. *Campylobacter*'lerin fibronektine bağlanması kolonizasyonun erken dönemlerinde meydana gelir ve bunu invazyon için gerekli olan novo protein sentezi takip eder. Son yıllarda *Campylobacter*'lerin hücre duvarlarında bulunan ve *Campylobacter* adhezyon geni (CadF) tarafından kodlanan CadF proteininin fibronektine bağlandığı gösterilmiştir (53). *In vivo* şartlarda yapılan çalışmalarda *C. jejuni*'nin kolonize olması için CadF proteininin bulunması gerektiği, CadF'yi kodlayan genin, diğer bakterilerin dış membran proteinlerinin homoloğu olduğu tespit edilmiştir (53, 54).

Fimbrialar pek çok patojen bakterilerde bulunan önemli bir virulans faktördür ve bakterilerin hücrelere adhezyonunda görevlidirler (47). Klasik fimbrialar *Campylobacter*'lerde olmamasına rağmen, kıl benzeri fimbrial yapılar, bakterinin safra tuzu ile muamele edilmesi neticesinde gözlenmiştir. Putative peptidaz enzimini kodlayan prepilin peptidaz geni (*pspA*) bu fimbrial yapıların biyosentezinde görevlidir ve bu genin inaktivasyonu afimbrial mutantların oluşmasına neden olmaktadır. Ancak bu fimbrial filamentlerin alt ünitelerini kodlayan genler tanımlanamamıştır (55). *Campylobacter*'lerle ilgili yapılan çalışmalarda, virulans yönünden incelenen mekanizmalardan birisi, gastroenteritlere neden olan *V. cholerae* ve *Clostridium difficile* gibi bakterilerin de salgıladıkları toksin üretimidir (55). Enterotoksinler, hücre içinde siklik adenozin monofosfat (cAMP) seviyesinin yükselmesine ve hedef hücre reseptörlerine bağlanabilme yeteneğine sahip proteinlerdir. *V. cholerae* toksin (CT) ve yakın ilişkili *Escherichia coli*'nin ısıya duyarlı toksini (LT) *Campylobacter*

enterotoksinlerinin prototipleridir (54). *V. cholera* toksin ve LT iki alt üiteden oluşurlar. Büyük olan A alt ünitesi enzimatik aktiviteye sahiptir, daha küçük ve pentamer bir yapıya sahip olan B alt ünitesi ise hücre reseptörlerine bağlanma yeteneğine katkı sağlar (54, 55). B alt ünitesi ile hücre reseptörlerine bağlanan enterotoksinler, A alt ünitesi ile hücre içerisine taşınır ve hücre adenilat siklaz düzenleyici sistemi bozarlar. Sonuç olarak hücre içi cAMP seviyesi yükselir ve hücreler arasında ve içinde iyon dengesinde değişiklikler meydana gelir. Bu değişiklikler sıvının bağırsaklara sekresyonunu artırarak gastroenteritlerin oluşmasına neden olur (54, 55).

Son yıllarda en az altı farklı toksin yada toksin sınıfının varlığı tespit edilmiştir. Bunlar *in vitro* hücre kültürlerindeki etkilerine göre:

- 1- HeLa hücrelerini aktive etmesine rağmen Vero hücrelerini aktive edemeyen 70 kDa büyüklüğündeki toksin
- 2- HeLa ve Vero hücrelerini aktive eden sitotoksin ya da toksinler
- 3- Cytolethal distendingtoksin (CDT)
- 4- Shiga benzeri toksin
- 5- Hemolitik etki gösteren sitotoksinler
- 6- Hepatotoksinler şeklinde sıralanır (56, 57).

Campylobacter virülansından sorumlu faktörlerden biri olan CDT, CdtA ve CdtC bağlayıcı bileşenler ile CdtB aktif parçasından oluşmaktadır. Bu toksin hücreye alındığında nükleusa giderek DNA sarmalında kırıklara neden olarak hücre siklusunun G2 fazında durmasına neden olmaktadır. Ancak bu mekanizmanın gastroenterit patogenezindeki rolü pek açık değildir. CDT'nin, IL-8 salınımından, makrofajların apoptozisinden ve inflamatuvar bağırsak hastalığında malign transformasyondan sorumlu olduğu ileri sürülmektedir (58, 59).

C. jejuni suşlarının intestinal hücreye invazyon yeteneği plazmidlerle kodlanan ve tam olarak tanımlanamamış bir dizi genetik faktör tarafından da etkilenmektedir. İlk defa çiğ süt kaynaklı salgın sırasında bir grup çocuktan izole edilen *C. jejuni* 81-176 suşunun intestinal epitele invazyon yeteneği diğer türlerden daha fazla bulunmuştur. Bu suşun, avirulan *C. jejuni* NCTC 11168 suşunda olmayan pTed ve pVir adlı iki büyük plazmid taşıdığı gösterilmiştir. Bu plazmidlerden pVir'in epitel hücreye invazyonda

etkili olduğu in-vitro olarak ispatlanmıştır. Yapılan klinik çalışmalarda, gaita örneklerinden izole edilen *C. jejuni* suşlarının %19-53 oranında bu plazmiti taşıdığı ve pVir taşıyan suşlarla görülen intestinal kolonizasyonun daha yüksek oranda dizanteriye yol açtığı gösterilmiştir (31).

C. fetus infeksiyonları sonrasında bakteriyemi sıklıkla görülür. *C. fetus* suşlarının yüzeyinde yer alan S-protein, mikroorganizmayı serumun bakterisidal etkisine karşı korumakta, bu nedenle *C. fetus* infeksiyonlarından sonra bakteriyemi daha sık gelişmektedir (31).

Campylobacter infeksiyonlarının hepsi hastalık ile sonuçlanmamaktadır. Hastalığın oluşumunda, ince bağırsağa ulaşan mikroorganizma sayısı, infeksiyona neden olan suşun virülansı ve mikroorganizmaya karşı konağın bağışıklılık sistemi rol almaktadır (60). *Campylobacter* infeksiyonunun inkübasyon periyodu 1 ile 7 gün kadardır. Bu fark gastrointestinal sisteme alınan mikroorganizma sayısı ile ters orantılıdır. İnfeksiyonların çoğu ortalama olarak 2-4 gün içinde ortaya çıkmaktadır. Yapılan bir çalışmada 500 kadar mikroorganizma alınmasının hastalığa neden olduğu bildirilmekle beraber 10^4 'ün altında alınan mikroorganizmanın nadiren hastalığa neden olduğu düşünülmektedir (60). *C. jejuni* ve *C. coli* içerdiği elongasyon faktörleri, ferritin, ATP sentaz gibi bazı proteinler sayesinde safrada kolonize olabilmekte ve çoğalabilmektedir. Bu özellik infeksiyonun erken dönemlerinde ince bağırsağın safradan zengin üst kısımlarında, *Campylobacter*'in kolonizasyonuna yardım eder (61). *Campylobacter*'lerin dokularda oluşturduğu lezyonlar açısından bakıldığında jejunum, ileum ve kolonun tamamında benzer hasara yol açar. Etkilene yapıların incelemesinde bağırsak duvarı diffüz kanlı, ödemli ve eksüdatif enterit ile karakterizedir. Fakat patolojik inceleme genellikle çok şiddetli bulgularla seyreden hastalarda yapılmaktadır (60). Rektal biyopsi örneklerinin mikroskopik incelemesinde mukozal epitelde ülserasyonlar, epitelyal glandlarda kript abseleri, dejenerasyon, atrofi ve mukus kaybı, lamina propriyada nötrofil, ve mononükleer hücreler ile eozinofillerin iltihabi infiltrasyonu ile karakterli nonspesifik kolit bulgularını göstermektedir (11).

Gelişmiş ülkelerde *Campylobacter* infeksiyonunu takiben ortalama 2-3 hafta bakteri dışkı yoluyla atılmaya devam eder. Konvalesan dönemdeki bu atılım nadiren 3 aya kadar uzayabilir. Gelişmekte olan ülkelerde ise bu atılım çok kısa sürmektedir. Bu muhtemelen toplumun immünesinin yüksekliğinden kaynaklanmaktadır (11).

Campylobacter gastroenteritlerinin patogenezinde demir iyonlarında önemli rol almaktadır. Bakterilerin çoğu demir kullanımı ile taşınmasında sideroforu üretmesine karşın *C. jejuni* ve *C. coli*'de siderofor üretildiği bir biyokimyasal yol gösterilememiştir (62). *C. jejuni* ve *C. coli* bağırsakta diğer bakterilerin ürettiği sideroforları kullanarak *C. jejuni*'nin dış membranındaki CfrA reseptörüne bağlanır ve FeoB proteini ile hücre içine alınır. *feoB* genindeki mutasyon sonucu insan ve yaban domuzlarındaki intestinal hücrelerine zarar verir (62).

Campylobacter dış membranı tipik endotoksik özelliği olan lipopolisakkarit içermekte olup O antijeninin yapısı çok değişkendir. İnsanlarda bulunan GM₁, GM₂, GD_{1a}, GD₃, GQ_{1b} ve GT_{1a} gibi gangliozidlere benzerlik, Guillain-Barre sendromunun patogenezinde önemli rol oynamaktadır (63). *Campylobacter*'in dış membranda bulunan lipooligosakkaritlerin genomik analizi ve monosakkaritlerin dizilimi açısından oldukça farklılıklar göstermektedir. Lipooligosakkaritlerin bir başka önemi insan gangliozidlerine benzeyen siyalik asit rezidülü formlarının Guillain-Barre Sendromunun patogenezinde rol oynamalarıdır (63). Plazmidler *Campylobacter*'lerin intestinal epitele invazyonda yer alan bir başka faktördür. Bacon ve ark. *C. jejuni* pVir plazmidinin intestinal epitelinin invazyon ve adhezyonunda önemli rol oynadığını bildirmişlerdir Bu çalışmada *C. jejuni* 81-176 suşunda pVir plazmidini tanımlanmıştır. pVir plazmidi bakterilerin majör patojenitesinden sorumlu yaklaşık 37.5 kb'lik bir plazmidir (64).

Tracz ve arkadaşlarının çalışmasında pVir plazmidi varlığı ile yüksek düzey tetrasiklin direnci arasındaki ilişki araştırılmış, pVir pozitif 18 *C. jejuni* suşunun 17'sinde tetrasiklin direnç plazmidinin de pozitif olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmada semptomlarla pVir plazmidi arasında bir bağlantı kurulamazken kanlı diyaresi olan hastalarda bu plazmid daha yüksek oranda saptanmıştır (65).

Campylobacter enteritli hastaların patogenezinde rol alan etkenlerden biride konağın immünesidir. Hastalığın akut dönemlerinde serum IgG, IgM ve IgA antikor yanıtı gelişirken barsak lümenine de salgısal IgA sekresyonu aniden yükselir. Gelişmekte olan ülkelerde serum IgA düzeyi yaş ile doğru orantılı olarak artmaktadır (66). Kazanılmış veya konjenital hipogammaglobinemi hastalarda *C. jejuni* enteritinin tekrarlayan ve şiddetli bir seyir izlediği tespit edilmiştir. Yeni doğanlarda ise anneden geçen antikorlar sayesinde ilk altı ay hastalık son derece nadir görülmektedir (66).

2.5. Antibiyotik Duyarlılığı

Campylobacter'lerin bir çok antibiyotiğe karşı direnç geliştirdiği bilinmektedir. Ancak antibiyotiklere karşı oluşturdukları direnç mekanizmaları bir çok çalışma yapılmasına karşın tam olarak açıklık kazanamamıştır. *Campylobacter* türlerinde antibiyotik direncinin oluşumu kromozomlarda meydana gelen mutasyonlar ve bazı bakterilerde bulunan antibiyotik direnç genini taşıyan plazmid veya transpozonların transferi yoluyla şekillenmektedir (67). Günümüzde insan ve hayvanlarda *Campylobacter* infeksiyonlarının tedavisi amacıyla en sık kullanılmış olan antibiyotikler florokinolonlardır. Florokinolonlar bakterilerdeki topoizomerez IV ve DNA giraz (topoizomerez II) enzimlerini inhibe ederek etkisini gösteren antimikrobiyal ajanlardır (67). Florokinolonlara direnç ilk kez 1990'lı yıllarda insan ve hayvanlarda bu ilaçların çok fazla kullanılmaya başlandığı Asya ile İsviçre, Hollanda, Finlandiya ve İspanya gibi Avrupa ülkelerinde ortaya çıkmıştır (68). Gelişmiş ülkelerde florokinolonlara dirençli *C. jejuni* izolatlarının ortaya çıkması, hayvan-gıda üretiminde dikkatli antimikrobiyal ilaç kullanımının gerekliliğini ortaya koymuştur (67). *Campylobacter*'lerde antimikrobiyal dirençliliğe neden olan birçok faktör vardır. DNA giraz subunit A (*gyrA*) genindeki nokta mutasyonları *Campylobacter*'lerde florokinolonlara karşı direncin oluşmasına neden olmaktadır. Bundan başka bakteriyel hücre duvarındaki geçirgenliğin azalması ve eflüks pompasının aktivitesindeki yükselme florokinolonlarla birlikte tetrasiklin gibi diğer antibiyotiklere karşı dirençliliğin artmasına neden olmaktadır (68).

2.6. *Campylobacter* İnfeksiyonları

Campylobacteriosis, insanlarda termofilik *Campylobacter* türlerinin sıklıkla fekal oral yolla bulaşı sonucu ortaya çıkan ve basit sekretuvar tip bir gastroenteritten kanlı, mukuslu gaita çıkarımı ile karakterize bazen fatal seyreden dizanterik formda gastroenteritlere kadar değişen klinik formlarda seyreden bir infeksiyon hastalığıdır (60). *C. jejuni* ve *C. coli* bütün dünyada insanlardaki akut bakteriyel gastroenteritlerin en önemli etkenleridir. Amerika'da her yıl 2,5 milyon, İngiltere'de ise sadece 2001

yılında 54 binin üzerinde *Campylobacter* vakası rapor edilmiştir (69). *Campylobacter*'lerin insanlarda meydana getirdiği enterit vakalarının *Salmonella*, *Shigella* ve *E. coli* gibi diğer bakterilerle kıyaslandığında oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (69). *Campylobacter* infeksiyonları gelişmiş ülkelerde olduğu kadar gelişmekte olan ülkelerde özellikle de çocuklar arasında büyük bir problem olarak ortaya çıkmaktadır (54). *C. jejuni*'nin yaptığı en tipik infeksiyon *Salmonella*, *Shigella* veya diğer enterik patojenlerin neden olduğu gastroenteritlerden ayırt edilemeyen akut gastroenterit tablosudur (60). *Campylobacter* enteritlerinde klinik tablo çoğu kez kendini sırlamakta ve semptomlar birkaç gün içinde yok olmaktadır. Hastalık %10-20 olguda bir haftadan uzun sürmekte ve tedavi almayan hastalarında %5-10'unda relaps görülmektedir (26). İnfeksiyon bütün yaş gruplarında görülürken klinik görünüm yaşa göre değişkenlik gösterebilmektedir. İnfantlarda dehidratasyon ve konvülsiyon görülebilirken süt çocukluğu döneminde anne sütü koruyucu olmakta anne sütünü almayan çocuklarda semptomlar ortaya çıkmaktadır (26). Hastalık gastroenterit ve abdominal kramp ile başlamaktadır. Bazı hastalarda infeksiyon baş ağrısı, ateş, myalji ve kırıklık gibi grip benzeri prodromal semptomlarla başlayabilir. Genellikle 12-24 saat süren bu prodromal dönemden sonra başlayan gastroenteritin ilk gününde günde 10, %20 olguda ise 15'ten fazla dışkılama ile karakterizedir (11, 60). Temel semptom olan gastroenterit, yumuşak kıvamdan aşırı sulu ve kanlı gastroenterite kadar değişmektedir. Abdominal ağrı kramp tarzında ve defekasyonla azalır. Ancak bazen ağrı esas veya tek semptomdur. Böyle durumlarda hasta şikayeti sağ alt kadranda hissettiği takdirde yanlışlıkla apandisit tanısı konarak apendektomi uygulanabilir. Çıkarılan apandisit dokusunda inflamasyon yok veya çok azdır. Ateş vakaların yaklaşık üçte ikisinde 37,5 °C üzerinde görülür. Nadiren 40 °C üzerine çıkar (60).

2.6.1. *Campylobacter* İnfeksiyonlarının Lokal ve Sistemik Komplikasyonları

Campylobacter gastroenteriti sonrası lokal invazyon ile masif hemoraji, kolesistit, pankreatit ve obstrüktif hepatit yanında fokal segmental, diffüz proliferatif ve kresentrik immün kompleks glomerulonefrit gelişebilmektedir (70). *Campylobacter*'ler kronik böbrek yetmezliği olan ve peritoneal diyaliz uygulanan hastalarda, sirozlularda

spontan peritonit tablosu meydana getirebilmektedir. Gebelerde 3. trimester dışında infeksiyon orta şiddette kendini sınırlarken, son trimesterde annenin infekte olması durumunda bebekte neonatal sepsis ve ölüm görülebilir (60). *Campylobacter*'lerin sistemik yayılımı sonucu bakteriyemi, menenjit, perikardit, miyokardit, endokardit ve artrit gibi barsak dışı komplikasyonlar, gelişebilmektedir (72). *Campylobacter* infeksiyonlarından sonra Guillain-Barre sendromu (GBS), hemolitik üremik sendrom, interstisyel nefrit, IgA nefropatisi, reaktif artrit, bursit, eritema nodozum gibi geç başlangıçlı, non infeksiyöz komplikasyonlar da görülebilmektedir (73). GBS ABD'de en çok Penner serotiplendirme sistemine göre serotip O:19 ile birlikte görülürken Güney Afrika ve dünyanın diğer bölgelerinde ise en çok serotip O:41 ile ilişkili görülmektedir. Tablo enteritten 1-3 hafta sonra nörolojik semptomların başlamasıyla ortaya çıkar (74, 75). GBS'nun periferik sinirlerin antijenik proteinlerine karşı antikor üretimi sonucu gelişen otoimmün bir hastalık olduğu, başta *C. jejuni* olmak üzere *Mycoplasma pneumoniae*, *E. coli*, Cytomegalovirus, Epstein-Bar virus, Human immunodeficiency virus (HIV), Influenza virus, Cocksackie virus, Herpes simplex virus, Hepatit A ve C virus gibi infeksiyon ajanların, aşılama ve cerrahi girişimlerin bu antikorların yapımını tetiklediği düşünülmektedir. GBS'lu olguların %50-70'inde nörolojik semptomlar, gastroenterit, solunum yolu enfeksiyonu veya aşılamaadan 2-4 hafta sonra gelişmektedir (74). *C. jejuni* enfeksiyonu sonrası genellikle kalıcı nörolojik bozuklukların görüldüğü aksonal tutulumlu GBS görülmekte, GBS'da geçirilmiş *Campylobacter* enfeksiyonu kötü prognostik faktörler arasında sayılmaktadır (75). Yapılan çeşitli çalışmalarda aksonal tip GBS'lu olguların yaklaşık %30 ile %40'ında 2-3 hafta önce geçirilmiş *C. jejuni* enfeksiyonunun tesbit edildiği bildirilmektedir (76). *Campylobacter* gastroenteritleri, ataksiya, arefleksi ve oftalmopleji triadına sahip Fischer sendromu ile ilişkili bulunmuştur (77). *Campylobacter* enfeksiyonunun diğer postenfektif komplikasyonu, özellikle HLA-B27 taşıyıcısı olan bireylerde gelişen reaktif artritir. Bu komplikasyonda GBS gibi *C. jejuni* enteritini takiben gelişir. Reaktif artrit aynı zamanda *Salmonella*, *Shigella* ve *Y. enterocolitica* enfeksiyonları sonrasında da ortaya çıkar. İskandinav ülkelerinde *C. jejuni* enteritli hastaların %1-2'sinde gastroenteritten dört gün ile dört hafta sonra artrit geliştiği bildirilmiştir (60). Ayrıca yapılan çalışmalar ve vaka raporlarına göre iki olguda üveit, beş olguda da eritema nodozum görülmüştür. Enterit sırasında hemolitik üremik sendrom geliştiği bildirilen dokuz vaka mevcuttur.

Çok nadir olmakla beraber kardit, hemolitik anemi ve ensefalopati de bildirilmiştir (60). İmmün sistemi baskılanmış hastalarda *C. jejuni* gastroenteriti normal sağlıklı bireylerde oluşan enteritlere göre kırk kat daha fazla tespit edilmektedir. HIV’li hastalarda enfeksiyon bir özellik göstermezken hipogammaglobulinemili hastalarda enfeksiyon şiddetli ve relapslarla seyretmektedir. Splenektomili bireylerde opsonizasyon bozuk olacağından ekstraintestinal yayılım daha kolay gerçekleşecektir (60).

C. fetus.subs.fetus’ün neden olduğu gastroenteritler *C. jejuni*’ ye göre daha az sıklıkla görülmektedir. Fakat, bu hastalarda bakteriyemi, septik tromboflebit, meningoensefalit gibi sistemik enfeksiyonlar, septik artrit, salpenjit, ampiyem, selülit, üriner sistem enfeksiyonları, osteomyelit ve kolesistit gibi lokalize enfeksiyonlar daha sık görülmektedir (Çizelge 2.3) (78).

Çizelge 2.3. *Campylobacter* türlerinin meydana getirdikleri enfeksiyonların özellikleri (78).

Özellikler	Barsak enfeksiyonları	Barsak dışı enfeksiyonları
Asıl etken	<i>C.jejuni</i>	<i>C.fetus</i>
Diğer etkenler	<i>C.coli</i> <i>C.lari</i> <i>C.fetus</i> <i>C.upsaliensis</i>	<i>C.jejuni</i> <i>C.coli</i> <i>C.lari</i> <i>C.hyointestinalis</i> <i>C.mucosalis</i>
Virulans faktörleri	Enterotoksin Sitotoksin	Hücre yüzeyini kaplayan, fagositozdan koruyan antijenik bir protein tabaka
İnkübasyon süresi	1-7 gün (Alınan doza, virülansa, konağın durumuna göre değişir)	?
İnfeksiyon tipi	Enterit Kolit	Bakteriyemi Derin odak enfeksiyonları (Endokardit, perikardit, SSS enfeksiyonları, artrit, peritonit, osteomyelit, artrit, ampiyem, idrar yolu enfeksiyonları, kolesistit)
Komplikasyon	Reaktif artrit (HLA-B27 antijeni olanlarda) Guillan-Barre sendromu	Hamilelerde ölü doğum, Bakteriyemi, endokarditte ve perikarditte tromboflebit gelişmesi
Prognoz	Ortalama 1-7 günde iyileşme	İnfeksiyon tipi, konağın bağışıklık sistemi ve suşun virülansına bağlı olarak değişir
Laboratuvar tanı	Dışkı örneklerinin direkt mikroskopisi ve mikroaerofil ortamda, 42 °C’de dışkı kültürü	
Tedavi	Sıvı-elektrolit açığı düzeltilmeli, gerektiğinde antibiyotik tedavisi	Uygun antibiyotik tedavisi ve semptomatik tedavi

2.7. Bulaşma ve Taşınma Yolları

Campylobacter türlerinin mikroaerofilik özellikleri, kuruma vb. dış çevresel koşullara karşı oldukça duyarlı olmaları ve 32-44°C sıcaklıklar dışında ürememeleri, bu etkenlerin çevrede canlı kalmalarını sınırlamaktadır (29, 80).

