

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIĞIR VE KOYUN ORİJİNLİ
CAMPYLOBACTER JEJUNİ VE
CAMPYLOBACTER COLİ'NİN MOLEKÜLER
TİPLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

MEHMET NURİ AÇIK

ELAZIĞ-2006

Ruhumun derinliklerini sevgisiyle ısıtan
sevgili annem merhume MENŞURE AÇIK'ın anısına...

TEŞEKKÜR

Öncelikle doktora çalışmam boyunca danışmanlığımı üstlenmesi ve hiçbir zaman desteğini üzerimden esirgememesi nedeniyle doktora hocam Prof. Dr. Burhan ÇETİNKAYA olmak üzere, Anabilim Dalımızın diğer saygıdeğer öğretim üyeleri Prof. Dr. Adile MUZ, Prof. Dr. H. Basri GÜLCÜ ve Doç. Dr. H. Basri ERTAŞ'a teşekkür etmeyi borç bilirim. Doktoram boyunca devamlı olarak bilgilerinden yararlandığım ve özellikle laboratuvar çalışmalarında deneyim kazanmamda yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Hasan ÖNGÖR ve Dr. Murat KARAHAN'a minnettarlığımı bildiririm. Çalışma materyallerinin toplanmasındaki katkıları nedeniyle Vet. Sağ. Tek. Muhittin BAZNA, Vet. Hek. Leyla ÇAKICI ve başta Vet. Hek. Oya HAN ve Vet. Hek. Pınar TOKGÖZ olmak üzere tüm ELKAS mezbaha çalışanlarına çok teşekkür ederim. Ayrıca manevi desteklerini her zaman arkamda hissettiğim annem ve babama, doktora çalışmam süresince iyi ve kötü günlerimde hep yanımda olan ve beni anlayışla karşılayan eşim Vet. Hek. Perihan AÇIK'a, dünyaya gelmesi ile birlikte evimizin neşesi ve moral kaynağı olan biricik oğlum H. Burak AÇIK'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (FÜBAP) tarafından 800 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u> <u>No</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
ONAY SAYFASI.....	ii
İTHAF.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
TABLO LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. GİRİŞ.....	5
3.1. Genel Bilgi.....	5
3.1.1. Etiyolojik Ajan.....	5
3.1.2. Epidemiyoloji.....	10
3.1.2.1. Bulaşma ve Taşınma Yolları.....	10
3.1.2.2. Prevalans.....	12
3.1.3. Patogenez ve Virulens.....	15
3.1.4. Antimikrobiyal Dirençlilik.....	20
3.1.5. Bağışıklık.....	22
3.1.6. Klinik Belirtiler.....	24
3.1.7. İnsanlarda <i>Campylobacter</i> İnfeksiyonları.....	24
3.1.8. Tanı.....	26

3.1.9. Tedavi ve Koruma.....	30
3.2. <i>Campylobacter jejuni</i> ve <i>C. coli</i> 'nin Moleküler Tiplendirilmesi.....	31
3.2.1. Fenotiplendirme.....	32
3.2.1.1. Serotiplendirme.....	32
3.2.1.2. Biyotiplendirme.....	32
3.2.2. Genotiplendirme.....	34
3.2.2.1. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)-Flagellin A (<i>FlaA</i>) Tiplendirme.....	35
3.2.2.2. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)	37
3.2.2.3. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).....	38
3.2.2.4. Ribotiplendirme	39
3.2.2.5. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP).....	40
3.2.2.6. Multilocus Sequence Typing (MLST).....	40
3.3. Amaç.....	42
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	43
4.1. Örneklerin Toplanması.....	43
4.1.1. Sığırlarda Örnek Toplanması.....	43
4.1.2. Koyunlarda Örnek Toplanması.....	43
4.2. <i>Campylobacter</i> İzolasyonu ve İdentifikasyonu.....	44
4.2.1. <i>Campylobacter</i> İzolasyonu.....	44
4.2.2. Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Multipleks PCR) ile <i>C. jejuni</i> ve <i>C. coli</i> 'nin İdentifikasyonu.....	45
4.2.2.1. DNA Ekstraksiyonu.....	45
4.2.2.2. Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Multipleks PCR).....	46