Campylobacter'lerin kontaminasyon siklusunun önemli bir aşaması olan çoğalmanın meydana geldiği yer sıcak kanlı hayvanların ve kuşların bağırsaklarıdır. Bu sebepten dolayı *Campylobacter*'lerin en büyük çevresel rezervuarları sıcak kanlı hayvanlar ve kuşlardır. *Campylobacter*'ler bu hayvanların bağırsaklarında kommensal olarak bulunmakta ve dışkı ile etrafa yayılmaktadırlar (29, 80). *Campylobacter*'lerin kontaminasyonda az pişmiş kanatlı hayvanların eti, yetersiz ısı işlemi görmüş süt, çiğ süt su ve deniz ürünleride yer almaktadır. Deneyimli olmayan kesimhane personelinin çalıştırılmasının, ev kadınlarının indirekt bulaşmada etkili olduğu bildirilmiştir (81). Su ve sütün kontaminasyonunda sığır, koyun, domuz ve kanatlı hayvanların dışkılarıyla etkenleri etrafa saçmalarının önemli rol oynadığı bildirilmiştir (82). Pek çok hayvan, *C. jejuni* için rezervuar olarak bulunurken *C. coli* ve *C. hyointestinalis* genellikle domuzlarda, *C. lari* martılarda, *C. upsaliensis* köpeklerde ve periodontal patojen olarak bilinen *C. rectus*, *C. curvus*, *C. concisus* ve *C. showae* ise tek rezervuarı olan insanlarda bulunmaktadır (83). Hayvanların *Campylobacter* türleri ile ilk karşılaşmaları hayatın erken evrelerinde olup morbidite ve mortaliteyle sonuçlanmaktadır. Hastalık geçirildikten sonra hayvanlar ömür boyu taşıyıcı olmaktadır. İnsanlara bulaşma en çok *Campylobacter* türleri ile kontamine etlerin tüketimi yoluyla olmaktadır. Bu da infekte hayvanların kesim işlemleri sırasında hayvan etlerinin, *Campylobacter* türleri ile kolonize olan bağırsak içeriği ile teması sonucu olmaktadır. Dolayısıyla ticari olarak yetiştirilen kullanıma hazır kümes hayvanı etlerinin çoğu *Campylobacter* türleri ile kontamine edilmiştir (11). Çiğ midye, çiğ veya az pişmiş kırmızı et, pastörize edilmemiş peynirler, keçi sütü ve evde yiyeceklerin hazırlanması sırasında çapraz kontaminasyon nedeniyle çiğ tüketildiğinden sebze ve salatanın da en az tavuk eti kadar *Campylobacter* kaynağı olarak gösterilmiştir (84). Gelişmiş ülkelerde sporadik *Campylobacter* infeksiyonlarının yaklaşık %50 ile %70'inden iyi pişmemiş kümes hayvan etinin tüketilmesinin sorumlu olduğu düşünülmekte, infekte hayvanlar ile direk temas, bulaşma ile sonuçlanabilmektedir. Özellikle gastroenteritli genç kedi ve köpekler gibi

evcil hayvanlar, *Campylobacter* türleri için vektör olabileceği gösterilmiştir. Ayrıca inek, koyun gibi çiftlik hayvanları ile yakın temasta bulunanlar infeksiyon açısından yüksek risk altındadır. Laboratuvar ilişkili infeksiyon da bildirilmiştir. Diğer enterik patojenlerde olduğu gibi fekal-oral veya insandan insana bulaşma vakalarında bildirilmiştir. Çok nadir olmakla beraber gıda hazırlayan asemptomatik *Campylobacter* taşıyıcısı olan personelin hazırladığı yiyecekler yoluyla da bulaşma gerçekleşebilmektedir. Semptomatik olmayan annelerden perinatal bulaşma hayatın ilk gününde veya doğum kanalından geçiş sırasında temas sonucu olabilmektedir (11). Kontamine içme sularında *Campylobacter* türleri için kaynak olmaktadır. İçme sularından kaynaklanan *Campylobacter*'lere bağlı gastroenterit salgınları bildirilmiştir. Bu salgınlara atık su borularının içme suyu borularına yakın olması, içme sularının klorlama işleminin hatalı yapılması veya klorlama işleminin yapılmaması sebep olmaktadır. Yeraltı sularının işlenmeden tüketiminin çok olduğu İsveç, Norveç ve Finlandiya gibi kuzey Avrupa ülkelerinde, su kaynaklı *C. jejuni* infeksiyonlarının daha sık görüldüğü bildirilmektedir (85).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), *Campylobacter* salgınları ile ilgili yaptığı bir araştırmada; 1978 ile 2003 yılları arasında ortaya çıkan *Campylobacter*'lere bağlı salgınları değerlendirmiştir. *Campylobacter*'lere bağlı 907 salgının belirlenmiş ve bu salgınların %60'ında salgının kaynağı belirlenememiş, kaynağı belirlenen salgınlar içerisinde ise en sık olarak süt ve su kaynaklı salgınlar saptanmıştır (86). Ev içi yakın temas ile hayvandan insana direkt ya da özellikle asemptomatik taşıyıcılığın yüksek olduğu tropikal bölgelerde insandan insana fekal-oral yoldan bulaş da bildirilmiştir. *Campylobacter* infeksiyonlarında bulaşmada tüm yiyecekler içinde özellikle tavuk eti sorumlu tutulmaktadır. İnfeksiyon *Campylobacter*'le kontamine az pişmiş etin yenmesi ve çiğ ete temas eden ellerin ağıza götürülmesi ile bulaşabilmektedir (87).

2.8. Bağışıklık

Campylobacter'ler konakçı tarafından alındıktan sonra bunlara karşı doğal ve spesifik immün yanıt meydana gelir. Mide asiditesi gibi spesifik olmayan savunmalar, *Campylobacter*'lerin patogenezinde önemli rol oynamalarına rağmen etkenlerin

bağırsak epiteline kolonize olması ve infeksiyonun önlenmesinde yeterli değildir (88). Konakçı tarafından alınan *Campylobacter*'lere karşı fagositik hücrelerden interlökin-8 (IL-8) salınmaktadır. Bu gibi doğal konakçı cevabı, infeksiyonun yayılmasını sınırlayabilmekle birlikte kısmen de olsa semptomlar meydana gelebilmektedir. Ekstraselüler patojen olarak bilinen *Campylobacter*'lerin meydana getirdiği infeksiyonlara karşı humoral immun yanıt oluşmaktadır (89). İnfeksiyonu takiben konakçı bağırsak lümeninde salgısal IgA (SIgA) ve IgG, serumda ise IgM ve IgG sınıfı antikorların seviyesi yükselir. IgM ve IgG sınıfı antikorlar 45 gün süresince serumda ve bağırsak lümeninde yüksek seviyede kalırlar ve yaklaşık 90 gün sonra normal seviyelerine gelirler. Salgısal IgA ise çok daha kısa bir sürede normal seviyesine ulaşır (89).

Campylobacter infeksiyonlarında humoral immun yanıtı ilave olarak hücresel immun yanıtı infeksiyonu ortadan kaldırmada önemlidir (99). Hücresel immun yanıtı genel olarak zorunlu ya da fakültatif hücre içi patojenlere karşı gelişen spesifik bir immun yanıtıdır. *Campylobacter* etkenleri ekstraselüler patojen olmalarına rağmen, yapılan çalışmalar bu etkenlerin bağırsak epitel hücreleri ve makrofajların içinde de canlı kalabildiğini göstermiştir. Özellikle infeksiyonun şiddetli seyrettiği hipo ve agammaglobulinemili hastalarda hücresel immun yanıtının infeksiyondan korunmada önemli bir role sahip olduğu rapor edilmiştir (88). Vuckovic ve ark. (88). C57BL/6 farelerinde yaptıkları bir araştırmada CD8⁺ ve CD4⁺ T lenfositlerinin fareleri *Campylobacter* infeksiyonlarına karşı korumada önemli rol aldıklarını bildirmişlerdir. *C. jejuni*'nin en yüksek immunojenik proteini iki gen (*flaA* ve *flaB*) tarafından kodlanan flagellindir. Bu genlerden her birinin antijenitede değişikliklere yol açtığı deneysel olarak ortaya konmuştur. Ancak doğal infeksiyon esnasında bu değişikliklerin meydana geldiğine dair bir kanıt yoktur. İnfeksiyon özellikle immun sistem baskılayan HIV ve benzeri hastalık durumlarında oldukça şiddetli bir şekilde seyreder (90).

2.9. Laboratuvar Tanı

2.9.1 Örneklerin Toplanması, Taşınması ve Saklanması

Campylobacter gastroenteriti olan hastalardan izolasyon için dışkı örnekleri tercih edilmekle beraber kültür için rektal sürüntü örnekleri de uygundur. Alınan örnek bir iki saat içinde işleme alınmalıdır. Hastalardan alınan dışkı örneği, temiz, deterjan ve dezenfektanla kontamine olmayan, geniş ağızlı, kapaklı ve sızdırmaz bir kap içerisine alınarak oda ısısında taşınmalıdır. Eğer rektal sürüntü örnekleri kullanılacaksa, rektal sfinkterden 2-3 cm içeri sokulan eküvyon rotasyonel hareketler yaptırılarak kriptlerle temas ettirilmelidir. Daha sonra yine rotasyonel hareketlerle rektumdan çıkartılan eküvyon taşıma kabı içerisinde laboratuvara ulaştırılmalıdır (78). Örnekler iki saat içinde işleme alınamayacaksa alınan örnekler modifiye Cary Blair taşıma besiyerine alınmalı ve laboratuvara ulaştırılıncaya kadar +4°C'de korunmalıdır. Dışkı örneklerinin dondurulması uygun değildir (91). Taşıma besiyeri olarak örnekler modifiye Carry-Blair dışında, alkali peptonlu su, tiyoglikolatlı sıvı besiyeri, Campy-Thio, Caryy-Blair ile taşınabilmektedir (92). Yapılan çalışmalar diğer formülasyonu aynı ancak litre başına agar miktarı azaltılmış (1.6 g/lt) modifiye Caryy-Blair besiyerinin *Campylobacter*'ler için en uygun taşıma besiyeri olduğunu göstermiştir (28, 93). *Campylobacter* gastroenteritlerinde klinik materyal dışkı veya rektal sürüntüdür. Ancak bakteriyemi halinde mikroorganizmanın kan kültüründe izolasyonu tanıya yardım eder. Yapılan çalışmalarda *C. fetus*, *C. upsaliensis* ve *C. jejuni* türlerinin kandan izolasyonu için BACTEC ve Septi-Chek gibi otomatize sistemlerin uygun olduğunu anaerobik buyyon ve lizis santrifügasyon gibi manuel sistemlerin ise uygun olmadığı bildirilmiştir (28). İzole edilen *Campylobacter* izolatlarını saklamak için en uygun ve en çok tercih edilen yöntem %15 gliserol içeren besiyerleridir (84). Bu besiyerleri içinde saklanan *C. jejuni* izolatları -20°C'de 12 ayda %80'i canlı kalabilirken -85°C'de ise %100'ünün canlı kalabildiğini Cody ve ark. (84). yaptıkları çalışmada benzer sonuçların skim milk saklama besiyeri ile de aldıklarını bildirmişlerdir.

2.9.2. Direkt İnceleme

Bakteriyel gastroenteritlerde dışkı örneklerinin Gram boyama ile incelenmesi önerilmemekte ancak dışkı örnekleri ilk iki saat içerisinde incelenirse anlamlı bulunmaktadır. Direkt mikroskopide bol eritosit ve nötrofillerin görülmesinde dizanterik form için yardımcı bulgu olarak değerlendirilebilir. *Campylobacter* türleri Gram boyamada oldukça ince olduklarından dolayı iyi görünmemektedir. Ancak zıt boya olarak sulu fuksin veya safranin yerine karbol fuksin veya %1'lik bazik fuksin kullanılırsa daha net görülmektedir (26,95). Dışkının kanlı mukuslu bölgelerinden alınan materyalden hazırlanan ve alkolle tespit edilen preparatlar, Gram'ın boyası veya sadece %1'lik bazik fuksin ile boyanarak; soluk pembe renkte, martı kanadı, S veya virgül şeklindeki tipik morfolojik özelliklere sahip *Campylobacter* yönünden incelenir. *Campylobacter* infeksiyonlarında, direkt mikroskopiye ait yöntemlerin duyarlılığı çalışmalarda %76-94 olarak bulunmuştur (95). Mshana ve ark. (95) 226, Wang ve ark. (96) ise 842 gastroenteritli hastaya ait dışkı örneğini *Campylobacter* yönünden Gram boyama ile incelemiş ve Gram boyama yönteminin duyarlılığını sırası ile %76 ve %89 olarak bulmuşlardır.

2.9.3. İzolasyon

Campylobacter türleri üremek için mikroaerofilik atmosfer koşullarına ihtiyaç duyar. Bu ortam anaerobik kavonazlar içinde havanın boşaltılıp yerine %5 O₂, %10 CO₂ ve %85 N₂'lik uygun gaz karışımının verilmesi yada üç gazlı inkübatörlerle sağlanır. Ticari firmalar anaerobik jarların içine yerleştirilerek uygun gaz ortamını sağlayan hazır gaz paketleri üretmişlerdir. *C. sputorum*, *C. concisus*, *C. curvus*, *C. rectus* ve *C. hyointestinalis* gibi bazı *Campylobacter* türleri üremeleri için hidrojene gereksinim duyarlar. Anaerobik jarlar %2'lik H₂ sağlayabildiklerinden bu ortam yetersiz kalır ve hidrojene ihtiyaç duyan bir türün üretilmesi için %6'lık H₂ veren anaerobik gaz kavonazları kullanılmalıdır. *C. jejuni* için 42°C'lik etüvde 48 saat tutulması gerekmektedir ancak bazı araştırmacılar bu sürenin 24 saat daha arttırılmasının izolasyon oranında artış sağladığını bildirmişlerdir (28). *Campylobacter* türleri bağırsak flora elemanlarından daha geç ve güç ürer. Bu sebeple kolay üreyerek kültür plağına hâkim

olan flora bakterilerinin kültür ortamından elimine edilmesi için örnekler ya direkt selektif besiyerine ekilmeli ya da membran filtrasyon 0,65 µm çaplı selüloz asetat filtrelerden süzöldükten sonra süzöntü 0,45-0,25 µm membran filtreden tekrar süzöldükten sonra ekim yapılmalıdır. Ancak dışkı florasında bulunan *Proteus* gibi hareketli bakterilerde filtreden kolayca geçtiğinden membran filtrasyon yöntemi ile izolasyon şansı seçici kültür yöntemine göre daha düşüktür. Ancak bu yöntemde filtreden süzölen dışkı kanlı agar yerine seçici besiyerlerine ekildiğinde yöntemin başarısı artmaktadır (97).

2.9.3.1. İzolasyonda Kullanılan Besiyerleri

Campylobacter'ler üremeleri için özel besiyeri, uygun ısı, mikroaerofilik şartlar gerektirdiğinden rutin laboratuvarlarda izolasyonu zordur. Kültür için selektif besiyerlerinden biri kullanılır ve mikroaerofil şartlarda inkübe edilir. Dışkı örneklerinden *Campylobacter* türlerinin izolasyonunu sağlayan çeşitli selektif besiyerleri geliştirilmiş ve bu besiyerleri içerisine flora bakterilerini inhibe etmek amacıyla antibiyotikli katkı maddesi eklenmektedir (97, 98).

Campylobacter'lerin dışkı ve rektal sürüntü gibi karışık floralı örneklerden izolasyonunda, Brucella Agar, Blood Agar Base No:2, Columbia Agar, Thiogycollate besiyeri, *Campylobacter* Agar Base gibi temel besiyerlerine antimikrobik kombinasyonları ve üremeyi arttırıcı çeşitli katkı maddeleri eklenerek hazırlanan seçici besiyerleri kullanılmaktadır (Çizelge 2.4.). Besiyerlerinin seçiciliğini; temel besiyerinin içeriği, ilave edilen üremeyi arttırıcı maddeler ve antimikrobik kombinasyonları belirlemektedir. İlk izolasyonlarda besiyerlerine %5-10 oranında defibrine koyun ya da at kanı ilavesi üremeyi arttırmaktadır (97,98).

Çizelge 2.4. *Campylobacter*'lerin izolasyonunda kullanılan besiyerleri (99).

Besiyeri	Baz	Eklenenler
Butzler seçici besiyeri	Sıvı tiyoglikolat besiyeri	Agar (%3), koyun kanı (%10), novobiosin, kolistin, sefalotin, aktidiyon
Skirrow besiyeri	Blood agar base No:2	At kanı (%7), vankomisin, polimiksin B, trimetoprim
Blaser besiyeri (Campy-BAP)	Blood agar base No:2 veya Brucella agar base veya Columbia agar base	Koyun kanı (%10), vankomisin, trimetoprim, polimiksin B, amfoterisin B, sefalotin,
Preston <i>Campylobacter</i> seçici besiyeri	Besleyici broth 2 %1-2 Yeni Zelanda agar	Bakteriyolojik kömür, sodyum deoksikolat, ferröz sülfat, sodyum pürivat, kazein hidrolizat, sefaperozon
Butzler besiyeri	Columbia agar base	Koyun kanı, sefaperozon,, rifampin, amfoterisin B, kolistin
Modifiye Preston besiyeri	Besleyici broth 2	%7 defibrine at kanı, sefaperozon, amfoterisin B, <i>Campylobacter</i> growth supplement
Charcoal based kansız seçici besiyeri	Columbia agar base	Aktif kömür, hematin, vankomisin, sefaperozon sikloheksimid

Dışkı örneklerinden *Campylobacter* türlerinin izolasyonunu sağlayan çeşitli selektif besiyerleri geliştirilmiş ve bu besiyerleri içerisine flora bakterilerini inhibe etmek amacıyla antibiyotikli katkı maddesi eklenmektedir (Çizelge 2.4).

- a) *Skirrow supplement*: Vankomisin, polimiksin B, trimetoprim içerir.
- b) *Butzler suplement*: Basitrasin, sikloheksimid, kolistin, sefazolin, novobiosin içerir.
- c) *Blaser suplement*: Vankomisin, polimiksin B, amfoterisin B, sefalotin içerir.
- d) *CAT suplement*: Sefaperozon, amfoterisin B, teikoplain içerir

Katkı maddeleri içerisinde yer alan antibiyotiklerden sefalosporinler (sefalotin, sefaperozon) geniş spektrumludur. *Enterobacteriaceae* ailesine ait bakterilerin ve enterokok hariç gram pozitif bakterilerin çoğuna etkilidirler. Trimethoprim ise özellikle *Proteus* ve Gram pozitif bakterilere karşı inhibitör aktivite gösterir. Ancak bakterilerde timin sentezini inhibe ederek etkisini gösteren trimethoprimin, timidin içeren

besiyerlerine etkinliği beklenenden daha düşük olmaktadır. Bu tür besiyerleri kullanıldığında, besiyerine trimethoprim sinejrik etkisi nedeni ile polimiksin B ilave edilmektedir. Besiyerlerine ilave edilen vankomisin Gram pozitiflere, rifampisin hem Gram pozitif hem Gram negatif bakterilere teicoplanin ise enterokoklara karşı etkilidir. Örneklerdeki muhtemel maya ve küf kontaminasyonuna karşı da besiyerine sikloheksimit, amfoterisin B ve nistatin, gibi antimikotiklerden birisi ilave edilmelidir (97, 98). *Campylobacter* türlerinin çoğu, besiyerine ilave edilen 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 besiyerlerinde sefalotin yerine, dışkı florasını baskılama gücü daha iyi olan Sefaperazonun kullanılması önerilmektedir. Sefaperazonun dışkının normal florasında yer alan bakterilerin çoğu için belirlenen MIC değeri ≤ 8 mg/l iken klinik örnekten izole edilen çok sayıda *C. jejuni* ve *C. coli* suşu için MIC değeri ≥ 128 mg/l'dir. Ancak, *C. upsaliensis*'in bazı suşlarının, sefaperazon için MIC değerinin ≥ 16 mg/l olduğu, bu nedenle 32 mg/l Sefaperazon içeren mCCDA gibi seçici besiyerlerinde bu *Campylobacter* türünün üremeyeceği bildirilmektedir. Diğer termofilik türlerin yanısıra *C. upsaliensis*'de izolasyonu için kullanılan, CAT (Sefaperazon, Amfoterisin B, Teicoplanin) gibi seçici besiyerine 8 mg/ml sefaperazon ilavesi önerilmektedir (100, 101). Kan içeren besiyerlerinde kontaminasyon oranının daha yüksek olması sebebi ile seçici besiyerlerine, üretme faktörü olarak mümkün ise kan yerine hematin, demir tuzu, şarkoal, sodyum metabisülfid ve sodyum prüvat, antimikrobik olarakta, pseudomonas türlerine ve enterik bakterilerin çoğuna etkili olan Sefaperazon'un ilavesi önerilmektedir. Preston yada CCDA besiyerinde kan içermeyen besiyerlerine göre *C. jejuni* izolasyonunun daha yüksek oranda gerçekleştiği gösterilmiştir (102, 103).

Campylobacter türleri oldukça narin mikroorganizmalar olduğundan bunların izolasyon oranını arttırmak için Preston, Campy-thio ve *Campylobacter* buyyon gibi zenginleştirici besiyerleri geliştirilmiştir. Fakat bu besiyerlerinin rutinde kullanılması tavsiye edilmemektedir. Bununla beraber örneğin laboratuvara ulaştırılmasında gecikme yaşanacaksa veya oda ısısında uzun süre kalacaksa ve son olarak ta Guillain-Barre Sendromu düşünölen hastalarda hastalığın akut evresinden sonra organizma sayısı az olabileceğinden zenginleştirici kültür yararlı olabilir (26, 104).

2.9.3.2. Besiyerlerine Ekim ve İnkübasyon

Toplanan dışkı örnekleri eküviyon ile selektif besiyerlerinin üst kısmına sürüldükten sonra tek kullanımlık plastik öze kullanılarak seyreltme yöntemi ile yayılır. Kültür için her örnekten birisi kanlı diğeri kan içermeyen en az iki ayrı seçici besiyerine ekim yapılması başarı şansını artırır (78). Ekim sonrası besiyerleri % 5O₂, %10 CO₂ ve %85 N₂ içeren mikroaerofil atmosferde 37°C'de inkübe edilir (78). İnsanlarda gastroenterite yol açan *Campylobacter*'lerin büyük kısmını termofilik türler oluşturmaktadır. Bu nedenle termofilik *Campylobacter*'lerin daha kolay üretilebilmeleri ve daha basit identifiye edilebilmeleri için her örnek için en az iki besiyerine ekim yapılmalı ve ikinci besiyerleri yine mikroaerofilik şartlarda 42°C'de inkübe edilmelidir (78). *Campylobacter*'lerin üremesi için gerekli mikroaerofilik atmosfer, mikroaerofilik gaz karışımı sağlayan ve ticari olarak temin edilebilen gaz jeneratörleri ile veya anaerobik kavanozların havası boşaltıldıktan sonra ilave edilecek uygun gaz karışımı ile sağlanır (78). *Campylobacter*'ler besiyerinde 24-48 saatlik inkübasyon sonunda, 0.3-0.5 mm çapında, su damlası gibi nemli, gri/beyaz renkte üreme gösteren, hemoliz yapmayan tipik kolonileri oluştururken, kömür tozu içeren besiyerinde 72-96 saatlik inkübasyon süresi sonunda 0.5 mm çapında, grimsi renkte, bazen metalik refle veren düz yüzeyli ancak yayılma eğilimi gösteren gözle görülebilir koloniler oluşturur (78).

2.9.3.3. *Campylobacter*'lerin İdentifikasyonu

Besiyerlerinde üretilen şüpheli koloniler koloni morfolojileri, mikroskopik morfolojik özellikleri, oksidaz ve katalaz aktiviteleri, ısı, tuz ve glisin tolerans testleri, antimikrobik duyarlılık paternleri ile hippuratu hidrolize edebilme özelliklerini göre identifiye edilirler (78). Uygun inkübasyon süresinde 42°C'de seçici besiyerinde mikroaerofilik koşullarda üreyen oksidaz pozitif Gram negatif, kıvrık veya "S" şeklinde basiller *Campylobacter* spp. olarak tanımlanabilir. Bundan sonra sadece hippurat hidroliz testi uygulanır (28). Hippurat hidroliz testi (N.benzoyl glycine amido hidrolase testi) bakterilerdeki hippurikaz enzimi yardımıyla sodyum hippuratın parçalanarak (hidrolizi ile) benzoik asit ve glisine dönüşümünü ve ninhidrin ayırıcı yardımıyla benzoik asitin renk değişiminin sağlanması prensibine dayanmaktadır (105). Düşük

hippurikaz aktivitesinin bu testte belirlenememesi ve ekilen bakteri yoğunluğunun yöntemin duyarlılığını etkilemesi bu testin dezavantajı olarak gösterilmektedir. PZR yöntemi ile hippurikaz enzimini kodlayan geni (*hipO*) saptanabilmektedir (105). *C. jejuni* ve *C. coli*'nin fenotipik özellikleri birbirine benzemekte hippuraz aktiviteleri bulunmamakta ve bu iki türü kesin olarak ayırtedebilmek için moleküler testler yapmak gerekmektedir (28).

2.9.3.4. Dışkıda Antijen Arayan Testler

Dışkıda *Campylobacter* antijenlerini araştıran presipitasyon temelli ticari testler geliştirilmiştir. *Campylobacter* EIA testinde direkt dışkı örneklerinin yanısıra zenginleştirici besiyerindeki dışkı örneklerinin de değerlendirilebilmekte, bu testte *Campylobacter*'lerin iki yüzey antijenine karşı geliştirilmiş poliklonal antikolar kullanılmaktadır (106). Meritec Campy testinde ise latex partiküllerinin sensitizasyonunda flagellar antijene karşı geliştirilmiş antikolar kullanılmaktadır. Campyslide testi ile dışkı örneklerinden antijen tespitinde, *Campylobacter*'lerin hücre duvar antijenlerine karşı üretilmiş antikolar ile kaplı lateks partikülleri kullanılmaktadır (106, 107).

2.9.3.5. Moleküler Yöntemler

Dışkı örneklerinden kültür metodu ile *Campylobacter*'lerin tanımlanması ve tür düzeyinde identifikasyon için yapılacak fenotipik testler zaman alıcı olması yanında üremeleri için özel koşul gerektirmeleri ve fenotipik değişime açık olmalarından dolayı bir takım dezavantajlara sahiptir (108). Bu olumsuzluklar açısından tanıda alternatif yöntem olarak moleküler teknikler kullanılmıştır (108). Moleküler teknikler içinde Nükleik Asit Çoğaltma yöntemini (NAA) baz alan, PZR/Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), multipleks-PZR, AFLP, PZR-hibridizasyon yöntemleri ile DNA dizi analizi ve mikroarray gibi modifiye moleküler yöntemler kullanılmaktadır (109). RFLP, farklı suşların DNA'larının PZR ile amplifikasyonunu sonrası restriksiyon

enzimleriyle muamele edilmesi ve agaroz jelde elektroforez uygulanarak bant görünümlerindeki farklılıkların ortaya konulmasını amaçlayan bir yöntemdir. RFLP metodu, uygulanması ve yorumlanması kolay olan, yaklaşık bir gün gibi bir sürede sonuç veren bir metot olarak birçok mikroorganizmanın ayırımına olanak tanımıştır . *Campylobacter* türlerinin PZR-RFLP analizi için hedef olarak en sık tercih edilen gen bölgesi flagelladır. *Campylobacter*'lerin flagellası yüksek homolojiye sahip *flaA* ve *flaB* adı verilen iki gen bölgesi içerir. Her iki bölgenin de korunan ve değişken bölgeleri mevcut olduğu için, bu bölgeler PZR ürünlerinin RFLP analizi için uygundur (31, 97). *Campylobacter*'deki *flaA* geni, önemli bir sekans heterojenitesi gösterir ve dolayısıyla moleküler analizler için iyi bir epidemiyolojik marker olarak kullanılır. *C. jejuni* ve *C. coli* *flaA* genlerindeki korunma bölgeleri diğer *Campylobacter* türlerinde de kısmen bulunduğu için *C. jejuni* ve *C. coli*'nin tiplendirilmesi için geliştirilen primerler diğer *Campylobacter* türlerinin tiplendirilmesinde de kullanılmaktadır (31, 97). *Campylobacter* türlerinin moleküler epidemiyolojisinde kullanılan bir başka yöntemde, Random amplified polymorphic DNA typing (RAPD-DNA) yöntemidir. RAPD yönteminde bilinen özgül bir DNA bölgesini çoğaltmak yerine randomize edilen bir veya daha fazla primerle DNA'daki birçok bölgenin çoğaltılması gerçekleştirilmektedir. İzolatların büyük bir çoğunluğunu araştırmak ve tiplendirmek amacı ile kullanılan etkili, basit ve ucuz tekniklerden biri olan RAPD yöntemi, bakteriyel genomun tamamındaki polimorfizmi araştırmaya uygun olduğundan, *Campylobacter* ve diğer çok sayıda bakterinin moleküler tiplendirilmesi için sıklıkla kullanılmış ve ayırım gücünün oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (97). *Campylobacter* türlerinin RAPD ile tiplendirilmesinde en sık kullanılan primerin OPA-11 olduğu rapor edilmiştir. Uygulama kolaylığı ve kısa sürede sonuç verebilme açısından geniş kullanım alanı bulan bu yöntemin en önemli dezavantajı henüz standardizasyonun sağlanamamış olmasıdır. Laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik oranı düşüktür (31, 97). Epidemiyolojik araştırmalarda kullanılan bir başka yöntemde ribotiplendirme rRNA genlerinin restriksiyon (RFLP) analizine dayalı bir yöntem olan ribotiplendirme yöntemi taksonomik ve yoğun olarak kullanılmıştır. *Campylobacter* kromozomları üzerinde rRNA gen bölgesinin çeşitli kopyaları (16S ve 23S rRNA) farklı pozisyonlarda bulunmaktadır. rRNA genindeki bölgelerin korunması ve bağlanma bölgelerinin yüksek oranda değişkenlik göstermesinden dolayı bu genler alt tiplendirme amaçları için uygun

hedeflerdir (31, 97). Ribozomal genler esas alınarak yapılan genotiplendirme için en uygun teknik, rRNA genleri için spesifik bir prob ile Northern blot hibridizasyonunu takip eden kesilmiş genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezidir. Genel olarak ribotiplendirmenin fenotipik olarak analizi zor olan *Campylobacter* türlerini tiplendirmede çok faydalı olduğu bildirilmiştir (31, 97). Ribotiplendirmede kromozomları kesmek amacıyla kullanılan restriksiyon enzimleri farklılıklar göstermektedir. *Pst*I, *Hae*III, *Hind*III ve *Pvu*II tek başlarına, çift ya da bazen üç enzimi içeren kombinasyonlar halinde kullanılabilir (31). Bu metod, nispeten düşük ayırım gücü ve uygulama zorluğu nedeni ile rutin genotiplendirme için uygun değildir. Ayrıca ribotiplendirmenin yüksek maliyeti ve kompleks yapısı bu metodun kullanılmasını azaltan diğer sebeplerdir (31). Moleküler epidemiyolojik çalışmalarda filogenetik ilişkiyi de ortaya koyan en uygun yöntemler arasında yer alan Multilocus sequence typing (MLST) diğer yöntemlere göre biraz pahalı olsa da son yıllarda giderek rağbet görmektedir. Bu yöntemde, bütün *Campylobacter*'lerde bulunan ve protein kodlayan genlerin birkaç tanesinin belli bölgelerinin dizi analizi yapılmakta ve internet üzerinde karşılaştırmaların yapılabileceği kısmen standardize edilmiş bir veri tabanı bulunmaktadır (31). *Campylobacter*'de MLST için hedef olarak kullanılan protein kodlayan genler; sitrat sentaz (*glt* A), ATP sentaz (*unc* A) aspartaz (*asp* A), serin hidroksimetil transferaz (*gly* A), glutamin sentetaz (*gln* A), fosfoglutamaz (*pgm*) ve transketolaz (*tkt*) olarak sıralanmaktadır. MLST, *Campylobacter* türlerini de içeren birçok bakterinin tiplendirilmesi için sıklıkla kullanılmıştır (31). Moleküler tiplendirme metotları birbirleri ile kıyaslandıklarında birçok avantajları ve dezavantajları mevcuttur. İyi bir tiplendirme metodunun kompleks olmaması, tekrarlanabilirliğinin yüksek olması, kısa sürede sonuç alınması, ucuz olması ve uygulanmasının kolay olması gerekir (31). MLST ve PFGE gibi yöntemlerin ayırım güçleri oldukça yüksek olmasına rağmen, kompleks olduklarından bu teknikler rutin kullanım için pratik değildir. Bu amaçla diğer metotlarla karşılaştırıldığında ucuz ve uygulanabilirliği kolay olan RFLP ve RAPD teknikleri araştırmacılar tarafından *Campylobacter*'lerin tiplendirilmesinde çok daha sıklıkla kullanılmaktadır (31, 97).

2.9.3.6. Serolojik Yöntemler

Campylobacter enteritine yanıt olarak akut infeksiyonu takiben hastaların immünglobulin düzeyleri ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ile araştırıldığında bütün antikor sınıflarında (IgG, IgA, IgM) artış gözleendiği bildirilmiştir. Ayrıca hastalarda akut infeksiyon geçtikten sonra antikor seviyesinin eski seviyesine dönmediği ve hastaların %9'unda 20 ay geçtiği halde antikor titre yüksekliğin devam ettiği gözlenmiştir (110, 111).

Serolojik yöntemlerin kullanılan antijen veya seropozitiflik kriterlerinin, tam anlamıyla standardize edilememesi nedeniyle rutin tanıdan çok epidemiyolojik çalışmalarda kullanılması önerilmektedir (28).

2.10. Epidemiyoloji

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde yapılan çalışmalarda *Campylobacter* enteritinin gerçek insidansı hakkında farklı sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Genel olarak gelişmekte olan ülkelerde ulusal *Campylobacter* sörveyans programı yoktur. Bu da insidans oranı açısından sağlıklı verilere ulaşmayı imkânsız hale getirmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde insidans verileri, laboratuvar tabanlı sörveyans çalışmalarından elde edilmektedir (112). Gelişmiş ülkelerde veriler gelişmemiş ülkelere göre daha güvenilir bulunmaktadır. Centers for Disease Control and Prevention (CDC)'nin 2010 Mart ayında yayınladığı raporda ABD'de 2007 yılında gıda kaynaklı 1907 salgın meydana gelmiş ve bu salgınlara bağlı 18 ölüm vakası bildirilmiştir. CDC verilerine göre *Campylobacter*'ler bu salgınlara bağlı 4'ünden sorumlu ajan olmuştur (113).

CDC laboratuvar onaylı 18.499 gıda kaynaklı infeksiyonda izole edilen etkenlerin sırası ile *Salmonella spp* 7,444 (%16.20), *Campylobacter spp.* 5,825 (%12.68) ve *Shigella spp.* için 3,029 (%6.59) olarak bildirmiştir. *Campylobacter*'lere bağlı infeksiyonların *Salmonella* infeksiyonlarından daha düşük olduğu gözlenmiştir (114). ABD'de her yıl 76 milyon kişi gıda kaynaklı infeksiyon geçirmekte bunların 325.000'i yatarak tedavi görmekte ve 5000 ölüm vakası gözlenmektedir. Bu

infeksiyonlar ABD'ne yıllık maliyeti 10-83 milyon dolardır. FoodNet raporlarına göre gıda kaynaklı bu infeksiyonlarda izole edilen başlıca patojenler *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., ve *Cryptosporidium* spp.'dir (115).

İspanya'da yapılan bir çalışmada beş yaş altı çocuklarda görülen enteritlerde etken olarak *Campylobacter*'lerin Rotavirüs ve *Salmonella* spp.'den sonra üçüncü sıklıkla görüldüğü belirlenmiştir. Bu çalışmada *Salmonella* spp.'ye bağlı enteritlerin özellikle beş yaştan itibaren tüm yaşlarda gözlenirken *Campylobacter*'lere bağlı enteritlerin ise bir yaş ve üzerinde olduğu tespit edilmiştir (116).

Sadkowsa ve ark. (117). Polonya'da yaptıkları çalışmada 2008 yılında toplam 270 *Campylobacter* vakası tespit edilmiş ve bunların %57'sinin hospitalize edildiği bildirilmiştir.

Avusturalya'da 2007 yılında gıda kaynaklı 27,232 infeksiyon vakası gözlenmiş ve bu vakaların 16,984'ünde *Campylobacter* spp., 9,484'ünde *Salmonella* spp. tespit edilmiştir (118).

İngiltere'de yapılan bir araştırmada 1990-2007 yılları arasında 838,436 *Campylobacter* vakası rapor edilmiştir (119).

Ülkemizde *Campylobacter* infeksiyonlarının görülme sıklığı ile ilgili 1986-2005 yılları arasında yapılan çalışmalara göre *Campylobacter* türlerinin izolasyon oranının %0.61 ile %14.6 arasında bildirilmektedir (120). *Campylobacter* nedenli infeksiyonlar genelde sporadik olarak görülmekle birlikte zaman zaman önemli salgınlar da meydana getirebilmektedir (120).

Campylobacter'lerle oluşan infeksiyonun epidemiyolojik özellikleri gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde farklılıklar göstermektedir. İnfeksiyon insidansı gelişmiş ülkelerde üç ayrı yaş gurubunda artış gösterir. İlk artış bir yaş altı bebeklik döneminde, ikinci artış 15-29 yaş arası gençlik döneminde son artışta 60 yaş ve üzerindekilerde görülmektedir (120). Erken çocukluk döneminde gastroenterit ve GBS'na, 60 yaş ve üzerinde de ciddi dehidratasyona bağlı olarak klinik daha ağır seyretmektedir. Gelişmekte olan ülkelerin aksine gelişmiş ülkelerde asemptomatik taşıyıcılık oranı oldukça düşüktür (121).

Gelişmekte olan ülkelerde *Campylobacter*'lerle ilişkili infeksiyonlar hayatın ilk beş yılında gözlenmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde, çocukların toprakla erken yaşta teması, çocukluk çağında hastalığa karşı özgül bağışıklığın gelişmesine böylece

toplumdaki asemptomatik taşıyıcıların sayısının fazlalığına yol açmakta, ileri yaşlardaki enfeksiyonlar da daha selim seyretmektedir. Bu ülkelerde hayatın ilk yıllarında asemptomatik taşıyıcılık görülen çocuklar, dışkıları ile bol miktarda *Campylobacter* çıkarmaktadır (122, 123).

Gelişmekte olan ülkelerde *Campylobacter* enteritli hastalarda diğer enterik patojenlerde birliktelik tespit edilmiştir. Hastaların bir kısmında *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *G. lamblia* ve rotavirüsler ile birliktelik görülmüştür. Bu şekilde polimikrobiyal enfeksiyonlar gelişmiş ülkelerde oldukça nadirdir (124).

Jensen ve ark. (125) yaptıkları bir çalışmada çocuk hastalara ait 289 dışkı örneğinde *Ascaris lumbricoides*, *Campylobacter* spp., *Giardia duodenalis*, *Entamoeba histolytica*/*E. dispar* ve *Trichuris trichiura* sırası ile %55,1, %30,8, %21,5, %19,8 ve %19,4 oranında saptanmış ve bu hastaların %43'ünde multi enfeksiyon gözlenmiştir.

Campylobacter enfeksiyonlarının görülme sıklığı mevsimsel olarak da gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde farklılık göstermektedir. *Campylobacter* gastroenteritleri gelişmekte olan ülkelerde yıl boyu görülebilmekte, gelişmiş ülkelerde ise yaz ayları ve sonbahar başlarında daha sık gözlenmektedir (126).

Campylobacter enfeksiyonları yaz aylarında daha sık görülmekte ve bu artışın nedeni olarak *Campylobacter*'lerin iklim şartlarına uyumu, bu aylardaki beslenme alışkanlıkları, göçmen kuşların su ve yiyecek kaynaklarını kontamine etmesi ve yapılan turistik seyahatler gösterilmiştir (127).

Kanada'da 2007 yılında *Campylobacter*'lerle ilgili en büyük salgın bildirilmiştir. Bisiklet yarışçılarında görülen bu salgında 225 vakada görülen enterit vakalarından *C. jejuni* sorumlu tutulmuş ve bulaş kaynağı olarak kontamine sular gösterilmiştir (128).

2.11. Korunma

Campylobacter gastroenteritinden korunma tedbirleri temel olarak çiftlikte, hayvanın kesimi ve işlenmesi sırasında, mutfakta hazırlanması aşamasında ve kişisel olarak alınan tedbirler şeklindedir. Çiftlikteki tedbirler hayvan sağlığının veteriner hekim kontrolünde yürütülmesi ve buldukları yerin temizliği, havalandırması gibi

tedbileri içermektedir. Bundan sonraki ve *Campylobacter* enteritini önlemede en önemli basamak hayvanın kesimi ve işlenmesi sırasında yapılmalıdır (60).

Gelişmiş ülkelerde tavuk ürünlerinin çoğu kontamine olduğu için hayvan kaynaklı besinler (özellikle kümes hayvanları) çok iyi yıkanmalı ve iyice pişirildikten sonra tüketilmelidir. Kesimlik tavuklara probiyotik verilerek patojenlerin kontaminasyonu engellenmektedir. *Lactobacillus acidophilus* ve *Streptococcus faecium* gibi probiyotikler kullanılarak kontaminasyonun %70 azaldığı bildirilmektedir. Vahşi ve evcil pek çok hayvanın barsak florasında bulunduğu için bakterinin tamamen eliminasyonu imkansızdır. Meydana gelecek infeksiyon sayısını azaltmak için süt ve süt ürünlerinin pastörizasyonuna dikkat edilmeli, sular klorlanmalı, kişisel hijyen kurallarına dikkat edilmeli, hayvan ve hayvan ürünleriyle temastan sonra eller yıkanmalıdır (129). Etin işlenmesi sırasında tüm basamaklarda genel hijyen kurallarına uyulmalı ve iyi bir sanitasyon uygulanmalıdır. Et kullanılıncaya kadar mutlaka buzdolabında tutulmalı ve pişirirken tavuk etinin iç sıcaklığının 74°C'ye diğer etlerin ise 71°C'ye çıkarılmasına özen gösterilmelidir (9). İnsandan insana bulaşma çok nadir olduğundan gıda işi ile uğraşanlarda *Campylobacter* enteriti tespit edilirse hastalığının tam iyileşene kadar gıda işi ile ilgilenmesine izin verilmez (129). Bireysel olarak yapılabilecek en önemli korunma tedbiri el yıkamadır. İnfeksiyonun gelişmesini önlemek için rutin antimikrobiyal kullanımı önerilmemektedir (129).

Anne sütü ile beslenme bebekleri özellikle hayatın ilk yılında *C. jejuni* gastroenteritlerinden korumaktadır. *Campylobacter* yüzey antijenlerine karşı sekretuar IgA antikor titresini kolostrumda en yüksek orandadır ve tüm laktasyon boyunca devam eder. *C. jejuni*'ye bağlı gastroenterit oranı anne sütü ile beslenmeyen bebeklerde beslenenlere göre daha fazla oranda görülmektedir (130).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan araç ve gereçler kullanılarak yapılmıştır. Diğer kimyasal maddeler ve sarf malzemeleri, BAP-SBE TM (ÇY) 2008–9 DR nolu projeden sağlanan maddi imkanlarla sağlanmıştır.