4.3. <i>Campylobacter jejuni</i> ve <i>C. coli</i> 'nin Moleküler Tiplendirilmesi.....	47
4.3.1. Flagellin A (<i>FlaA</i>) Geninin PCR Amplifikasyonu.....	47
4.3.2. Flagellin A Geninin Restriction Fragment Length Polymorphism Analizi (<i>FlaA</i> Tiplendirme).....	47
4.3.3. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analizi.....	48
4.4. İstatistiksel Analiz.....	48
4.5. Kültür ve PCR Aşamasında Kullanılan Ayıraçlar.....	50
4.5.1. İzolasyonda Kullanılan Ayıraçlar.....	50
4.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) İşleminde Kullanılan Ayıraçlar.....	53
4.5.2.1. DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Ayıraçlar.....	53
4.5.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Analizinde Kullanılan Ayıraçlar.....	54
4.5.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) Analizinde Kullanılan Ayıraçlar.....	55
4.5.2.4. Elektroforez İşleminde Kullanılan Ayıraçlar.....	56
5. BULGULAR.....	57
5.1. <i>Campylobacter</i> İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları.....	57
5.1.1. Sığırlarda <i>Campylobacter</i> İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları.....	57
5.1.2. Koyunlarda <i>Campylobacter</i> İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları.....	58
5.2. Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Multipleks PCR) ile <i>C. jejuni</i> ve <i>C. coli</i> İdentifikasyon Bulguları.....	59
5.2.1. Sığırlarda Multipleks PCR ile <i>C. jejuni</i> ve <i>C. coli</i> 'nin İdentifikasyon Bulguları.....	59
5.2.2. Koyunlarda Multipleks PCR ile <i>C. jejuni</i> ve <i>C. coli</i> 'nin İdentifikasyon Bulguları.....	61
5.3. Flagellin A (<i>FlaA</i>) Tiplendirme Bulguları.....	64
5.3.1. Sığırlarda <i>FlaA</i> Tiplendirme Bulguları.....	64

5.3.1.1. Sığırlardan İzole Edilen <i>C. jejuni</i> 'lerin <i>FlaA</i> Tiplendirme Bulguları	64
5.3.1.2. Sığırlardan İzole Edilen <i>C. coli</i> 'lerin <i>FlaA</i> Tiplendirme Bulguları...	67
5.3.2. Koyunlarda <i>FlaA</i> Tiplendirme Bulguları	69
5.3.2.1. Koyunlardan İzole Edilen <i>C. jejuni</i> 'lerin <i>FlaA</i> Tiplendirme Bulguları.....	69
5.3.2.2. Koyunlardan İzole Edilen <i>C. coli</i> 'lerin <i>FlaA</i> Tiplendirme Bulguları	71
5.4. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Bulguları.....	75
5.4.1. Sığırlarda RAPD Bulguları.....	75
5.4.1.1. Sığırlardan İzole Edilen <i>C. jejuni</i> 'lerin RAPD Bulguları.....	75
5.4.1.2. Sığırlardan İzole Edilen <i>C. coli</i> 'lerin RAPD Bulguları.....	76
5.4.2. Koyunlarda RAPD Bulguları.....	78
5.4.2.1. Koyunlardan İzole Edilen <i>C. jejuni</i> 'lerin RAPD Bulguları.....	78
5.4.2.2. Koyunlardan İzole Edilen <i>C. coli</i> 'lerin RAPD Bulguları.....	81
6. TARTIŞMA.....	83
7. KAYNAKLAR.....	98
8. ÖZGEÇMİŞ.....	114