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- Etüv (Nüve EN 500, Türkiye)
- Biyogüvenlik kabini (Nuaire NU 425-300E Class II, ABD)
- Hassas terazi (Sartorius BL310, Almanya)
- Distile su cihazı (Millipore, Fransa)
- Soğutmalı mikrosantrifüj (Hettich- Micro 200R, Avusturalya)
- Midi santrifüj (Avusturalya)
- Vortex (Nüve NM- 110, Türkiye)
- Sıcak su banyosu (Nüve BM 402, Türkiye)
- -80°C'lik Derin dondurucu (Heto, Çin)
- +4°C'lik soğutucu (Ariston, Türkiye)
- Otoklav (Hirayama- HA-300 M4, Japonya)
- Pasteur fırını (Memmert UE 500, İngiltere)
- Elektrik ocağı (Beko, 0.710, Türkiye)
- Işık mikroskobu (Olympus, Japonya)
- pH metre (Hanna, İtalya)
- Mikrodalga Fırın (Beko- MD 1500, Türkiye)
- Mikropipet Seti (Biohit, Proline 0,5 µL-1000 µL, Finlandiya))

- PZR cihazı (Thermal Cyclers, Eppendorf Mastercycler, Almanya)
- Elektroforez Tankı (Agagel Mini Biometra, Almanya)
- Elektroforez Güç Kaynağı (Biometra P30, Almanya)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallée, Fransa)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- Tris-hidroklorid (Sigma, T-5941, Lot 31 K5466)
- Etilen diamin tetra asetik asit disodyum salt dihydrate (EDTA) (Sigma, E5134)
- Sodyum dodezil sülfat (SDS) (Merck, L51736210)
- Magnezyum klorid (MgCl₂) (Promega, A351H)
- Tris-baz (Sigma-Aldrich-T8937)
- Borik asit (Merck K29935665 204)
- Brom fenol mavisi (SCP Science B7722)
- Etanol absolut (Riedel de Haën/ Lot 32221)
- Sükroz (Merck 1.07651)
- Fenol kristalleri (Sigma P-1039, USA)
- Kloroform (Merck)
- Agaroz (Sigma, A-5093)
- Taq DNA Polimeraz (Promega M1665)
- 10X PCR Buffer (Mg Free) (Promega M190G)
- 5 mM MgCl₂ (Promega A351H)
- 10 mM dNTP Mix (Sigma Deoxynucleotide set DNTP-100)
- Proteinaz K (Sigma P 2308 lot 065 K8603) 100 baz çiftlik (bç) Marker (100 bp DNA Step Ladder) (Promega G6951)
- Carry-Blair besiyeri
- Modifiye *Campylobacter* Blood-Free Selective Agar (Merck, VM830670716)
- %95'lik etil alkol (Sigma E-285 USA)

- H₂O₂ (Sigma H6520 USA)
- Gliserol (Sigma G516 USA)
- Aseton (Merck 1.00014.2500)
- Sodyum hippurat (C₉H₈NNaO₃)
- Butanol (Merck 1.01990.2500)
- Ninhidrin (Merck 1.06762)
- DNase, RNase Free Su
- Restriksiyon enzimleri
 - *Alu I* Restriction enzimi (Promega R6281)
 - *Tsp 509I* restriksiyon enzimi (Bio Labs, No:R5076L)
- Primerler
 - THERM: TAT TCC AAT ACC AAC ATT AGT
 - THERM4: CTT CGC TAA TGC TAA CCC

3.1.3. Kullanılan Standart Suş

Refik Saydam Hıfzıssıhha başkanlığından temin edilmiş olan *C. jejuni* 06044 RSKK kullanılmıştır.

3.2. Besiyerleri, Ayıraçlar ve Katkı Maddelerinin Hazırlanması

3.2.1. Mikroaerofilik ortam

Mikroaerofilik ortam için 2,5 litrelik anaerob jarlarının içine Campy-Gen (Oxoid Hampshire, İngiltere) gaz paketleri (%5 O₂, %10 CO₂ ve %85 N₂) kullanılarak sağlandı (131).

3.2.2. Besiyerleri

Çalışmada *Campylobacter* türlerinin izolasyonu için taşıma ve üretme amaçlı olmak üzere iki farklı grup besiyeri kullanıldı.

3.2.2.1. Taşıma Besiyerleri

Örneklerin taşınmasında Modifiye Carry-Blair besiyeri kullanıldı.

3.2.2.1.1. Modifiye Carry-Blair Besiyeri

Sodyum tioglikolat	1,5 gr
Na ₂ HPO ₄	1,1 gr
NaCl	5 gr
Agar	1,6 gr
Distile su	991 ml
pH	7,4

Balon içerisinde maddeler sıcak su banyosunda ısıtılarak eritildi, pH 7,4'e ayarlanıp içerisinde tahta çubuklu pamuklu eküvyon bulunan steril cam tüplere, herbirinde 7 ml besiyeri olacak şekilde paylaştırıldı ve otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi. Kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı (131).

3.2.2.2. Üretim Besiyerleri

3.2.2.2.1. Modifiye *Campylobacter* Blood-Free Selective Agar = Modified Charcoal Cefoperazon Deoxycholate Agar (mCCDA)

Besiyeri Modifiye *Campylobacter* Blood-Free Selective Agar (mCCDA) içerisine antibiyotik kombinasyonlarından oluşan selektif supplementin ilavesi hazırlandı. Ticari olarak temin edilen mCCDA besiyerinden 22,75 gr. tartılarak 500 ml distile su içerisinde, benmaride homojen hale gelinceye kadar eritildi ve otoklavda 120°C’de 15 dakika bekletilerek steril edildi. Oda ısısında soğumaya bırakılan besiyeri ısısı 40-42°C’ye gelince 16 mg sefaperazon, 5 mg amfoterisin B içeren ve 2 ml steril distile su içerisinde çözülerek kullanıma hazır hale getirilen 1 şişe CCDA selektif supplementi (Merck 1.00071.0001) besiyerine eklendi. Steril petri kutularına 20 ml miktarında dökülen besiyerleri, kullanılıncaya kadar +4°C ‘de saklandı. Besiyerleri döküldükten sonra birkaç tanesi etüvde 37°C’de 24 saat bekletilerek kontaminasyon kontrolü yapıldı ve +4°C’de saklandı (131).

3.2.2.2.2. Sefaperazon, Amfoterisin B, Teikoplanin (CAT) Suplementli mCCDA Besiyeri

Besiyeri Modifiye *Campylobacter* Blood-Free Selective Agar (mCCDA) içerisine antibiyotik kombinasyonlarından oluşan selektif supplementin ilavesi hazırlandı. Ticari olarak temin edilen mCCDA besiyerinden 22,75 gr. tartılarak 500 ml distile su içerisinde, benmaride homojen hale gelinceye kadar eritildi ve otoklavda 120°C’de 15 dakika bekletilerek steril edildi. Oda ısısında soğumaya bırakılan besiyeri ısısı 40-42°C’ye gelince içerisine her biri ayrı ayrı olarak tartılıp 2 ml steril distile su içerisinde eritilmiş olan 4 mg Sefaperazon, 5mg Amfoterisin ve 2 mg Teikoplanin otoklavdan çıkmış olan ve oda ısısında soğumuş olan besiyerine eklendi.

Hazırlanan besiyeri önceden sterilize edilmiş olan petri kaplarına 20 ml olacak şekilde döküldü. Besiyeri dökülen petri kapları oda ısısında katılaşmaya bırakıldı daha sonra kullanılıncaya kadar +4°C'de buzdolabında saklanmıştır (131).

3.3. Ayıraçların Hazırlanması

3.3.1. Sodyum Hippurat Solüsyonu

Toz halindeki 1 gr sodyum hippuratın 100 ml distile suda eritilmesi ile hazırlanan solüsyon, 0,4 ml lik tüplere dağıtıldı ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı (131).

3.3.2. Ninhidrin Ayırıcının Hazırlanışı

50 ml aseton ve 50 ml butanol içeren karışıma 3,5 gr ninhidrin ayırıcı eklendi ve kullanılıncaya kadar karanlıkta, oda ısısında saklandı (131). Test, bakterilerdeki hippurikaz enziminin sodyum hippuratu parçalayarak (hidrolizi ile) benzoik asit ve glisine dönüştürmesi ve ninhidrin ayırıcı yardımıyla açığa çıkan benzoik asitin renk değişiminin gösterilmesi prensibine dayanmaktadır.

3.3.3. Oksidaz Ayırıcı

50 gr tetramethyl-p-phenylenediamine 10 ml distile suya ilavesi ile hazırlanan ayıraç, ışık geçirmeyen kapaklı cam şişelere koyuldu ve kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı (131).

3.3.4. Katalaz Ayıracı

% 3'lük hidrojen peroksit kullanılmadan önce taze olarak hazırlandı (131).

3.3.5. Triple Sugar Iron Agar (TSI)

Kuru toz halinde ticari olarak temin edilen TSI agar (Merck 1.03915)'dan 32,5 gr alınarak 500 ml distile su içerisine konuldu ve agar tamamen eriyinceye kadar benmaride kaynatıldı. Daha sonra 40-45°C'ye kadar soğutularak pH'sı ayarlanan besiyeri otoklavda 121°C'de 15 dakika bekletilerek steril edildi. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra 50°C'ye kadar soğutulan besiyeri 8 ml hacimlerde steril cam tüplere paylaştırıldı. Tüpler dipte 3 cm'lik bir dik kısım ve üstte bir yatık kısım kalacak şekilde yatık tutularak katılaşmaya bırakıldı. Daha sonra kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı (131).

3.4. Yöntem

3.4.1. Çalışma Grubunu Oluşturan Örnekler

Yaşları 0-14 arasında olan ve günde üç yada daha fazla sayıda şekilsiz dışkılama şikayeti ile başvuran hastalar çalışmaya alındı. İshal şikayeti 14 günden uzun süren ve son bir hafta içinde antibiyotik kullanma öyküsü olan hastalar çalışma dışı bırakıldı. Çalışmada hasta ve/veya hasta yakınları ile görüşülerek hastaların başvuru şikayetleri, gastroenteritin süresi, günlük dışkılama sayısı, ateş, kusma, karın ağrısı yakınmaları, yaşadıkları yer, sosyo ekonomik düzeyleri, tavuk eti yeme öyküsü sorgulanıp önceden hazırlanmış forma kaydedildi (Ek 1). Çalışmaya üç katı dışkı örneği klinisyenlerin Campylobacter enfeksiyonu şüphesi nedeni ile dahil edildi.

3.4.2. Örneklerin Toplanması

Örnekler 01 Ekim 2008-30 Eylül 2009 tarihleri arasında (bir yıllık periyotta) Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'ndan (163) ve Sağlık Bakanlığı Mersin Kadın Doğum ve Çocuk Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan (374) dışkı kültürü istenmiş hastalardan alınmıştır (toplam 537 dışkı örneği). Her hastadan, birisi steril eküvyon yardımı ile steril ependorf tüplerine yaklaşık 1 gr, diğeri de Modifiye Carry-Blair besiyeri içerisine eküvyon yardımı ile toplam iki dışkı örneği alındı. Transport kaplarına alınan örnekler buz kalıpları arasında en geç iki saat içerisinde Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'na taşındı.

3.4.3. Dışkının Makroskopik İncelemesi

Dışkı örneklerinin sulu, kanlı, mukuslu olup olmadıklarına bakıldı.

3.4.4. Dışkının Direkt Mikroskopisi

Dışkı mukuslu ise mukuslu kısmından, mukussuz ise sıvı kısmından bir-iki öze miktarı kadar alınarak temiz bir lam üzerine damlatılan bir damla serum fizyolojik ile süspane edilip üzerine lamel kapatılarak Işık mikroskopunda X 40'luk büyütmede incelendi.

3.5. Kültür

3.5.1. Dışkı Örneklerinin Seçici Besiyerlerine Ekimi ve İnkübasyonu

Cary-Blair taşıma besiyerine alınan dışkı örnekleri, her bir besiyerinden iki petri kutusuna olmak üzere, mCCDA ve CAT supplementli CCDA besiyerlerine tek kullanımlık plastik öze kullanılarak tek koloni düşecek şekilde ekildi. Dışkı örneklerinin klasik kültür yöntemi ile incelenmesinde *Campylobacter*'ler dışında *Salmonella* ve *Shigella* türleride bakıldı. Besiyeri plakları *Campylobacter*'ler için anaerobik jar içerisine, %10 CO₂, %5 H₂ ve %85 N₂'den oluşan mikroaerofilik atmosfer oluşturan, kullanıma hazır, gaz üreten iyon zarfı (*Campylobacter* System) ile birlikte yerleştirildi. Ekim yapılan besiyerlerinden birisi 42°C diğeri 37°C de inkübe edildi. Ekim yapılan plaklarının tamamı, 48-72 saat süren inkübasyonun ardından *Campylobacter* üremesi yönünden değerlendirildi. Üremenin olmadığı plaklar tekrar kapatıldı ve her gün üreme yönünden kontrol edilerek beş gün süre ile inkübasyona devam edildi. Bu sürenin sonunda üreme görülmeyen plaklar atıldı (28).

Çalışmada kalite kontrol suşu olarak Refik Saydam Hıfzıssıhha başkanlığından temin edilen *C. jejuni* 066044 RSKK suşu kullanıldı.

3.5.2. Ekimlerin Değerlendirilmesi

3.5.2.1. *Campylobacter* Suşlarının İdentifikasyonu

mCCDA ve CAT besiyerinde, 0.5 mm çapında, grimsi renkte, düz yüzeyli ancak yayılma eğilimi gösteren koloniler *Campylobacter* yönünden şüpheli kabul edilerek oksidaz ve katalaz testi uygulandı. Her iki test reaksiyonu pozitif bulunan kolonilerden hazırlanan yayma preparasyonlar, Gram boyama ile boyandı ve ışık mikroskopunda X 100 büyütmede incelendi. Gram boyamada sulu fuksin basamağı olan zıt boyamada bakterinin daha iyi görülebilmesi için bu boya yerine karbol fuksin kullanıldı. Mikroskopta Gram negatif, kıvrımlı veya virgül şeklinde görülen koloniler

Campylobacter ön tanısı ile ileri identifikasyon çalışmaları için saf olarak elde edilmek üzere seçici besiyerine pasajlandı. Besiyeri yüzeyinde pasajda saf olarak üreyen koloniler öze ile toplanarak, 23Sr RNA PZR-RFLP yöntemi genotipik tanımlama ve antimikrobiyal duyarlılık testlerinin yapılması için %15'lik gliserollü besiyerine 3-4 McFarland bulanıklılık derecesi olacak şekilde ekilerek -80°C'de saklandı (131).

Besiyeri üzerinde geri kalan *Campylobacter* kolonileri fenotipik identifikasyon amacı ile oksidaz ve katalaz aktivitelerine ek olarak, sülfürlü bileşikleri kullanabilme yeteneğinin tespiti için, TSI Agar' da H₂S oluşumu, hippurik asidi hidrolize edebilme yeteneğinin tespiti için, hippurat hidrolizi, seçici antibiyotiklere duyarlılıklarının tespiti içinde disk diffüzyon yöntemi ile nalidiksik asit ve sefalotin dirençliliği yönünden değerlendirildi (131).

3.5.2.2. Oksidaz Testi

Tetramethyl-p-phenylenediamine distile suya ilavesi ile hazırlanan ayraç, ışık geçirmeyen kapaklı cam şişelere koyuldu ve kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı. Önceden bantlar halinde kesilip, steril edilmiş filtre kağıtları temiz lamın üzerine konuldu. Filtre kağıdının üzerine 2-3 damla oksidaz ayırıcı damlatıldı. Besiyerinden plastik öze yardımı ile alınan şüpheli koloni, filtre kağıdı üzerindeki ayırıcın damlatıldığı bölgeye sürüldü. Filtre kağıdındaki sürüntü bölgesinde 5-15 saniye içinde mor renk oluşumunun gözlenmesi halinde oksidaz testi pozitif olarak kabul edildi. Filtre kağıdı kullanılırken besiyerinde glukoz veya boya bulunabileceğinden bu özenin besiyerine değdirilmemesine özen gösterildi (131).

3.5.2.3. Katalaz Testi

Kullanımdan önce taze olarak hazırlanan %3'lük hidrojen peroksitten bir lam üzerine 1-2 damla konuldu. Şüpheli koloni öze yardımı ile alınarak hidrojen peroksite karıştırıldı. Gaz kabarcıklarının oluşumunun gözlenmesi halinde test pozitif kabul edildi (131).

3.5.2.4. Hippurat Hidroliz Testi

Test, bakterilerdeki hippurikaz enziminin sodyum hippuratu parçalayarak (hidrolizi ile) benzoik asit ve glisine dönüştürmesi ve ninhidrin ayırıcı yardımıyla açığa çıkan benzoik asitin renk değişiminin gösterilmesi prensibine dayanmaktadır. Test için gerekli olan sodyum Hippurat solüsyonu ve Ninhidrin ayırıcı önceden hazırlandı ve önerilen ısıda saklandı. Test yapılmadan önce tüplere konulmuş 400 µl'lik sodyum hippurat solüsyonları oda ısısında çözünmesi için beklendi. *C. jejuni* olduğu düşünülen mikroorganizmanın saf kolonilerinden 3 McFarland standardında bu tüplere ekim yapıldı ve 37°C'de iki saat inkübe edildi. İki saatlik inkübasyondan sonra 0,2 ml damla ninhidrin ayırıcı eklendi. Daha sonra 30 dakika tekrar inkübe edildi. Örnekler 10 dakikada bir kontrol edildiğinde yüzeyde mor bir halka oluşumu gözlemlendiğinde, tepkime olumlu kabul edildi. Otuz dakikalık inkübasyona rağmen renk değişiminin çok az veya olmadığı örnekler olumsuz olarak değerlendirildi. Ninhidrin, proteini tespit ettiğinden sodyum hippurat test tüpüne bakteri süspansiyonundan başka hiçbir madde ilave edilmedi (101).

3.5.2.5. Sefalotin Duyarlılık Testi

C. jejuni ve *C. coli* suşları rutin tanıda dirençli olarak kabul edilirler. Selektif besiyerinde üreyen, *Campylobacter* tanımlı kolonilerden bir öze dolusu alınarak serum fizyolojik içerisinde 0,5 Mc Farland bulanıklık standardına eşdeğer yoğunlukta bakteri süspansiyonu elde edilene kadar homojenize edildi. Bakteri süspansiyonu içerisine daldırılıp 1-2 dakika bekletilen pamuklu öze, fazla sıvının bırakılması için tüp kenarına bastırılarak çıkartıldı ve antibiyotik ilave edilmemiş %5 koyun kanı içeren kanlı agar besiyerinin yüzeyine sürüldü. Besiyerlerinin yüzeyinde artık sıvı besiyerinin kalmamasına dikkat edildikten sonra besiyeri yüzeyine 30 µg sefalotin içeren diskler steril bir pens yardımı ile yerleştirildi. Besiyerleri mikroaerofilik atmosferde, 37°C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda disk etrafında inhibisyon zon çapları cetvelle ölçüldü. Sefalotin için 14 mm ve üzeri çapa sahip koloniler duyarlı olarak değerlendirildi (132).

3.5.2.6. Nalidiksik Asit Duyarlılık Testi

Selektif besiyerinde üreyen, *Campylobacter* ön tanıli kolonilerden bir öze dolusu alınarak serum fizyolojik içerisinde 0,5 Mc Farland bulanıklık standardına eşdeğer yoğunlukta bakteri süspansiyonu elde edilene kadar homojenize edildi. Bakteri süspansiyonu içerisine daldırılıp 1-2 dakika bekletilen pamuklu öze, fazla sıvının bırakılması için tüp kenarına bastırılarak çıkartıldı ve antibiyotik ilave edilmemiş %5 koyun kanı içeren kanlı agar besiyerinin yüzeyine sürüldü. Besiyerlerinin yüzeyinde artık sıvı besiyerinin kalmamasına dikkat edildikten sonra besiyeri yüzeyine 30 µg nalidiksik asit içeren diskler steril bir pens yardımı ile yerleştirildi. Besiyerleri mikroaerofilik atmosferde, 37°C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda disk etrafında inhibisyon zon çapları cetvelle ölçüldü. Nalidiksik asit için 10 mm ve üzeri çapa sahip koloniler duyarlı olarak değerlendirildi (132).

3.5.2.7. Triple Sugar İron Agar (TSI)' da H₂S Oluşumunun Değerlendirilmesi

Şüpheli *Campylobacter* kolonilerinden 2-3 tanesi iğne öze ile alınarak TSI agara ekildi ve mikroaerofilik ortamda 37°C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda besiyerleri üreme ve H₂S oluşumu yönünden değerlendirildi (101).

3.5.2.8. *Campylobacter* Tür Ayırımı

Oksidaz ve katalaz testleri, hippurat hidrolizi, nalidiksik asit duyarlılığı, sefolatin dirençliliği, TSI agarda H₂S oluşumu, 37°C'de üreme ve 42°C'de üreme özelliklerine bakılarak yapıldı. Tüm incelemeler sonunda *Campylobacter*'ler için seçici besiyerinde mikroaerofil atmosferde hem 37°C hem de 42°C'de, üreyen termofilik özellikteki, oksidaz ve katalaz aktivitesine sahip, TSI Agar'da H₂S oluşturmayan, kolonilerden

1. Nalidiksik asite duyarlı, sefalotine dirençli olup hippürat hidroliz testi pozitif olanlar *C. jejuni*
2. Nalidiksik asite ve sefalotine dirençli olup, hippürat hidroliz testi negatif olanlar *C. lari*
3. Nalidiksik asite duyarlı, sefalotine dirençli olup hippürat hidroliz testi negatif olanlar *C. coli* olarak identifiye edildi (131).

3.5.2.9. *Salmonella* ve *Shigella* Türlerinin İdentifikasyonu

Dışkı kabı içerisindeki örneklerden birer öze dolusu örnek alınarak; *Salmonella* ve *Shigella* izolasyonu için zenginleştirici besiyeri olan Selenit-F buyyona, Eosin Metilen Blue (EMB) ve Salmonella Shigella agara (SS) ve Hekton Enteric agara (HE) ekildi. Selenit-F besiyerinde 37°C’de 6-8 saat bekletilip süre sonunda besiyerlerinden bir öze dolusu alınarak SS ve HE agara pasajlar yapıldı. 37°C’de 16-18 saat aerob şartlarda inkübe edildi. Bakteriler, EMB agarda laktozu fermente etme özelliklerine göre değerlendirildi. *Salmonella* ve *Shigella* bakterileri laktoz negatif olmaları nedeniyle besiyerinin rengini değiştirmemekte ve renksiz-saydam görünmektedirler. SS agarda ise, kükürt kaynağı olan sodyum tiyosülfat bulunmakta, sodyum tiyosülfattan hidrojen sülfür oluşturabilen bakterilerin kolonileri, bu özellikleri nedeniyle SS agarda siyah renkte görülmektedir. *Salmonella* kolonileri bu özelliklerinden dolayı, renksiz ancak ortaları siyah benekli koloniler oluşturmaktadır. Her iki besiyerinde de laktoz negatif olan koloniler *Salmonella* ve *Shigella* şüphesiyle biyokimyasal tanımlama için değerlendirmeye alındı. Ayrıca SS agarda hidrojen sülfür oluşturmuş siyah renkli koloniler görüldüğünde *Salmonella*’dan şüphelenildi. HE agarda: *Salmonella* için genellikle siyah merkezi olan veya olmayan mavi-yeşil renkli koloniler, ve *Shigella* için yeşil, nemli düz ve saydam koloniler değerlendirildi. İlk 24 saat içinde EMB agar ve SS agarda *Salmonella* ve *Shigella* kolonilerine benzer koloniler görülmediyse, plaklar atılmayarak bir gün daha etüvde inkübe edilecek ve yeniden değerlendirildi. Üreyen suşlar, biyokimyasal tanımlama için değerlendirmeye alındı. Burada bakterilerin şekerler, aminoasitler, sitrat, üre üzerindeki etkileri ve hareket yeteneklerine göre farklı besiyerlerinde verdikleri reaksiyonlara bakıldı.

Çizelge 3.1. TSI ve LIA besiyerlerinde *Salmonella* türü bakterilerin üreme özellikleri

Besiyeri	Reaksiyon	Sonuç
TSI	Laktoz, sükröz, glukoz fermentasyonu	Yüzey - alkali (kırmızı) Dip - asit (sarı)
	Ferrik amonyum sülfat	Besiyeri (siyah)
LIA	Lizin dekarboksilasyonu, deaminasyonu	Yüzey - alkali (mor) Dip - alkali (mor)
	Ferrik amonyum sülfat	Besiyeri (siyah)

Çizelge 3.2. TSI ve LIA besiyerlerinde *Shigella* türü bakterilerin üreme özellikleri

Besiyeri	Reaksiyon	Sonuç
TSI	Laktoz, sükröz, glukoz fermentasyonu	Yüzey - alkali (kırmızı) Dip - asit (sarı)
	Ferrik amonyum sülfat	Besiyeri (siyahlaşmaz)
LIA	Lizin dekarboksilasyonu deaminasyonu	Yüzey - alkali (mor) Dip - asit (sarı)
	Ferrik amonyum sülfat	Besiyeri (siyahlaşmaz)

Simon's sitrat agardaki değerlendirme: Bakterilerin sitratları tek karbon kaynağı olarak kullanması esasına dayanır. *Salmonella spp.*, sitrat pozitif olup orijinal rengi yeşil olan besiyerini mavi renge dönüştürmektedir. *Shigella spp.*, sitrat negatiftir ve besiyerinin rengi yeşil olarak kalmaktadır.

İndol oluşumu: *Salmonella* ve *Shigella* bakterileri genellikle indol negatif olan koloniler yapmaktadır.

Hareket besiyeri değerlendirmede: *Shigella* bakterileri hareketsiz, *Salmonella*'lar ise hareketlidir.

Salmonella ve *Shigella* türlerinin serotiplendirmesi: Biyokimyasal değerlendirme sonucunda *Salmonella* ve *Shigella spp.* olduğu düşünülen koloniler anti-serumlarla aglutinasyon işlemine alındı.

3.6. Moleküler Uygulamalar

İshalli hastalardan toplanan 537 dışkı örneği, kültür izolasyonu ile eş zamanlı olarak, termofilik *Campylobacter* türlerine ait 23S rRNA geni üzerindeki spesifik dizilerin varlığını tespit amacı ile moleküler bazlı bir yöntem olan, PZR-RFLP yöntemi ile de değerlendirildi (133). PZR-RFLP ile tip tayini sırası ile DNA ekstraksiyonu, Termofilik *Campylobacter* türlerinin 23S rDNA genine ait 491 bp lik fragmentin PZR ile amplifikasyonu ve agaroz gel elektroforezi ile tespiti, ampliconların restriksiyon enzimleri ile kesimi ve kesim sonucu oluşan fragmentlerin agaroz gelde görüntülenerek tanımlanması şeklinde gerçekleştirildi.

3.6.1. DNA Ekstraksiyonu

3.6.1.1. Dışkı Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu

Çalışmaya alınan dışkı örneklerinden *Campylobacter* DNA'sının ekstraksiyonu için Magna Pure Compact Nucleic Acid Isolation kit I (Kat No:03 730 964 001 Roche) ekstraksiyon kiti kullanıldı. Kit içeriğinde bulunanlar: Koleksiyon tüpleri (2 ml), Proteinaz K, Removal buffer, Wash Buffer, Elution Buffer, Lysis Buffer.

Dışkı örneklerinden DNA ekstraksiyonu üretici firmanın önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde yapıldı.

1. Yaklaşık 180-220 mg dışkı örneği 2 ml'lik ependorf tüplerine alındı ve 5-6 katı kadar fosfat tamponu ile süspansiyon edildi. (örnek sıvı kıvamda ise 200 µl koyuldu).
2. Elde edilen süspansiyondan 200 µl alınıp yeni bir ependorfa aktarıldı üzerine 180 µl lysis buffer ve 20 µL proteinaz K eklendi.
3. Örnekler kuru ısı bloğuna alınıp önce 65°C'de daha sonra 95°C'de 10 dakika inkübe edildi.

4. İnkübasyon süresi sonunda, karışım önce homojenizasyon için 15 saniye vortekslendi, daha sonra kaba partiküllerin uzaklaştırılması amacı ile 500 rpm'de iki dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda oluşan süpernatant 2 ml'lik yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 100 µl isopropanol ilave edildi, örnekler vortekslenip High pure filtre içeren kolonların içine eklendi.
5. Kolonlar bir dakika 1000 x g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolonun altındaki kolleksiyon tüpü atıldı ve yeni kolleksiyon tüpü takıldı.
6. Tüplerin kapakları tek tek açılarak 500 µl removal buffer eklendi ve bir dakika 1000 x g'de santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası kolonun altındaki kolleksiyon tüpü atıldı ve yeni kolleksiyon tüpü takıldı.
8. Tüplerin kapakları tek tek açılarak 500 µl wash buffer eklendi ve bir dakika 1000 x g'de santrifüj edildi bu işlem bir kez daha tekrar edildi.
9. Kolonlar bir dakika 1000 x g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolonun altındaki kolleksiyon tüpü atıldı ve kolon 2 ml'lik steril ependorf içine konuldu.
10. Tüplerin kapakları tek tek açılarak 200 µl elution buffer eklendi ve bir dakika 1000 x g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ependorf içindeki kolon atıldı ve ependorf içinde elde edilen DNA ekstraktı kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

3.6.1.2. Kültürde İzole edilen suşlardan DNA Ekstraksiyonu

Hızlı DNA ekstraksiyon protokolü besiyerinde üreyen *Campylobacter* kolonilerine uygulandı. Daha önce seçici besiyerinde üreyen *Campylobacter* ön tanımlı kolonilerden ependorf tüplerinde saklanan örnekler canlandırılıp DNA eldesi için ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Bu yöntemde, 1,5 ml'lik steril ependorf tüpüne 1 ml steril distile su konuldu. Bir öze dolusu koloni su içerisinde süspanse edildi ve 80°C'de 20 dakika tutularak bakterilerin parçalanması sağlandı. Daha sonra ependorf tüpü 12x g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Pellet üzerine 200 µl kloroform ve 200 µl steril distile su ilave edildi. Karışım 12.000 x g'de 10 dakika tekrar santrifüj

edildi ve süpernatant PZR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmak üzere yeni bir steril ependorfa aktarılarak PZR’de kullanılmaya kadar -20°C’de saklandı.

3.6.2. Termofilik Bölgenin Amplifikasyonu

Termofilik *Campylobacter*’lerin 23S rDNA geninde 43 ile 69. heliksler arasında yer alan ve dört farklı termofilik *Campylobacter* türü için spesifik olan 491 bp uzunluğundaki bölgenin amplifikasyonu için THERM (F-5’-TAT TCC AAT ACCAAC ATT AGT-3’)ve THERM-4 (R-5’-CTT CGC TAA TGC TAA CCC -3’) primerleri kullanıldı (133). Amplifikasyon; 10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, herbir dNTP’den 200 µM, herbir primerden 25 pmol, 2,5 U *Taq* polymerase ve 50ng/5µl kalıp DNA içeren, toplam 50 mikrolitre PZR karışımında gerçekleştirildi. Amplifikasyon aşamaları termal döngü cihazında aşağıdaki döngü sırasına göre tamamlandı (Çizelge 3.3., 3.4.) (133).

Çizelge 3.3. *Campylobacter* gen bölgesinin PZR reaksiyon karışımı

PZR malzemeleri	<i>Campylobacter</i> spesifik gen bölgesi (491 bp)
Distile su	36,75 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
10X PZR tamponu	5 µl
dNTP mix (10 mM)	1 µl
Primer (100 pmol/µl)	0,5 µl (THERM)
Primer (100 pmol/µl)	0,5 µl (THERM-4)
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0,25 µl
Toplam PZR karışımı hacmi	47 µl
<i>Campylobacter</i> DNA’sı	3 µl
Toplam hacim	50 µl

Çizelge 3.4. *Campylobacter* türlerinin gen bölgesinin amplifikasyonunda kullanılan PZR koşulları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	5 dakika	1
Denatürasyon	94	30 saniye	
Primer Bağlanması (Annealing)	62	30 saniye	42
Zincir Uzaması (Extension)	72	45 saniye	
Bekleme	4	∞	∞

Termal döngü cihazında reaksiyon tamamlandıktan sonra, örnekler elektroforez uygulanmak üzere +4°C'ye kaldırılmıştır.

3.6.3. Agaroz Jel Elektroforezinin Uygulaması

PZR ile *Campylobacter* spesifik gen bölgeleri amplifikasyonla çoğaltıldıktan sonra %1,5'lük agaroz jele yüklenerek ürünlerin elektroforezi yapıldı. Bant oluşumu gözlenen örneklerin bir sefer daha amplifikasyonu yapıldı. Hazırlanan jelde yürütülen DNA'ların uzunlukları, büyüklükleri belli DNA fragmentlerini içeren moleküler ağırlık standardı ile kıyaslanarak saptandı. Elektroforez tamponu olarak Tris-Borik Asit-Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) [TBE] kullanıldı. 10X konsantr stok olarak hazırlanan bu tampon kullanılmadan önce 1X olacak şekilde distile su ile sulandırıldı (133). Bir balon jodede 0,45 gr agaroz 30 ml 1X TBE solüsyonu içerisinde mikrodalga fırında homojen şeffaf hale gelinceye kadar ısıtıldı. Biraz soğuduktan sonra Et-Br'den 3 µl eklendi. Daha sonra jel, tarakların yerleştirildiği jel tepsisine yavaşça döküldü. Katılaşıncaya kadar (25-30 dakika) oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra elektroforez tankına yerleştirilerek PZR örneklerinin yüklenmesine hazır hale getirildi (133). Daha önceden PZR işlemi yapılmış olan buzdolabındaki örneklerden 5'er µl alınarak parafilm üzerinde 2 µl 1X TBE ile hazırlanmış yükleme tamponu (%20 sükröz veya gliserol, %0,25 brom fenol mavisi) ile iyice karıştırıldı. Daha sonra da elektroforez tankına yerleştirilen jelin kuyucuklarına sırasıyla yüklendi. Tankın kapağı kapatıldıktan sonra güç kaynağı çalıştırıldı. Kullanılan mini tank için 30 mA akım verilerek elektrik akımı

geçmesi sağlanarak örnekler 30-40 dakika boyunca yürütüldü. Yükleme tamponunda bulunan brom fenol mavisinin göçü takip ederek jelin 2/3'lük kısmına ulaştığında elektroforez durduruldu. Jel tanktan çıkarılarak 312 nm dalga boyunda ışık veren UV-translüminatöründe incelendi ve jel görüntüleme sisteminde kayıtları yapıldı.

3.6.4. RFLP Uygulamaları

PZR ile çoğaltılan ve *Campylobacter* 23S rDNA geni üzerindeki hedef dizilerle uyumlu olan amplikonlar, tür düzeyinde identifikasyon için *AluI* ve *Tsp 509I* RE ile kesildi. Kesim sonucu ortaya çıkan DNA fragmentlerindeki polimorfizm termofilik *Campylobacter*'lerin tip düzeyinde tanımlanmasını sağladı. Bu çalışmada iki farklı restriksiyon enzimi kullanıldığı için her enzim kendi özel tamponu ve substratı ile iki farklı tüpte çalışıldı (133).

3.6.4.1. *AluI* Restriksiyon Endonükleaz Enzimi ile Amplikonların Kesimi

Termofilik *Campylobacter*'lere ait olduğu tespit edilen amplikonlar ticari olarak sağlanan, genomda 5'AGCT 3' baz dizisini tanıyan ve hedef diziyi G ile C arasından keserek kör uçlu fragmanlar oluşturan *AluI* restriksiyon enzimi (Promega R6281) ile muamele ettirildi. *AluI* enzimi 10.000 U/ml aktif enzim içeren 0.1 ml'lik şişelerde, kullanıma hazır olarak sağlandı. Enzimin çalışma tamponu olan asetillenmiş BSA ve 10X RE Buffer da enzimle birlikte kullanıma hazır olarak alındı (133).

Enzimatik kesim için reaksiyon karışımı aşağıdaki şekilde hazırlandı

<i>AluI</i> (10U/ μ l)	0,1 μ l
RE Buffer (10x)	2,0 μ l
Asetilated BSA	0,2 μ l
Amplikon	10 μ l
Distile su	7,7 μ l
Toplam hacim	20 μ l

Reaksiyon karışımı, enzimin optimum düzeyde aktivasyonu için üretici firma önerileri doğrultusunda Termal Cycler’da 37°C’de 3 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda reaksiyon karışımı 65°C’de 5 dk inkübe edilerek enzimin inaktivasyonu gerçekleştirildi.

3.6.4.2. *Tsp 509I* Restriksiyon Endonükleaz Enzimi ile Amplikonların Kesimi

Termofilik *Campylobacter*’lere ait olan amplikonlar, yine ticari olarak sağlanan, genomda 5’AATT 3’baz dizisini tanıyan ve hedef diziyi ilk adenin rezidüsünden önce palindromik olarak kesen *Tsp 509I* restriksiyon enzimi (Bio Labs, Kat No:R5076L) ile muamele ettirildi. *Tsp 509I* enzimi, 10,000 unit/ml aktif enzim içeren 100 ml viallerle kullanıma hazır olarak sağlandı. Enzimin çalışma solüsyonu olan 1XNE Buffer enzimle birlikte alındı. Enzimatik kesim için reaksiyon karışımı aşağıdaki şekilde hazırlandı:

<i>Tsp 509I</i> (10U/ μ l)	0,1 μ l
Kalıp DNA	10 μ l
1XNEBuffer Buffer (10x)	5 μ l
DS	34,9 μ l

Reaksiyon karışımı enzimin optimum düzeyde aktivasyonu için 65°C’de 16 saat inkübe edildi. Her iki enzimle optimal şartlarda hazmettirilen amplikonların, kesim yerlerine göre oluşturdukları fragmentlerin büyüklükleri, elde edilen ürünlerin elektirikli ortamda, %3’lük agaroz jelde yürütülmeleri sonucu ortaya çıkan fragment sayı ve büyüklükleri dikkate alınarak belirlendi. Örneklerin elektroforez için hazırlanması, agaroz jelin dökülmesi, örneklerin yüklenmesi, elektroforez esnasında uygulanan akımın süresi ve şiddeti ile fragmentlerin görüntülenmesinde, PZR ile amplifiye edilen ürünlerin elektroforezi ve görüntülenmesinde kullanılan protokol kullanıldı.

3.6.5. RFLP Sonuçlarının Yorumlanması

Termofilik *Campylobacter* tür tayini için amplifiye edilen 23S rDNA üzerindeki 491 bp'lik ampikonlar, *AluI* ve *Tsp 509I* restriksiyon enzimi ile kesildikten sonra, jel elektroforezinde gösterdikleri fragment profil polimorfizmine göre tip düzeyinde tanımlandılar. Tiplendirmede Engwal EO ve arkadaşlarının kriterleri baz olarak alındı (133) (Çizelge 3.5.).

Çizelge 3.5. Engwall ve Fermer tarafından belirlenen, PZR-RFLP fragment polimorfizmine göre *Campylobacter* tiplendirilme kriterleri (133).

Tip	<i>Alu I</i>	<i>Tsp 509I</i>
<i>C. jejuni</i>	202bp /166 bp/ 124 bp	491 bp
<i>C. coli</i>	290bp/ 202bp	491 bp
<i>C. upsaliensis</i>	290 bp/ 202bp	339 bp/126 bp
<i>C. upsaliensis var.I</i>	290 bp/115 bp/87 bp	339 bp/126 bp
<i>C. lari</i>	290 bp/115 bp/ 51 bp	177 bp/162 bp/126 bp

3.7. İstatistiksel Yöntem

Termofilik *Campylobacter* türlerinin çocuklarda görülme sıklığını araştırmak amacı ile yapılan bu çalışmada elde edilen bulgular arasındaki ilişkiler Ki-kare analizi ile SPSS (Statistical Package for Social Scienses, Version 10.0) paket programı kullanılarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Grubunun Demografik Özellikleri

Bölgemizde görülen çocukluk çağı akut gastroenteritlerin etiyojisinde termofilik *Campylobacter* türlerinin görülme sıklığını belirlemek için bu çalışma 1 Ekim 2008-30 Eylül 2009 tarihleri arasında yapıldı. Çalışmaya 163'ü (%30,36) Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi, 374'ü (%69,64) Sağlık Bakanlığı Mersin Kadın Doğum ve Çocuk Hastanesi polikliniklerine gastroenterit yakınması ile başvuran yaşları 0-14 arasında olan 309 erkek, 228 kız dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen toplam 537 hastanın dışkı örneği Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda termofilik *Campylobacter* türleri yönünden konvansiyonel kültür yöntemleri ve PZR-RFLP yöntemi ile incelendi.

Çalışmaya gastroenterit şikayeti olan 309 (%57,54) erkek, 228 (%42,46) kız toplam 537 hasta dahil edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Dışkı örneklerinin cinsiyete göre dağılımı

Cinsiyet	Sayı	%
Kız	228	42,46
Erkek	309	57,54

Çalışmaya dahil ettiğimiz hastaların yaş aralığı 0-14 arasında olmakla birlikte, yaş gruplarına göre dağılım incelendiğinde bebeklik döneminde (0-2 yaş) 165 hasta (%30,726), okul öncesi dönemde (3-5 yaş) 225 hasta (%41,899), 147 hasta (%27,374) okul çağında (6-14 yaş) bulunmaktadır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Dışkı örneklerinin yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş Grubu	Sayı	%
0-2	165	30,72
3-5	225	41,89
6-14	147	27,37

4.2. Dışkı Örneklerinin Makroskopik ve Mikroskopik Bulguları

Çalışmamızda 537 dışkı örneği makroskopik ve mikroskopik olarak incelenmiştir. Örneklerimizin 12 (%4,36)'sinde makroskopik olarak kan tespit edilmiş, 54 (%19,36)'ünde her sahada bol lökosit, sekizinde (%2,9) her sahada bol eritrosit gözlenirken, 262 (%48,78) örnekte mikroskopik olarak eritrosit ve lökosit görülmemiştir.

Çalışmamızda dışkı örneklerinden izole edilen toplam 24 *Campylobacter* suşunun makroskopik olarak değerlendirilmesinde ise sekizi (%33,3) mukuslu, ikisi (%8,3) kanlı ve mukuslu, dördü (%16,6) sulu, yedisi (%29,1) yarı katı, üçü (%12,5) katı olarak tespit edilmiştir. *Campylobacter* gastroenteriti görülmesi yönünden dışkı incelenmesinde, makroskopik olarak dışkının sulu yada dizanterik formda olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

İzole edilen *Campylobacter* suşlarına ait toplam 24 dışkının mikroskopik inceleme sonuçlarına baktığımızda 11 (%45,8)'inde eritrosit ve lökosit görülmezken, sekizinde (%33,3) her sahada 3-6 lökosit, dördünde (%16,6) bol eritrosit, bol lökosit, birinde (%4,1) ise nadir lökosit tespit edilmiştir.

4.3. Kültür Sonuçları

Çalışmaya alınan 537 dışkı örneğinin mCCDA ve CAT süplemantli CCDA seçici besiyerlerine ekimi yapıldı, 42°C ve 37°C'de 48-72 saat mikroaerofilik koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası yapılan değerlendirmede üreme olan kolonilerin oksidaz, katalaz, Gram boyama özelliklerine bakıldı ve pozitif olan 24 (%4,46) dışkı örneği *Campylobacter* spp. olarak tanımlandı.

Çalışmamızda izole edilen *Campylobacter*'lerin görülme yaş aralığı 0-12 yaş, ve ortalama yaş 7,28 olarak tespit edilmiştir. İzole edilen 24 izolatın onu (%41,6) kız çocuklarında, 14'ü (%58,4) erkek çocukların saptandı. Yaş gruplarına göre izolatların dağılımı incelendiğinde 12'si (%50) 0-2 yaş grubunda, altısı (%25) 3-5 yaş grubunda, geri kalan altı (%50) izolatta 6-14 yaş grubu çocuklarda izole edildi. İzole edilen 24 izolatın yaş gruplarına göre dağılımı Çizelge 4.3.'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. *Campylobacter* izole edilen olguların yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş Grubu	Sayı	%
0-2	12	50
3-5	6	25
6-12	6	25

En sık izolasyon 0-2 yaş grubunda oldu. 0-2 yaş grubunda *Campylobacter* izolasyonu açısından istatistiksel olarak bir fark saptanmıştır ($p < 0,05$).

Çalışmada izole edilen *Campylobacter*'lerin ikisi (%8,3) mayıs ayında, dördü (%16,6) haziran ayında, 11 (%45,8)'i temmuz ayında, beşi ağustos ayında (%20,8), ikisi (%8,3) eylül ayında izole edildi (Çizelge 4.4.) Aylara göre izolasyon oranları incelendiğinde en sık izolasyonun temmuz ayında görüldüğü ve bununda istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p < 0,05$) tespit edildi.

Çizelge 4.4. *Campylobacter* izole edilen olguların aylara göre dağılımı

Aylar	Sayı	%
Mayıs	2	8,3
Haziran	4	16,6
Temmuz	11	45,8
Ağustos	5	20,8
Eylül	2	8,3

Çalışmaya alınan bütün dışkı örneklerinden termofilik *Campylobacter* türlerinin izolasyonu için şarkoal içeren mCCDA ve CAT supplementli CCDA besiyeri kullanıldı.

Uygun inkübasyon süresi sonunda besiyerlerinde 0.5 mm çapında, grimsi renkte, bazen metalik refle veren, oksidaz ve katalaz enzim aktiviteleri yönünden pozitif bulunan, Gram boyama ile mikroskopta Gram negatif, kıvrımlı veya virgül şeklinde görülen ve diğer fenotipik yöntemlerle *Campylobacter* ön tanısı alan 24 izolata hippurat hidroliz testi yapıldı (Şekil 4.1., 4.2.)



Şekil 4.1. Modifiye *Campylobacter* Blood-Free Selective Agar besiyerinde üretilen *Campylobacter* kolonilerinin görünümü.



Şekil 4.2. Hippurat Hidroliz Testinin değerlendirilmesi: Sağdaki tüp negatif, soldaki tüp pozitif hippurat hidroliz testini göstermektedir.

Kültürde üreyen bu 24 *Campylobacter* izolatlarının klasik identifikasyonunda; nalidiksik asite duyarlı, sefalotine dirençli olduğu belirlenmiş, 22 izolatın hippurat hidroliz testi pozitif sonuç verdiği, iki izolatın hippurat hidroliz testi negatif sonuç verdiği belirlenmiştir. Hippurat hidroliz testi negatif iki izolat *C. coli* diğerleri *C. jejuni* olarak tiplendirilmiştir. (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.5. Seçici besiyerlerinden izole edilen *Campylobacter* izolatlarının fenotipik özellikleri.

Suş No	Hippurat Hidrolizi	TSI'de H ₂ S oluşumu	Sefalotine hassasiyet	Nalidiksik asite hassasiyet	37°C'de üreme	42°C'de üreme
<i>C. jejuni</i> RSSK O6644 (Standart suş)	+	-	-	+	+	+
1	-	-	-	+	+	+
2	+	-	-	+	+	+
3	+	-	-	+	+	+
4	-	-	-	+	+	+
5	+	-	-	+	+	+
6	+	-	-	+	+	+
7	+	-	-	+	+	+
8	+	-	-	+	+	+
9	+	-	-	+	+	+
10	+	-	-	+	+	+
11	+	-	-	+	+	+
12	+	-	-	+	+	+
13	+	-	-	+	+	+
14	+	-	-	+	+	+
15	+	-	-	+	+	+
16	+	-	-	+	+	+
17	+	-	-	+	+	+
18	+	-	-	+	+	+
19	+	-	-	+	+	+
20	+	-	-	+	+	+
21	+	-	-	+	+	+
22	+	-	-	+	+	+
23	+	-	-	+	+	+
24	+	-	-	+	+	+

Çalışmada izole ettiğimiz 24 izolatın 22 (%91.66)'si *C. jejuni*, ikisi (%8.34) *C. coli* olarak tespit edildi (Çizelge 4.6.).

Çizelge 4.6. *Campylobacter* izole edilen olguların türlere göre dağılımı

Tür	Sayı	%
<i>C. jejuni</i>	22	91,66
<i>C. coli</i>	2	8,34

Çalışmaya dahil edilen çocuklarda yaş gruplarına göre *C. jejuni* izolasyonu incelendiğinde 0-2 yaş grubunda 11 (%6.6) izolat, 3-5 yaş grubunda altı (%2.6) izolat, 6-12 yaş grubunda 5 (%3.4) izolat saptanmıştır (Çizelge 4.7.).

Çizelge 4.7. *C. jejuni* izole edilen 22 olgunun yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş Grubu	Sayı	%
0-2	11	6,6
3-5	6	2,6
6-12	5	3,4

Çalışmada izole edilen iki *C. coli* izolatından biri (%0.60) 0-2 yaş grubunda bulunurken diğeri (%0.68) 6-14 yaş grubunda görülmüştür.

Çalışmada dışkı kültüründe *C. jejuni* üreyen toplam 22 hastanın 13(%59)'ü erkek, dokuzu (%41) kız ve Erkek/Kız oranı 1.4 olarak tespit edildi. *C. jejuni* izolasyonu yönünden cinsler arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Çalışmamızın yürütüldüğü periyotta *C. jejuni* izolasyonu en sık Temmuz ayında 11 (%50) izolat ile saptanmıştır. Bunu Ağustos ayı beş (% 22,7), Haziran ayı üç (%13.6), Eylül ayı iki (%9,1) ve Mayıs ayı bir (%4,54) izolat ile izlemiştir. Çalışmada izolasyon oranlarımızın yaz aylarında arttığı tespit edilmiş olup en sık Temmuz ayında olmuştur. Temmuz ayındaki bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p <0,05$).

Hastaların gastroenterit şikayetlerinin süresi incelendiğinde ortalama 2.4 gün olarak saptanmıştır.

Semptomlar yönünden incelendiğinde *C. jejuni* saptanan toplam 22 hastanın dördünde (%18,18) sadece gastroenterit yakınması varken, üçünde (%13,6) gastroenterit ve karın ağrısı, dördünde (%18,18) gastroenterit, karın ağrısı ve ateş olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.8.).

Çizelge 4.8. C. jejuni izole edilen hastalarda başvuru semptomları

Semptom	Olgu Sayısı	%
Sadece gastroenterit	4	18,1
İshal, karın ağrısı	2	9
İshal, karın ağrısı, kusma	2	9
İshal, karın ağrısı, ateş, kusma	3	13,6
Tek başına yada diğer semptomlarla birlikte gastroenterit	22	100
Tek başına yada diğer semptomlarla birlikte kusma	13	59
Tek başına yada diğer semptomlarla birlikte karın ağrısı	12	54,5
Tek başına yada diğer semptomlarla birlikte ateş	4	18,1

C. jejuni izole edilen gastroenteritli hastaların dışkı örneklerinin makroskopik incelemesinde hastaların altısında (%27,27) sulu dışkı gözlenirken, yedisinde (%31,8) mukuslu, ikisinde (%9) kanlı-mukuslu, üçünde (%13,6) yarı katı özellikte dışkı gözlenmiştir. İzolasyon yönünden sulu formdaki dışkı ile dizanterik form arasında istatistiksel olarak bir fark saptanmamıştır ($p > 0,05$).

Dışkı örneklerinin mikroskopik incelemesinde ise dördünde (%18,18) eritrosit ve lökosit gözlenmezken, 13 (%59)'ünde her alanda 3- 6 lökosit, beşinde (% 22,7) nadir eritrosit saptandı.

Çalışmada dışkı kültürlerinde *C. coli* üreyen iki hastanın biri iki yaşında kız, diğeri 12 yaşında erkek hasta oldu. Hastalarda *C. coli* suşlarından biri Mayıs diğeri de Haziran ayında izole edildi. Semptomlar yönünden incelendiğinde bir hastada sadece gastroenterit, diğeri ise karın ağrısı, bulantı ve kusma olduğu belirlenmiştir.

C. coli izole edilen hastaların dışkılarının makroskopik incelemesinde birinin mukuslu diğeri yarı katı özellikte olduğu saptanırken, mikroskopik incelemede ise eritrosit ve lökosit saptanmamıştır.

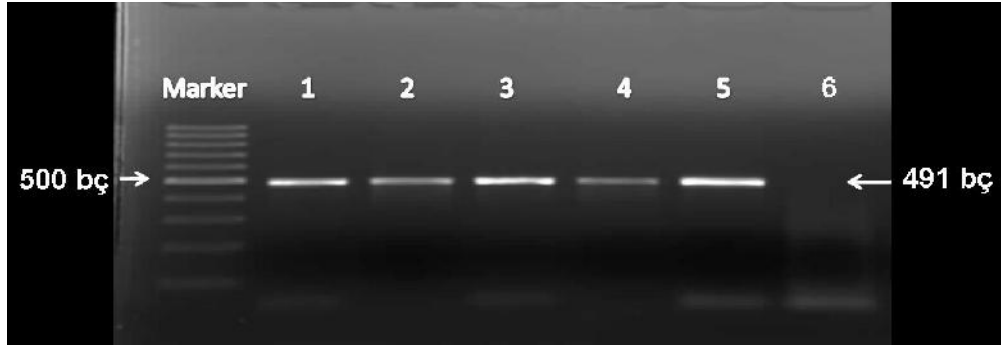
Çalışmamızda 537 hastanın incelenen dışkı örneğinde klasik yöntemlerle 3-5 yaş grubunda iki (%0,37) hastada *Salmonella* spp. izole edildi.

4.4. PZR Sonuçları

Çalışmada termofilik *Campylobacter* genomundaki hedef dizilerin PZR ile amplifikasyonu sonucu direkt dışkıdan ekstrakte edilmiş DNA kalıpları, termofilik *Campylobacter*'lerin genomunun 23S rDNA geninin 43 ile 69. heliksler arasında yer

alan ve termofilik türler için spesifik ve iyi korunmuş olan 491 bç uzunluğundaki fragmentini hedefleyen bölge çoğaltıldı.

Çalışmaya alınan 537 hastanın dışkı örneğinden direkt DNA izolasyon yapılarak 22 (% 4,09) örnekte PZR ile 491 bp uzunluğundaki hedef DNA dizilerinin varlığı tespit edildi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. PZR amplifikasyon ürünlerinin %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü: 5 numaralı örnek pozitif kontrol; *C. jejuni* 06044 RSKK suşu, 1, 2, 3, 4, numaralı örnekler PZR pozitif, 6 numaralı örnek PCR negatif hasta örnekleridir.

Kültürde üretilen 24 izolattan ekstrakte edilen DNA'ların PZR'larının tamamında (%100) 491 bp uzunluğundaki hedef DNA dizileri saptandı.

Çalışmada dışkı örneğinden direkt izolasyon yapılan örneklerin tamamında kültürde üreme tesbit edilmiş ancak kültür de üreme tesbit edilen iki izolatın, direkt dışkı örneğinden izolasyon sonrası PZR'nu negatif olarak belirlenmiştir.

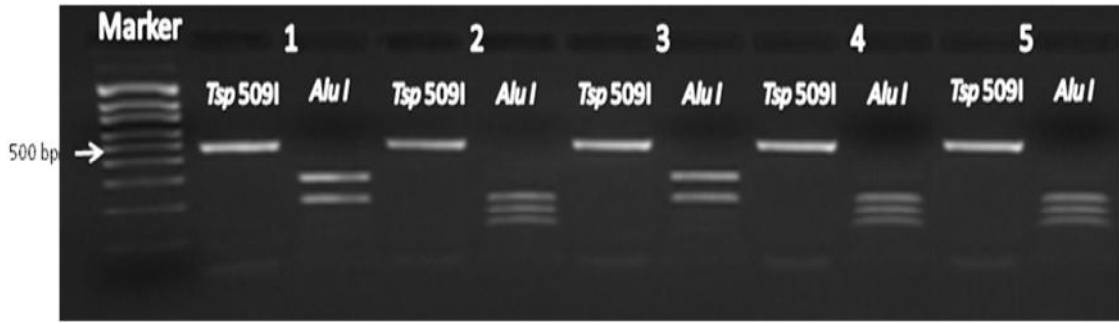
Çizelge 4.9. PZR ile 491 bp. uzunluğunda bant tespit edilen örneklerin ekstraktın özelliğine göre dağılımı

Eksrakt	PCR pozitif	%	PCR negatif	%
Dışkı ekstraktı n: 537	22	4	515	95,9
İzole edilen suş ekstraktı n: 24	24	100	0	0.0

Kültür yöntemi ile pozitif ancak dışkıdan direkt izolasyon sonrası PZR yöntemi ile negatif bulunan iki dışkı örneğinin ekstraksiyon ve PZR işlemleri iki kez tekrar edilmiş ancak sonuç yine negatif olarak değerlendirilmiştir.

4.4.1. RFLP Sonuçları

PZR ile çoğaltılarak, 491 bp uzunluğundaki hedef bölge ile uyumlu fragment büyüklüğüne sahip olan ampliconlar, tip tayini amacı ile *Alu I* ve *Tsp 509I* restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonuna alındı. Kesim sonucu oluşan fragmentlerin polimorfizmi agaroz jel elektroforez işlemi ile görüntülenerek değerlendirildi (Şekil 4.4.)



Şekil 4.4. PZR-RFLP yöntemi ile elde edilen kesim ürünlerinin agaroz jeldeki görünümü: 1 ve 3 numaralı örnekler *C. coli*, 2, 4, 5 numaralı örnekler *C. jejuni* ile uyumlu bant paterni göstermektedir.

Dışkı izolatlarının fenotipik yöntemlerle tiplendirilmesinde hippurat hidroliz testi pozitif olarak belirlenip, *C. jejuni* tanısı alan 22 izolat PZR/RFLP testi ile *C. jejuni* ile uyumlu bant paterni gösterdi. Çalışmada hippurat hidroliz testi negatif olarak belirlenen ve fenotipik olarak *C. jejuni* düşünülmeyen iki izolat PZR-RFLP analizinde *C. coli* ile uyumlu bant paterni gösterdi.

Çalışmada kullandığımız PZR-RFLP yönteminin duyarlılığı %91,67, özgüllüğü %100, pozitif prediktif değeri %100 ve negatif prediktif değeri %95 bulundu.

Kullanılan metodlar arasında duyarlılık yönünden anlamlı bir farklılığın

bulunmadığını ve PZR yönteminin kültür yöntemine alternatif olarak kullanılabilceği tespit edildi.

5. TARTIŞMA

İnfeksiyöz gastroenteritler, tüm dünyada sık görülen, bakteri, virüs ve parazitlerin neden olduğu gelişmekte olan ülkelerde bebek ve çocuklarda önemli morbidite ve mortaliteye neden olan hastalıklardır (134).

ABD’de beş yaş altı ortalama 16,5 milyon çocuğun 1,3 ile 2,3 milyonunun her yıl bir kez enterit atağı geçirdiği ve bunun da 1 milyar dolarlık bir maliyete neden olduğu bildirilmiştir (135).

Fekal-oral yolla bulaşan bu infeksiyonlar, nüfusun kalabalık, yetersiz ve dengesiz beslenmenin olduğu, hijyenik koşulların bozuk olduğu ülkelerde, pek çok insanın ölümüne sebep olmaktadır (136).

1980’li yılların başlarından itibaren giderek artan önemi nedeniyle *Campylobacter* türlerinin de pek çok laboratuvar tarafından izolasyonuna başlanmıştır. Ancak bu yerlerin büyük bir çoğunluğunda düzgün bir takip yapılmadığından ve sağlıklı kayıtlar tutulmadığından *Campylobacter* türlerine bağlı gastroenteritlerin gerçek insidansı hakkında tam bir bilgi yoktur (13).

ABD’de FoodNet raporlarına göre *Campylobacter* gastroenteritleri *Salmonella* ve *Shigella* gastroenteritlerinden daha yüksek seyretmiş, FoodNet raporlarına göre 2002 yılında 13.3/100.000’lik bir oranda saptanmıştır (138).

Campylobacter türleri içinde *C. jejuni* tüm dünyada akut bakteriyel gastroenteritlerin en sık nedenidir (139). Dayan ve ark. (140) çalışmasında İsrail’de 2007-2009 yılları arasında görülen çocukluk çağı gastroenteritlerinde *Campylobacter*’lerin en sık etken olduğunu *C. jejuni*’nin diğer türlerden daha sık görüldüğü bildirilmiştir. *C. jejuni* gastroenteritleri dünyada yaygın olarak görülmekle birlikte değişkenlik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda Hindistan’da %18, Bulgaristan’da %3,58, Romanya’da %10,5 oranında *C. jejuni* etken olarak saptanmıştır (141, 142, 143).

Gazze’de ishal etkenlerinin dağılımını tespit etmek için yapılan bir çalışmada gastroenterit şikayeti olan beş yaş altındaki 150 çocuğun dışkı örneği incelenmiştir. Çalışma sonucunda örneklerin %6’sında *Shigella* spp., %5’inde *Campylobacter* spp. izole edilmiştir (144).

Ülkemizde *Campylobacter*'lerin görülme sıklığı ile ilgili farklı merkezlerde 1986 ile 2005 yılları arasında yapılan çalışmalarda *Campylobacter* izolasyon oranı %0-13 olarak bildirilmiştir (Çizelge 5.1.) (120, 145).

Çizelge 5.1: Ülkemizde 1986-2005 yılları arasında çeşitli yaş gruplarında *Campylobacter* izolasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarının sonuçları (145).

Araştırmacı	Yıl	İzolasyon oranları	Çalışmanın yapıldığı yer
Gültekin ve ark.	1986	5	Sivas
Mutlu ve Pamukçu	1986-87	0	Antalya
Aşçı ve ark.	1988	13	Elazığ
Akgün ve ark.	1985-87	1	Eskişehir
Mete ve Suay	1989	11	Diyarbakır
Hasçelik ve ark.	1990	9	Ankara
Özkan ve Günhan	1994	2	İzmir
Öztürk ve ark.	1992-94	7	İstanbul
Işık ve ark.	1994-95	7,5	İzmir
Yıldırım ve Fazlı	1995	3	Kayseri
Zarakolu ve ark.	1995-97	6	Ankara
Yağcı ve Erdem	1998	6	Ankara
Öngen ve ark.	1997-99	0,9	İstanbul
Taş ve Ardiç	1999	3,5	Ankara
Altındış ve Kenar	2000	7	Afyon
Kanan ve Akşit	2000-01	0,6	Eskişehir
Özkan	2005	12,9	Adana

Yapılan bu çalışmalarda elde edilen bu oranların farklılığından örneklerin transport şartları, çalışılan zaman, izolasyonda kullanılan besiyerleri, laboratuvarlar arasındaki standardizasyon farklılıklarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (66). Ayrıca çalışılan yaş grupları, cinsiyet, ekonomik durum, beslenme şartları ve çalışılan zaman dilimi gibi faktörler izolasyon oranlarını değiştirmektedir (66).

Campylobacter infeksiyonlarının tanısında kültürde izolasyon “altın standart” olarak kabul edilmekle birlikte klasik kültür yönteminin 4-6 günlük bir süre gerekmesi tanıda alternatif yöntemlere ihtiyaç doğurmuştur. Dışkı örneklerinde direkt *Campylobacter* DNA'sını saptayan moleküler yöntemlerin aynı gün içinde sonuç verebilmeleri bu yöntemleri hızlı tanıda kültüre göre daha avantajlı hale getirmiştir (146).

Çalışmamızda seçici kültür besiyerleri mCCDA ve CAT supplementli CCDA ile PZR-RFLP yöntemlerini birlikte kullanarak gastroenteritli hastalara ait dışkı

örneklerinde %4,46 oranında *Campylobacter* izolasyonu saptadık. Fenotipik ve moleküler tiplendirme yöntemlerine göre izolatlarımızın %91,66'sının *C. jejuni*, %8,34'ünün de *C. coli* olduğunu tespit ettik.

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalında Polat ve arkadaşları tarafından 2006-2007 döneminde değişik yaş grubundan 431 gastroenteritli hastanın dışkı örneğinde klasik yöntemle %5,1 ve moleküler yöntemle %4,5 oranında *Campylobacter* tespit edilmiştir (97)

Yaptığımız bu çalışma Mersin bölgesindeki çocukluk çağı akut gastroenteritlerinde *Campylobacter*'ler ile ilgili yapılan ilk kapsamlı çalışma olup oranlarımız Adana'da Polat ve arkadaşlarının çalışmalarında buldukları %5,1'lik orana yakın bulunmuştur (97). Bizim çalışmamızda ise örneklerimizin %4,46'da klasik kültür yöntemi ile %4,09'da dışkıdan direkt moleküler yöntemle pozitiflik bulunmuştur.

İstanbul'da Öngen ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, beş yıl boyunca çeşitli yaş grubundan 6835 ishali hastaya ait dışkı örneği, *Campylobacter* türlerinin varlığı yönünden araştırılmış, örneklerin %1,2'sinde *Campylobacter* pozitifliği tespit etmişlerdir (121). Bu çalışmada fenotipik özelliklerine göre tiplendirdikleri izolatların %84'ünün *C. jejuni* olduğunu bildirmişlerdir (121).

Yılmaz ve arkadaşları Edirne ve yöresinde çalışmada, gastroenteriti olan 82 hastaya ait dışkı örneğini, *Campylobacter* izolasyonu amacı ile mCCDA besiyeri kullanıp dışkı örneklerinde %4 oranında *Campylobacter* izole etmişlerdir. Bu çalışmada izole edilen *Campylobacter* türleri fenotipik olarak tiplendirilmiş, %81 oranında *C. jejuni* ve %19 oranında *C. coli* identifiye edildiği bildirilmiştir (8).

Campylobacter'lerin dışkı örneklerinde tür ve tip düzeyinde saptanmasında kültür bazlı konvasiyonel yöntemler kullanılması dışında moleküler yöntemler de yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (147). Dışkı örneklerinden bakterinin izolasyonuna gerek duymaksızın tür ve tip düzeyinde tanıyı mümkün kılan moleküler yöntemlerle, bakteri sayısının kültürde izolasyon için gerekli olan sınırın altında olması halinde bile yüksek duyarlılıkta pozitif sonuçlar elde edilebilmektedir (148).

Houng ve arkadaşları 358 gastroenteritli çocuktan aldıkları dışkı örneklerinin kültür yöntemi ve *ceuE* bazlı multipleks PZR ile termofilik *Campylobacter* türleri yönünden araştırılmışlardır. Araştırmada PZR ile dışkı örneklerinin %77'sinin, kültür yöntemi ile de %56'sının *Campylobacter* yönünden pozitif bulunduğu bildirilmiştir.

Çalışmada örneklerin %24,86'sının kültür yöntemi ile negatifken PZR yöntemi ile pozitif olarak tesbit edildiği, buna karşılık %4,47'sinin kültür yöntemi ile pozitifken PZR yöntemi ile negatif olarak tesbit edildiği bildirilmiştir (149).

Bizim yaptığımız çalışmada ise bu durumun aksine selektif besiyerleri kullanılarak yapılan kültür yöntemleri ile %4,46 oranında *Campylobacter* izole edilirken, PZR-RFLP yöntemi ile %4,09 oranında pozitiflik elde edildi. Çalışmada kültür yöntemi ile pozitif bulunan iki örnek moleküler yöntemlerle negatif olarak bulundu. Çalışmamızda tanı amacıyla kullandığımız yöntemler arasında duyarlılık yönünden anlamlı bir fark olmadığı saptanmış olup, moleküler yöntemlerin de şartları uygun olan laboratuvarlarda kültür yöntemine alternatif olarak kullanılabilceği düşünüldü.

Kulkarni ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 343 gastroenteritli hastanın dışkı örneği incelenmiş, kültür için dışkı örnekleri; mCCDA besiyeri ve membran filtrasyon yöntemi kullanılmıştır. Kültür yöntemi ve dışkı örneklerinden elde edilen DNA ekstraktları termofilik *Campylobacter* türleri için spesifik olan 16S rDNA geni üzerindeki hedef bölgenin tespiti için PZR ile amplifiye edilmiştir. Kullanılan yöntemlerden en az birisi ile örneklerin 23 (%6,7)'ü *Campylobacter* yönünden pozitif bulunmuştur. Dışkı DNA ekstraktlarının 20 (%5,8)'sinde 16S rDNA geni üzerinde hedeflenen dizilerin varlığı belirlenirken, mCCDA besiyeri ve membran filtrasyon sonrası kanlı besiyerine yapılan ekimlerde ise sırası ile 17 (%4,9) ve 12 (%3,5)'sinde termofilik *Campylobacter*'lerin ürediği bildirilmiştir. Araştırmacılar; bu çalışmada tanı amacı ile kullandıkları metodlar arasında duyarlılık yönünden anlamlı bir farklılığın bulunmadığını ve PZR yönteminin kültür yöntemine alternatif olarak kullanılabilceğini bildirmişlerdir (150).

Bizim çalışmamızda da 537 dışkı örneği klasik kültür ve PZR-RFLP ile değerlendirildi. 537 hastanın dışkı örneğinden direkt DNA izolasyon yapılarak 22 (%4,09) örnekte, seçici besiyerler kullanılarak yapılan kültür ile 24 örnekte (%4,46) pozitiflik saptandı.

Steinhauserova ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada termofilik *Campylobacter*'lerin identifikasyonunda klasik kültür ve moleküler yöntemler karşılaştırılmış, insanlardan elde edilen ve klasik kültür yöntemi ile 62'si *C. jejuni*, 28'i *C. coli* olarak ident edilen 90 termofilik *Campylobacter* suşu 23S rDNA-RFLP yöntemi

ile tiplendirilmiştir. Klasik yöntemle *C. jejuni* olarak tanımlanan *Campylobacter* izolatlarının 58'i PZR-RFLP'de *C. jejuni* olarak saptanırken dördü ise *C. coli* ile uyumlu bulunmamıştır. Çalışmada *C. coli* olarak tanımlanan izolatların tamamının PZR-RFLP'de *C. coli* ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir (151).

Polat ve arkadaşlarının Adana ve bölgesinde yaptıkları çalışmada ise erişkin ve çocuk hastalara ait 434 dışkı örneğinde klasik ve PZR-RFLP yöntemi ile *Campylobacter* türleri araştırılmış ve bu çalışmada klasik yöntemle örneklerin %5,1'de PZR-RFLP ile de %4,5'de *Campylobacter* pozitif bulunmuştur. Bu çalışmada hippurat hidroliz testi baz alınarak kültürde izole edilen 17 izolatın 13'ü (%76,5) *C. jejuni* olarak tiplendirilirken aynı izolatlar PZR-RFLP yöntemi tiplendirildiğinde ise 14 (%84,2) izolat *C. jejuni* olarak tiplendirilmiştir. Çalışmada araştırmacılar dışkıda *Campylobacter* tanısında ve tür düzeyinde tanımlanmasında moleküler yöntemlerin daha duyarlı olduğu belirtilmiştir (97).

Bizim çalışmamızda ise hippurat hidroliz testi baz alınarak, kültürde izole edilen 24 izolatın 22 (%82,4)'si *C. jejuni*, 2 (%17,6)'si de *C. coli* olarak tanımlandı. Aynı izolatlar PZR-RFLP ile tiplendirildiğinde ; benzer şekilde 22 (%82,4) izolatın *C. jejuni*, 2 izolatın (%17,6) *C. coli* ile uyumlu fragment profili sergilediği tespit edildi. Klasik kültür yöntemi ile tanımlanan izolatların PZR-RFLP sonuçlarında uyumsuzluk görülmedi.

Dışkıdan direkt DNA ekstraksiyonu yapılarak uygulanan PZR-RFLP yönteminde ise 22 izolat (%4,09) *C. jejuni* olarak tanımlandı, klasik ve moleküler yöntemle *Campylobacter* pozitifliği bulunan iki izolat dışkıdan direkt yapılan PZR yöntemi ile pozitif bulunmadı. Bizim çalışmamızda Polat ve arkadaşlarının çalışmasının aksine tanı ve tanımlanmasında klasik ve moleküler yöntem arasında duyarlılık açısından bir fark belirlenmedi.

Campylobacter'lerin insanlara geçişi indirekt yolla kontamine çeşitli besin ve sularla yada direk yolla infekte insan veya hayvanlardan fekal materyalle olabilmektedir. Yaz aktiviteleri, mangal ve ızgarada yapılan yiyeceklerin tüketilmesi, kirli suların içilmesi, evde kedi köpek ve benzeri hayvan beslemek, bunlarla temasta bulunmak *Campylobacter* infeksiyonları için riski arttırmaktadır (152).

Çalışmamızda *Campylobacter* izole ettiğimiz 24 olgu incelendiğinde olgularımızın sporadik olduğu belirlenmiş ve özel bir infeksiyon kaynağı saptanmamıştır.

Campylobacter infeksiyonlarında evde beslenen hayvanlarla temasın önemli bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir. İngiltere’de 2005-2006 yıllarında risk faktörleri ile ilgili yapılan bir çalışmada bulaşta en yüksek risk faktörünün hazır tavuk eti tüketimi olduğu, evde beslenen hayvanlarında bulaştırmada etken olabileceği bildirilmiştir (153).

Bizim çalışmamızda *Campylobacter* izole edilen hastaların önceden doldurulan formları incelendiğinde bu hastaların hiç birinin evde hayvan beslemediği ve tavuk eti tüketiminin olmadığı görülmüştür.

Campylobacter’ler ile oluşan gastroenteritler sıcak ve nemli aylarda daha yaygın olarak gözlenmekte özellikle Mayıs ayında başlayan, Temmuzda zirveye ulaşan ve sürekli azalarak Aralık’ta en alt düzeye inen tutarlı bir grafik göstermektedir.

Campylobacter infeksiyonu genel olarak yaz mevsiminde belirgin bir artış göstermektedir (145).

Öztürk ve arkadaşları tarafından İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarında yapılan ve iki yıllık bir süreyi kapsayan çalışmada *Campylobacter*’lerin görülme sıklığının Mayıs-Kasım ayları arasında artıp, Ağustos ayında en yüksek orana ulaştığı, Aralık-Nisan ayları arasında ise belirgin bir azalma olduğu bildirilmiştir. Yaptıkları bu çalışmada 0-2 yaş grubundaki 261 olgunun 15’inde (%5,74), 3-6 yaş grubundaki 101 olgunun 6’sında (%5,94), 7-14 yaş grubundaki 38 olgunun 2’sinde (%5,26) *Campylobacter* izole edilmiştir (4).

Yıldırım ve arkadaşları ise bir yıllık süre boyunca Kayseri ve yöresinde yaptıkları çalışmada Haziran ve Ekim ayları arasındaki dönemde *Campylobacter* üretebildiklerini bildirmişlerdir (154).

Bizim çalışmamızda ise izolatlarımızın ikisi (%8,3) Mayıs ayında, dördü (%16,6) Haziran ayında, 11 (%45,8)’i Temmuz ayında, beşi Ağustos ayında (%2,8), ikisi ise (%8,3) Eylül ayında izole edildi. İzolatlarımızın %45,8’i Temmuz ayında izole edildi, diğer aylara göre daha sık görülmesi istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). Yaptığımız çalışmada en yüksek izolasyon oranı Temmuz ayında olmuş ve ülkemizde yapılan diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

Campylobacter gastroenteritlerinin görülme yaşı ülkelerin gelişme derecesi ile ilgili olmaktadır. Gelişmiş ülkelerde tüm yaş gruplarındaki kişilerde *Campylobacter* enteriti meydana gelebilmektedir. Çocukluk çağında görülen *Campylobacter* infeksiyonları gelişmiş ülkelerde %1-13 görülme sıklığı arasında iken gelişmekte olan ülkelerde ise %5-35 oranında görülmektedir (155). Gelişmekte olan ülkelerde sosyoekonomik ve hijyenik nedenlerle infeksiyonla erken yaşta karşılaşma riski daha yüksek olmakta bu nedenle *Campylobacter* infeksiyonları özellikle beş yaş altı çocuklarda sık izlenmektedir. Yapılan çalışmalarda gelişmekte olan ülkelerde insidansın beş yaş altındaki çocuklarda 40.000-60.000/100.000 olarak bildirilmiştir (155).

Uganda'da 0-5 yaş çocukluk çağı ishallerinde görülme sıklığı ile ilgili yapılan çalışmada %9,3 *Campylobacter* spp. izole edilirken izolasyon oranı Tanzanya'da %18 ve Kenya'da %11 olarak tespit edilmiştir (156, 157).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda da *Campylobacter*'lerin izolasyon oranının 0-5 yaş grubundaki çocuklarda fazla olduğu ve özellikle de 2 yaşın altındaki çocuklarda daha sık izole edildiği gözlenmiştir (154).

Bizim çalışmamızda izole edilen *C. jejuni* izolatları incelendiğinde 11 (%50)'inin 0-2 yaş grubunda, altı (%27,3)'sının 3-5 yaş grubunda, beş (%22,7)'inin ise 6-14 yaş grubunda olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda en sık izolasyon 0-2 yaş grubunda olmuştur. 0-2 yaş grubunda *Campylobacter* izolasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark ($p < 0,05$) saptanmıştır.

Campylobacter infeksiyonları sosyoekonomik düzeyi düşük olan yerlerde gözlenen gastroenteritlerin önde gelen nedenleri arasında yer almaktadır (158).

Çalışmamızda *Campylobacter* izole edilen çocukların aileler tarafından verilen bilgilerle doldurulan formları incelendiğinde sosyoekonomik düzeylerinin düşük olduğu belirlenmiştir.

Campylobacter virülansı multifaktöriyel olmakta bazı suşlar invaziv bazı suşları sulu gastroenterit oluşturmaktadır. Sitotoksinin inflamatuvar gastroenterite, enterotoksinin ise sulu gastroenterite yol açtığı düşünülmektedir. Gelişmiş ülkelerde *Campylobacter* enteritleri daha çok dizanterik formda kanlı-mukuslu, gelişmekte olan ülkelerde ise sulu gastroenterite neden olduğu bildirilmektedir (112).

Çalışmamızda 24 *Campylobacter* suşu izole edilen dışkılar incelendiğinde sekizi (%33,3) mukuslu, ikisi (%8,3) kanlı ve mukuslu, dördü (%16,6) sulu, yedisi

(%29,1) yarı katı, üçü (%12,5) katı olarak tespit edilmiştir. Sulu yada dizanterik formda gastroenterit gözlenmesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p >0.05$).

Dışkıda lökosit varlığı ile *Campylobacter* enteritleri arasında yakın bir ilişki saptanamadığı bildirilmiştir. Kültür pozitifliği olan olguların %25 ile %80'inde dışkıda lökosit bulunmuştur (28).

Uysal ve arkadaşlarının Ankara'da yaptıkları çalışmada 1 ay- 14 yaş grubu çocuklarda dışkı örneklerinde % 8,25 oranında *C. jejuni* üremesi saptanmış, bu hastaların dışkı örneklerinin %57,57'sinde eritrosit ve lökosit saptanmamıştır. Çalışmada sulu yada dizanterik formda gastroenterit gözlenmesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (158).

Bizim çalışmamızda da izole edilen 24 *Campylobacter* izolatının 13 (%54,1)'ünde dışkının mikroskopik incelemesinde lökosit vardı. Makroskopik kan veya mikroskopik eritrosit sadece dördünde (%16,6) bulundu. Dolayısıyla mikroskopik incelemede lökosit varlığı tanıyı güçlendirse de dışkı incelemesinde lökosit bulunmayan 11 örnekte *Campylobacter* türünün izole edilmesi, dışkıda lökosit varlığının anlamlı olmadığını düşündürmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bölgemizde görülen çocukluk çağı akut gastroenteritlerin etiolojisinde termofilik *Campylobacter* türlerinin görülme sıklığını belirlemek için bu çalışma 1 Ekim 2008-30 Eylül 2009 tarihleri arasında yapıldı. Çalışmaya gastroenterit yakınması ile başvuran yaşları 0-14 arasında olan 309 erkek, 228 kız toplam 537 hasta dahil edildi. 537 hastanın dışkı örneği Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda termofilik *Campylobacter* türleri yönünden konvansiyonel kültür yöntemleri ve PZR-RFLP yöntemi ile incelendi.

- Çalışmaya aldığımız gastroenteritli olguların dışkı örneklerinde selektif besiyerleri kullanılarak yapılan kültür yöntemleri ile 24 (%4,46) *Campylobacter* izole edilirken, PZR-RFLP yöntemi ile 22 (%4,09) hastada termofilik *Campylobacter*'lere ait hedef diziler tespit edildi.
- İzolatlarımız 22'si *C. jejuni* ikisi *C. coli* olarak tiplendirildi.
- İzole edilen 24 izolatın onu (%41.6) kız çocuklarında, 14'ü (%58.4) erkek çocuklarında saptandı.
- Yaş gruplarına göre izolatların 12'si (%50) 0-2 yaş grubunda, altısı (%25) 3-5 yaş grubunda, altı (%50) izolatta 6-14 yaş grubu çocuklarda izole edildi.
- En sık izolasyon 0-2 yaş grubunda görüldü bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$).
- Dışkı izolatlarının fenotipik yöntemlerle tiplendirilmesinde hippurat hidroliz testi pozitif olarak belirlenip, *C. jejuni* tanısı alan 22 izolat PZR/RFLP testi ile *C. jejuni* ile uyumlu fragment profili gösterdi. Çalışmada hippurat hidroliz testi negatif olarak belirlenen ve fenotipik olarak *C. jejuni* düşünülmeyen iki izolat PZR yöntemi ile *C. coli* ile uyumlu bant paterni gösterdi. Seçici kültür teknikleri ile termofilik *Campylobacter* tespit edilen dışkı örneklerinden 2 (% 8,33)'si PZR ile negatif bulunmuş olup buna neden olarak dışkı örneğinde bakteri sayısının az olması, inhibitör maddelerin varlığı yada uygulanan ekstraksiyon şartlarından kaynaklanabileceği düşünüldü.

- İzole edilen 24 *Campylobacter* türünün 13 (%54,1)'ünde dışkının mikroskopik incelemesinde lökosit gözlenirken, 11 (% 45,8)'inde lökosit gözlenmedi.
- İzolasyon yönünden sulu formdaki dışkı ile dizanterik form arasında bir fark saptanmadı ($p>0,05$).
- Çalışmada dışkı örneklerinde *Campylobacter* saptanan çocukların sosyoekonomik düzeyleri düşük olarak tespit edildi.
- Çalışmada *Campylobacter* türleri dışında iki (%0,37) dışkı örneğinde *Salmonella* spp. izole edildi

Sonuçta; bölgemizde çocukluk çağı gastroenteritlerinde *Campylobacter* türleri rutin dışkı kültürlerinde araştırdığımız diğer enterik bakteriyel patojenlerden daha sık görülmektedir (%4.46). Bu nedenle de rutin dışkı kültürlerine *Campylobacter* türlerinin izolasyonuna yönelik seçici besiyerlerinin eklenmesinin ve bunun yanı sıra moleküler laboratuvar imkanlarına sahip ünitelerde moleküler yöntemlerin de tanı amacı ile kullanılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

- 1- **Palanduz A.** Gastrointestinal Enfeksiyon Etkenleri ve Neden Oldukları Klinik Tablolar. *J Pediatr Inf*, **2009**;3:116-8.
- 2- **Öngen B.** Türkiye’de İshal Etkenleri. *ANKEM Derg*, **2006**;2:121-144.
- 3- **Levent B.** *Enfeksiyöz İshaller. Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı ve Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Aylık Epidemiyoloji Raporu*, **2005**;4:3
- 4- **Öztürk R, Midilli K, Okyay K, Eroglu C, Aygün G, Kenani Y, Sarsan A.** Çocuk ve Eriskin Yas Grubu Sürgün Olgularında *Campylobacter jejuni* ve *Campylobacter coli* Sıklığının Araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.*, **1994**;24:42-45.
- 5- **Özbal Y, Öztürk MA, Kurtoglu S, Kılıç H, Dogangünes S, Al M, Çelebi N.** Gastroenteritli Olgulardan Soyutlanan Enteropatojen Mikroorganizmalar. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, **1990**;20: 57-63.
- 6- **Tanyüksel M, Haznedaroglu T, Gün H, Ay YD.** Son Üç Yıl Boyunca Gastroenteritli Olgulardan İzole Edilen Bakteriler. *ANKEM Derg*, **1992**;6(2):164.
- 7- **Trachoo N.** *Campylobacter jejuni* : An emerging pathogen *Songklanakarın J. Sci. Technol*, **2003**;25(1);141-157.
- 8- **Yılmaz A, Tuğrul HM.** Edirne’de İshal Etkenleri Arasında *Campylobacter* Türlerinin Yerinin ve Antimikrobiklere Duyarlılıklarının Araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*, **2005**;19:53-59.
- 9- **Galanis E.** *Campylobacter* and Bacterial Gastroenteritis. *CMAJ*, **2007**;2:176-177.
- 10- Erişim: www.infectiousdisease.dhh.louisiana.gov (Erişim tarihi: 15.09.2010).
- 11- **Blaser MJ.** *Campylobacter jejuni* and related species. *In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Eds. Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th ed. New York: Churchill Livingstone, **2000**:2276-83.
- 12- **Jiang H, Zhang MJ, Liu RC, Tian XY.** Characteristics of lipo-oligosaccharide loci of *Campylobacter jejuni* isolates associated with Guillain-Barré Syndrome from Hebei, China. *Int. J. Mol. Sci*, **2010**;11(3):1155-61.

- 13- **Samuel C.** Emerging Infections Program FoodNet Working Group. Epidemiology of Sporadic *Campylobacter* Infection in the United States and Declining Trend in Incidence FoodNet 1996–1999. Declining Incidence of *Campylobacter*. *CID*, **2004**;3:165-174.

- 14- **Bessell PR, Matthews L, Smith-Palmer A.** Geographic determinants of reported human *Campylobacter* infections in Scotland. *BMC Public Health*, **2010**;10:423.

- 15- **McFadyean J, Stockman S.** Report of the Departmental Committee appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to inquire into Epizootic Abortion. III. Abortion in Sheep. London: HMSO, **1913**

- 16- **JP Butzler.** *Campylobacter* from obscurity to celebrity. *Clin Microbiol Infect*, **2005**; 11(4): 341-2.

- 17- **Smith T.** The etiological relation of Spirilla (*V. foetus*) to bovine abortion. *J Exp Med* **1919**;30: 313-323.

- 18- **Jones FS, Orcutt M, Little RB.** Vibrios (*Vibrio jejuni*) associated with intestinal disorders of cows and calves. *J Exp Med*, **1931**;53:853-864.

- 19- **Vinzent R, Dumas J, Picard N.** Septicémie grave au cours de la grossesse due à un Vibriion. Avortement consécutif. *Bull Acad Nat Med Paris*, **1947**;131:90-92.

- 20- **King EO.** Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related vibrio. *J Infect Dis*, **1957**; 101:119-128.

- 21- **King EO.** The laboratory recognition of *Vibrio fetus* and a closely related *Vibrio* isolated from cases of human vibriosis. *Ann NY Acad Sci*, **1962**;98:700–711.

- 22- **Dekeyser P, Gossuin M, Butzler JP, Sternon J.** Acute enteritis due to a related vibrio: first positive stool cultures. *J Infect Dis*, **1972**; 125: 390–392.

- 23- **Skirrow MB.** *Campylobacter* enteritis: a ‘new’ disease. *BMJ*, **1977**;2: 9-11.

- 24- **Rewit D.** On Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* ve related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *Journal of Applied Microbiology*, **2001**;90: 1-15.

- 25- **Engberg J.** Contributions to the Epidemiology of *Campylobacter* Infections. *Danish Medical Bulletin*, **2006**;53:361-389.

- 26- **Koneman EW, Winn WC, Allen S.** *Campylobacter*. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Lippincott Williams & Wilkins, Sixth Edition, **2006**:393-403.
- 27- **Hansson I.** Bacteriological and Epidemiological Studies of *Campylobacter spp.* in Swedish Broilers. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, **2007**.
- 28- **Fitzgerald C, Nachamkin I, Murray P.** *Campylobacter and Arcobacter*, Manual of Clinical Microbiology ASM Press, 9th Edition, **2007**:933-946.
- 29- **Corry JE, Post DE, Colin P.** Culture media for the Isolation of *Campylobacters*, *Int J Food Microbiol.* **1995**;26(1):43-76.
- 30- **Hazeleger WC, Janse JD.** Temperature-Dependent Membrane Fatty Acid and Cell Physiology Changes in Coccoid Forms of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, **1995**;61:2713–2719.
- 31- **Ketley MJ, Konkel ME.** *Campylobacter Molecular and Cellular Biology*. 1th ed Norfolk: Horizon Bioscience, **2005**.
- 32- **Penner, JL.** The Genus *Campylobacter*: A Decade Of Progress. *J. Clin. Microbiol*, **1988**;26: 157-172.
- 33- **Karin G, Bart CJ, Wouter VR.** 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.
- 34- **Karlyshev A V, Linton D, Gregson N A, Wren B W.** A novel paralogous gene family involved in phase-variable flagella-mediated motility in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*, **2002**;148:473–480.
- 35- **Zheng T.** Structure and genotypic plasticity of the *Campylobacter fetus* *sap* locus. *Molecular Microbiology*, **2003**;48 (3):685–698.
- 36- **Frederic P, Deborah T.** Genomic Diversity in *Campylobacter jejuni*: Identification of *C. jejuni* 81-176-Specific Genes. *Journal of Clinical Microbiology*, **2005**;43:2330–2338.
- 37- **Parkhill J, Wren BW, Mungall K.** The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, **2000**;403:665-668.
- 38- **Dorrell N, Mangan JA, Laing KG.** Whole genome comparison of *Campylobacter jejuni* human isolates using a low-cost microarray reveals extensive genetic diversity. *Genome Res*, **2001**; 11(10):1706-1715.

- 39- **Hansen V, Rosenquist H.** Characterization of *Campylobacter* phages including analysis of host range by selected *Campylobacter* Penner serotypes. *BMC Microbiology*, **2007**;7:1-9.
- 40- **Skirrow MB.** Diseases Due To *Campylobacter*, *Helicobacter* And Related Bacteria. *J. Comp. Path*, **1994**;111:113-149.
- 41- **Cools I, Uyttendaele M, Caro C.** Survival of *Campylobacter jejuni* Strains of Different Origin in Drinking Water. *Journal of Applied Microbiology*, **2003**;94:886-892.
- 42- **Murphy C, Carroll C, Jordan N.** Identification of a novel stress resistance mechanism in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Applied Microbiology*, **2003**;9:704-708.
- 43- **Lazaro B, Jose C.** Viability and DNA Maintenance in Nonculturable Spiral *Campylobacter jejuni* Cells after Long-Term Exposure to Low Temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, **1999**;65:4677-4681.
- 44- **Snelling W, Matsuda M, Moore JE.** Under the Microscope *Campylobacter jejuni*. *J. Appl. Microbiol*, **2005**;41:297-302.
- 45- **Black RE, Levine MM, Clements ML, Hughes TP, Blaser MJ.** Experimental *Campylobacter jejuni* Infection in Humans. *J. Infect. Dis*, **1988**;57:472-479.
- 46- **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.
- 47- **Ketley JM.** Pathogenesis of Enteric *Campylobacter* Infection. *Journal of Applied Microbiology*, **2001**;90:455-565.
- 48- **Newell DG, McBride H, Dolby JM.** Investigations on the Role of Flagella in the Colonization of Infant Mice with *Campylobacter jejuni* and Attachment of *Campylobacter jejuni* to Human Epithelial Cell Lines. *J. Hyg. Camb*, **1985**;95:217-227.
- 49- **Yao R, Burr DH, Doig P, Trust TJ, Nlu H, Guerry P.** Isolation of Motile and Non- Motile Insertional Mutants of *Campylobacter jejuni*: The Role of Motility in Adherence and Invasion of Eukaryotic Cells. *Mol. Microbiol*, **1994**;14:883-893.
- 50- **Moran AP.** Biological and Serological Characterization of *Campylobacter jejuni* Lipopolysaccharides with Deviating Core and Lipid A Structures. *FEMS Immunol. Med. Microbio*, **1995**;11:121-130.
- 51- **Aspinall GO, McDonald AG, Pang H, Kurjanczyk LA, Penner JL.** Lipopolysaccharides of *Campylobacter jejuni* Serotype O:19 Structures of Core Oligosaccharide Regions from the Serostrain and Two Bacterial Isolates From Patients with the Guillain-Barré Syndrome. *Biochem*, **1994**;33:241-249.

- 52- **Pei Z, Ellison RT, Blaser MJ.** Identification, Purification and Characterization of Major Antigenic Proteins of *Campylobacter jejuni*. *J. Biol. Chem*, **1991**;266:16363-16369.
- 53- **Konkel ME, Garvis SG, Tipton SL, Erson DE, Cieplak W.** Identification and Molecular Cloning of a Gene Encoding a Fibronectin Binding Protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Mol. Microbiol*, **1997**;24:953-963.
- 54- **Wassenaar TM.** Genotyping of *Campylobacter* spp. Infections of Humans. *Applied and Environmental Microbiology*, **2000**;66(1):1-9.
- 55- **Doig P, Yao R, Burr DH, Guerry P, Trust TJ.** An Environmentally Regulated Pilus-Like Appendage Involved in *Campylobacter* Pathogenesis. *Mol. Microbiol*, **1996**;20:885- 894.
- 56- **Florin I, Antillon F.** Production of Enterotoxin and Cytotoxin in *Campylobacter jejuni* Strains Isolated in Costa Rica. *J. Med. Microbiol*, **1992**;37:22-29.
- 57- **Moore MA, Blaser MJ, Perez-Perez GI, O'Brien AD.** Production of a Shiga-Like Cytotoxin by *Campylobacter*. *Microb Pathog*, **1988**;4(6):455-62.
- 58- **Poly F, Guerry P.** Pathogenesis of *Campylobacter*. *Current Opinion in Gastroenterology*, **2008**; 24:27-31.
- 59- **Talukder KA, Aslam M, Islam Z.** Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal patients in Bangladesh. *J Clin Microbiol*, **2008**; 46(4): 1485-8.
- 60- **Allos BM, Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR.** *Campylobacter* Infectious Diseases, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 3rd Edition, **2004**:1686-1691.
- 61- **Fox EM, Raftery M, Goodchild A, Mendz GL.** *Campylobacter jejuni* response to ox-bile stress. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*, **2007**;49:165-172.
- 62- **Dasti JI.** *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *International Journal of Medical Microbiology*, **2010**;300(4): 205-211.
- 63- **Karlyshev A, Ketley JM, Brendan W.** The *Campylobacter jejuni* glycome. *FEMS Microbiology Reviews*, **2005**;29:377-390.
- 64- **Bacon DJ, Alm RA, Burr DH.** Involvement of a Plasmid in Virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infection and Immunity*, **2000**;68:4384-4390.

- 65- **Tracz D, Keelan M.** pVir and Bloody Diarrhea in *Campylobacter jejuni* Enteritis. *Emerging Infectious Diseases*, **2005**;11:838-843.
- 66- **Irving N.** Chronic effects of *Campylobacter* infection. *Microbes and Infection*, **2002**;4:399-403.
- 67- **Hooper DC.** Emerging Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance. *Emerging Infectious Disease*, **2001**;2:337-341.
- 68- **Engberg J, Aaresstorp F.** Quinolone and Macrolide Resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: Resistance Mechanisms and Trends in Human Isolates. *Emerging Infectious Disease*, **2001**; 7: 24-34.
- 69- **Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV.** Food Related Illness and Death in the United States. *Emerg Infect Dis*, **1999**;5:607-625.
- 70- **Dakdouki GK, Araj GF, Hussein M.** *Campylobacter jejuni*: Unusual Cause of Cholecystitis with Lithiasis. *Clin Microbiol Infect*, **2003** 9:970-972.
- 71- **Lim A, Lydia A, Rim H, Dowling J.** Focal segmental glomerulosclerosis and Guillain-Barre syndrome associated with *Campylobacter* enteritis. *Internal Medicine Journal*, **2007**;37(10):724-728.
- 72- **Uzoigwe C.** *Campylobacter* Infections of the Pericardium and Myocardium. *Clin Microbiol Infect*, **2005**;11:253-255.
- 73- **Sivadon TV, Orlikowski D.** Detection of *Campylobacter jejuni* by culture and real-time PCR in a French cohort of patients with Guillain-Barre syndrome. *J Clin Microbiol*, **2010**;48(6):2278-81.
- 74- **Koçer A.** Guillain-Barre: Klinik ve Prognostik Özellikler. *Fırat Tıp Dergisi*, **2004**;9(4):108-111.
- 75- **Prendergast M, Kosunen T.** Development of an Immunoassay for Rapid Detection of Ganglioside GM1 Mimicry in *Campylobacter jejuni* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, **2001**;39(4):1494-1500.
- 76- **Rees JH, Soudain SE, Gregson NA, Hughes RA.** A prospective case control study to investigate the relationship between *Campylobacter jejuni* infection and Guillain-Barre syndrome. *N Engl J Med*, **1995**;333:1374-1379.
- 77- **Takahashi M, Koga M, Yokoyama K.** Epidemiology of *Campylobacter jejuni* Isolated from Patients with Guillain-Barre' and Fisher Syndromes in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, **2005**;43(1):335-339.

- 78- **Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G.** Curved Gram negative bacilli and oxidase positive fermenters: Campylobacteraceae and Vibrionaceae. In: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, **2006**:321-361.
- 79- **Corry JE, Atabay HI.** Poultry as a Source of *Campylobacter* and Related Organisms. *Appl. Microbiol*, **2001**;30:96-114.
- 80- **Nielsen EM, Engberg J, Fussing V, Petersen L, Brogren CH.** Evaluation of Phenotypic and Genotypic Methods for Subtyping *Campylobacter jejuni* Isolates from Humans, Poultry and Cattle. *J. Clin. Microbiol*, **2000**;38:3800-3810.
- 81- **Morgan D, Gunneberg C, Gunnell D, Healing TD, Lamerton S, Soltanpoor N, Lewis DA, White DG.** An Outbreak of *Campylobacter* Infection Associated with the Consumption of Unpasteurised Milk at a Large Festival in England. *Eur. J. Epidemiol*, **1994**;10:581-585.
- 82- **Stanley KN, Wallace JS, Currie JE, Diggle PJ, Jones K.** Seasonal Variation of Thermophilic Campylobacters in Lambs at Slaughter. *J. Appl. Microbiol*, **1998**;84:1111-1116.
- 83- **Han XY, Tarrand J, Rice D.** Oral *Campylobacter* Species Involved in Extraoral Abscess: a Report of Three Cases. *Journal of Clinical Microbiology*, **2005**;43(5):2513–2515.
- 84- **Evans R, Ribeiro C, Salmon L.** Hazards of Healthy Living: Bottled Water and Salad Vegetables as Risk Factors for *Campylobacter* Infection. *Emerging Infectious Diseases*, **2003**;9:1232-1242.
- 85- **Metzng L.** Waterborne outbreaks of *Campylobacter* enteritis in central Sweden. *Lancet*, **1981**; 8:352-354.
- 86- Preliminary Food Net data on the incidence of food-borne illnesses-selected sites US. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, **2002**;19(51):325-329.
- 87- **Altekruse SF, Stern NJ, Fields PI, Swerdlow DL.** *Campylobacter jejuni*-an emerging foodborne pathogen. *Emerg. Infect. Dis*, **1999**;5:28-35.
- 88- **Vuckovic D, Abram M, Bubonja M, Wraber B, Doric M.** Host Resistance to Primary and Secondary *Campylobacter jejuni* Infections in C57Bl/6 Mice. *Microb. Pathog*, **2006**;40:35-39.
- 89- **Walker RI, Caldwell MB, Lee EC, Guerry P, Trust TJ.** Pathophysiology of *Campylobacter* Enteritis. *Microbiol. Rev*, **1986**;50:81-94.
- 90- **Wassenaar TM, Blaser MJ.** Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* Infections of Humans. *Microbes Infect*, **1999**;1:1023-1033.

- 91- **Jerris RC, Fields PI, Isenberg HD.** Fecal Culture for *Campylobacter* and Related Organisms, Clinical Microbiology Procedures Handbook 2nd ed. ASM Press, Washington, **2004**:3821-3829
- 92- **Wang Wen-Lan L, Reller L, Blaser M.** Evaluation of Transport Media for *Campylobacter jejuni* in Human Fecal Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, **1983**;18:803-807.
- 93- **Luechtefeld W, Wang Wen-Lan L, Blaser M, Reller L.** Evaluation of Transport and Storage Techniques for Isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from Fecal Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, **1981**;13:438-443.
- 94- **Cody WL, Wilson J, Hendrixson DR.** Skim Milk Enhances the Preservation of Thawed -80 °C Bacterial Stocks. *Journal of Microbiological Methods*, **2008**:135-138.
- 95- **Mshana SE, Joloba ML.** Role of microscopic examination of stool specimens in the diagnosis of campylobacter infection from children with acute diarrhoea in Kampala, Uganda. *Tanzan J Health Res*, **2010**;12(1):100-3.
- 96- **Wang H, Murdoch DR.** Detection of *Campylobacter* species in faecal samples by direct Gram stain microscopy. *Pathology*, **2004**;36(4):343-4.
- 97- **Polat E.** Akut İshallerde *Campylobacter jejuni* ve Diğer Etyolojik Ajanların Hızlı Tanısında Moleküler Yöntemlerin Değeri Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adana **2008**.
- 98- **Engberg J, Gerner-Smidt P, Harrington CS.** Efficient isolation of *Campylobacter* from stools. *J. Clin. Microbol*, **2000**;38(7):2798-2799 .
- 99- **Yıldız Ç.** Mersin Bölgesinde Yaşayan Çocuklarda *Campylobacter upsaliensis* ve Diğer *Campylobacter* Türlerinin Görülme Sıklığı. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin **2004**.
- 100- **Cheryl A.** Trimethoprim Activity in Media Selective for *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbol*, **1982**;11:808-812.
- 101- **York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M, Isenberg HD.** Biochemical Tests for the Identification of Aerobic Bacteria, Clinical Microbiology Procedures Handbook 2nd ed. ASM Press, Washington, **2004**:3.17.1.1-3.17.48.3.
- 102- **Karmali MA, Simor AE, Roscoe M, Fleming PC, Smith SS, Lane J.** Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces. *J Clin Microbiol*, **1986**;23(3):456-459.
- 103- **Merino F J, Agulla A, Villasante PA.** Comparative Efficacy of Seven Selective Media for Isolating *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbol*, **1986**;9:451-452.

- 104-**Modolo JR.** The comparison of the Butzler Medium, Filtration Technique and Their Association with Isolation of *Campylobacter* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **2000**;33(2): 223-224.
- 105-**Morris GK.** Comparison of four hippurate hydrolysis methods for identification of thermophilic *Campylobacter* spp. *J. Clin. Microbiol*, **1985**;22:714-718.
- 106-**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. Microbiol*, **2000**;8:3076–3079.
- 107-**Tolcin R, Lasalvia MM, Kirkley BA.** Evaluation of the Alexon-Trend ProSpecT *Campylobacter* Microplate Assay. *J. Clin. Microbiol*, **2000**;10:3853–3855.
- 108-**Rudi K, Hoidal HK.** Direct real-time PCR quantification of *Campylobacter jejuni* in chicken fecal and cecal samples by integrated cell concentration and DNA purification. *Appl Environ Microbiol*, **2004**;70(2):790-7.
- 109-**O'Leary J, Corcoran D.** Comparison of the EntericBio multiplex PCR system with routine culture for detection of bacterial enteric pathogens. *J Clin Microbiol*, **2009**;47(11):3449-53.
- 110-**Taylor BV, Williamson J, Luck J.** Sensitivity and Specificity of Serology in Determining Recent Acute *Campylobacter* Infection. *Internal Medicine Journal*, **2004**;34:250–258.
- 111-**Ang CW, Krogfelt K, Herbrink P, Keijser J.** Validation of an ELISA for the diagnosis of recent *Campylobacter* infections in Guillain-Barré and reactive arthritis patients. *Clin Microbiol Infections*, **2007**;13(9):915-22.
- 112-**Akitoye O, Raphael D.** Human Campylobacteriosis in Developing Countries. *Emerg Infect Dis*, **2002**;8(3):237-243.
- 113-Foodborne Diseases Active Surveillance Network (Foodnet). *Morbidity & Mortality Weekly Report*, **2010**;59:31.
- 114-**D Vugia.** Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food 10 States 2008. *Morbidity & Mortality Weekly Report*, **2009**;58(13):333-337.
- 115-**Nyachuba DG.** Foodborne illness: is it on the rise? *Nutr Rev*, **2010**;68:257-69.
- 116- **Juan B.** Incidence Of Sporadic Cases Of The Intestinal Infections Most Frequent In Castellón, Spain. *Rev. Esp. Salud Publica*, **2003**;77(5):629-638.

- 117-Sadkowska M, Kucharczyk B. Campylobacteriosis in Poland in 2008. *Przegl Epidemiol*. **2010**;64(2):217-9.
- 118-Fullerton K. Monitoring the incidence and causes of diseases potentially transmitted by food in Australia: annual report of the OzFoodNet Network, 2007 *Commun Dis Intell*, **2008**;32(4):400-24.
- 119-Gillespie IA, O'Brien SJ, Bolton FJ. Age Patterns of Persons with Campylobacteriosis, England and Wales, 1990–2007. *Emerging Infectious Diseases*, **2009**;15:12.
- 120-Kanan B, Akşit F. Akut Gastroenteritli Olgularda *Campylobacter* Sıklığının Araştırılması. *Enfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*, **2003**;17 (1):11-14.
- 121-Öngen B. Türkiye'de ishal etkenleri. *ANKEM Derg*, **2007**;21(1):37-41.
- 122-Blaser M J. Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. *J. Infect. Dis*, **1997**;176:103-105.
- 123-Pacanowski J, Lalande V, Lacombe K, Boudraa C, Lesprit P, Legrand P. Campylobacter bacteremia: clinical features and factors associated with fatal outcome. *Clin Infect Dis*, **2008**;47(6):790-6.
- 124-Blaser MJ, Allos BM, Mandel GL. *Campylobacter* and Related Species, Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier Inc. 6th edition Pennsylvania, **2005**: 2548- 2557.
- 125-Jensen LA, Marlin JW, Dyck DD, Laubach HE. Prevalence of multi-gastrointestinal infections with helminth, protozoan and *Campylobacter spp.* in Guatemalan children. *J Infect Developing Countries* **2009**;3(3):229-23.
- 126-Nachamkin I. Chronic effects of *Campylobacter* infection. *Microbes and Infection*, **2002**;4:399-403.
- 127-Sopwith, W, Ashton M. Enhanced Surveillance Of *Campylobacter* Infection In The North West Of England 1997-1999. *J. Infect*, **2003**;46:35-45.
- 128-Stuart TL, Sandhu J. Campylobacteriosis outbreak associated with ingestion of mud during a mountain bike race. *Epidemiol Infect*, **2010**;25:1-9.
- 129-Caeiro JP, Mathewson JJ, Smitfl MA, Jiang ZD. Etiology of outpatient pediatric nondysenteric diarrhea: a multicenter study in the United States. *Pediatr Infect Dis*, **1999**;18:94-97.

- 130-**Steele T, Sangster N, Lanser A.** DNA relatedness and biochemical features of *Campylobacter* spp. isolated in Central and South Australia. *J.Clin.Microbiology*, **1985**;22:71-74.
- 131-**Bilgehan H.** *Besiyerleri Ayıraçlar ve Deneyler, Klinik Mikrobiyolojik Tanı* 4. Basım, İzmir: Fakülteler Kitapevi Barış Yayınları, **2004**:649-731.
- 132-Clinical Laboratory Standarts Institute (CLSI). Antimikrobik Duyarlılık Testleri için Standartları; Onaltıncı Bilgi Eki, MS100-S16, **2006**;26:3.
- 133-**Fermer CH, Engvall EO.** Specific PCR identification and differentiation of the thermophilic campylobacters, *C. jejuni*, *C. coli*, *C.lari* and *C.upsaliensis*. *J. Clin. Microbiol*, **1999**;37:3370-3373.
- 134-**Taş E, Ardıç N.** Akut Gastroenteritli Olgularda Termofilik *Campylobacter*, *E. coli* O157:H7 ve Rotavirüs Sıklığı. *Klinik Dergisi*, **2004**;17(3):186-190.
- 135-**Maltezou HC, Zafiropoulou A, Mavrikou M.** Acute Diarrhoea in Children Treated in an Outpatient Setting in Athens, Greec. *Journal of Infection*, **2001**;43:122-127.
- 136-**Buhari A, Murad L.** Surveillance of bacterial pathogens of diarrhea disease in Indonesia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **2002**;44:227-234.
- 137-**Charmaine G, Herbert G.** Laboratory surveillance of communicable diseases: enteric pathogens. *Malta Medical Journal*, **2007**;19:27-31.
- 138-CDC. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (Foodnet). Morbidity and Mortality Weekly Report, 2006;55(14):392-395.
- 139-**Shu W, Luang C.** Campylobacter enteritis in children in Northern Taiwan a 7 year experience. *J Microbiol Immunol Infect*, **2008**;41:408-413.
- 140-**Dayan N, Revivo D.** *Campylobacter* is the leading cause of bacterial gastroenteritis and dysentery in hospitalized children in the Western Galilee Region in Israel. *Epidemiol. Infect*, **2010**; 138: 1405-1406.
- 141-**Ali AM, Qureshi AH, Rafi S.** Frequency of *Campylobacter jejuni* in Diarrhoea Dysentery in Children in Rawalpindi and Islamabad. *JPMA*, **2003**;53: 517-520.
- 142-**Ivanova K, Marina M, Petrov P.** Campylobacteriosis and other bacterial gastrointestinal diseases in Sofia, Bulgaria for the period 1987-2008. *Euro Surveill*. **2010**;15(4):1947-58.
- 143-**Sorokin M, Usein CR, Irimia M.** A laboratory-based survey of *Campylobacter* infections in Prahova County. *Roum Arch Microbiol Immunol*. **2007**;66(3):85-9.

- 144-**Abu-Elamreen FH, Abed AA, Sharif FA.** Viral, bacterial and parasitic etiology of pediatric diarrhea in Gaza, Palestine. *Med Princ Pract*, **2008**;17(4):296-301.
- 145-**Öngen B, Nazik H, Kaya I.** Rutin dışkı kültürlerinde üretilen *Campylobacter* türleri ve Antibiyotik Duyarlılıkları: 5 Yıllık Sonuçların Değerlendirilmesi. *Ankem Dergisi* **2007**; 21(1):37-41.
- 146-**Giesendorf BA, Quint WG.** Detection and identification of *Campylobacter spp.* using the polymerase chain reaction. *Cell Mol Biol*,**1995**;41(5) :625-38.
- 147-**Hubert P.** Comparison of Six Media, Including a Semisolid Agar, for the Isolation of Various *Campylobacter* Species from Stool Specimens. *Journal Of Clinical Microbiology*, **1991**;29(5):1007-1010.
- 148-**Amar C, East CL, Gray J.** Detection by PCR of eight groups of enteric pathogens in 4,627 faecal samples: re-examination of the English case-control Infectious Intestinal Disease Study (1993–1996). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **2007**; 26:311–323.
- 149-**Houng 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.
- 150-**Kulkarni SP, Lever S, Logan J, Lawson AJ, Stanley J, Shafi MS.** Detection of campylobacter species: a comparison of culture and polymerase chain reaction based methods *J Clin.Pathol*, **2002**; 55:749-753.
- 151-**Steinhauserova I.** Identification of thermophilic *Campylobacter spp.* by phenotypic and molecular methods. *J Appl. Microbiol*, **2001**;90:470-475.
- 152-**Eleni G.** *Campylobacter* and bacterial gastroenteritis_ *CMAJ*, **2007**;177: 570–571.
- 153-**Tam C, Higgins D.** Chicken Consumption and Use of Acid-Suppressing Medications as Risk Factors for *Campylobacter* Enteritis, England. *Emerging Infectious Diseases*, **2009**;15(9):1402-1408.
- 154-**Yıldırım MS, Fazlı ŞA.** Kayseri ve yöresinde bakteriyolojik kültür için gönderilen dışkı örneklerinde *Campylobacter*'lerin izolasyonu ve identifikasyonu. *İnfek Derg*, **1998**; 12: 317-22.
- 155-**Mshana SE.** *Campylobacter spp* among Children with acute diarrhea attending Mulago hospital in Kampala – Uganda. *Afr Health Sci*, **2009**; 9(3):201–205.

- 156-Lindblom GB, Abren C, Changalucha J, Gabone R. *Campylobacter jejuni/coli* and Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in feces from children and adults in Tanzania. *Scand J of Infect Dis*, **1995**; 27:589–593.
- 157-Gaudreau C. Comparison of disc diffusion and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Antimicrobial Chemother*, **1997**;39:707–712.
- 158-Doorduyn Y, Van Den Brandhof WE. Risk factors for indigenous *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections in The Netherlands: a case-control study. *Epidemiology and Infection*, **2010**; 138: 1391-1404.
- 159-Uysal G. Çocukluk Çağı Akut Gastroenteritlerinde *Campylobacter jejuni*'nin yeri, Pediatrik İnfeksiyon Hastalıkları Uzmanlık Tezi, Ankara 2005.

Ek 1:

Çalışma Sorgulama Formu

Adı-Soyadı : Dosya no:
Cinsiyet : Başvuru tarihi
Doğum tarihi :
Adresi :
Evde yaşayan kişi sayısı :
Ailenin ekonomik düzeyi :
 0-500 YTL
 500-1000 YTL
 1000-2000 YTL
Tavuk ve tavuk ürünleri (sakatat) yeme öyküsü :
Evde hayvan besleme:
 Tavuk
 Kedi
 Köpek
 İnek
Dışarda yemek yeme öyküsü (son bir hafta içinde) :
Evde kullanılan ve içilen su :
 Şebeke
 Damacana
 Taşıma
İçilen süt:
 Pastörize,
 Kapı sütü,
 Kendi hayvanlarının sütü
Evde mutfak:
 Hazır,
 Evin bir köşesi,
 Evin dışında
Şikayetlerin başlama süresi :
İshalin süresi :
Günlük dışkılama sayısı :
Antibiyotik kullanma öyküsü :
Dışkının makroskopik görünümü (Katı, yarı katı, sulu, kanlı, mukuslu) :
Klinik bulgu ve semptomlar (Tenesmus, abdominal ağrı, ateş, bulantı, kusma) :

ÖZGEÇMİŞ

Adana Seyhan ilçesinde 09.05.1972 yılında doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Adana'da tamamladı. 1991 yılında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne girdi ve 1997 yılında tıp doktoru olarak mezun oldu. Adana'da iki Mersin'de bir yıl pratisyen hekimlik yaptı. 2000 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne araştırma görevlisi olarak girip Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2004 yılında bilim uzmanı olarak mezun oldu 2005 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsüne bağlı olarak Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora eğitimine başladı.

Evli ve iki çocuk annesi olup, yabancı dili İngilizce'dir.