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u> <u>No</u>
Tablo 1. <i>Campylobacter</i> türlerinin özellikleri	7
Tablo 2. Termofilik <i>Campylobacter</i> türlerinin üreme özellikleri.....	9
Tablo 3. Çalışmada incelenen örnekler ve hayvan türlerine göre dağılımı...	44
Tablo 4. <i>Campylobacter jejuni</i> ve <i>C. coli</i> izolatlarının PCR analizinde ve tiplendirilmesinde kullanılan primerler	49
Tablo 5. Konvansiyonel kültür yöntemi ile sağlıklı görünüşlü sığırlardan elde edilen <i>Campylobacter</i> spp. izolatlarının örnek türüne göre dağılımı.....	57
Tablo 6. Konvansiyonel kültür yöntemi ile sağlıklı görünüşlü koyunlardan elde edilen <i>Campylobacter</i> spp. izolatlarının örnek türüne göre dağılımı.....	58
Tablo 7. Sağlıklı görünüşlü sığırlardan elde edilen <i>Campylobacter</i> izolatlarının multipleks PCR bulguları.....	60
Tablo 8. Sağlıklı görünüşlü koyunlardan elde edilen <i>Campylobacter</i> izolatlarının multipleks PCR bulguları.....	63
Tablo 9. Sığırlardan elde edilen <i>C. jejuni</i> izolatlarının <i>flaA</i> tiplendirme bulguları.....	67
Tablo 10. Sığırlardan elde edilen <i>C. coli</i> izolatlarının <i>flaA</i> tiplendirme bulguları.....	69
Tablo 11. Koyunlardan elde edilen <i>C. jejuni</i> izolatlarının <i>flaA</i> tiplendirme bulguları.....	71
Tablo 12. Koyunlardan elde edilen <i>C. coli</i> izolatlarının <i>flaA</i> tiplendirme bulguları.....	74
Tablo 13. Sığırlardan elde edilen <i>C. jejuni</i> izolatlarının RAPD bulguları.....	76
Tablo 14. Sığırlardan elde edilen <i>C. coli</i> izolatlarının RAPD bulguları.....	78
Tablo 15. Koyunlardan elde edilen <i>C. jejuni</i> izolatlarının RAPD bulguları...	80
Tablo 16. Koyunlardan elde edilen <i>C. coli</i> izolatlarının RAPD bulguları.....	82

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u> <u>No</u>
Şekil 1.	<i>Campylobacter jejuni</i> 'nin elektron mikroskopik görüntüsü..... 8
Şekil 2a.	Sığırlarda <i>Campylobacter</i> spp. olarak tanımlanan kültürlerden elde edilen DNA'ların <i>C. jejuni</i> ve <i>C. coli</i> tür spesifik primerler kullanılarak yapılan multipleks PCR analizi sonucu oluşan ürünlerin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü..... 61
Şekil 2b.	Koyunlarda <i>Campylobacter</i> spp. olarak tanımlanan kültürlerden elde edilen DNA'ların <i>C. jejuni</i> ve <i>C. coli</i> tür spesifik primerler kullanılarak yapılan multipleks PCR analizi sonucu oluşan ürünlerin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü..... 62
Şekil 3.	<i>Campylobacter jejuni</i> ve <i>C. coli</i> türlerinin <i>flaA</i> genine spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR analizi sonucu oluşan ürünlerin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü..... 65
Şekil 4a.	Sığırların safra örneklerinden elde edilen <i>C. jejuni</i> izolatlarındaki <i>flaA</i> geninin <i>DdeI</i> ile muamele edilmiş PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü..... 65
Şekil 4b.	Sığırların gayta örneklerinden elde edilen <i>C. jejuni</i> izolatlarındaki <i>flaA</i> geninin <i>DdeI</i> ile muamele edilmiş PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü..... 66
Şekil 5.	Sığırların safra, bağırsak içeriği ve gayta örneklerinden elde edilen <i>C. coli</i> izolatlarındaki <i>flaA</i> geninin <i>DdeI</i> ile muamele edilmiş PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü.. 68
Şekil 6a.	Koyunların safra örneklerinden elde edilen <i>C. jejuni</i> izolatlarındaki <i>flaA</i> geninin <i>DdeI</i> ile muamele edilmiş PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü..... 70
Şekil 6b.	Koyunların bağırsak içeriği örneklerinden elde edilen <i>C. jejuni</i> izolatlarındaki <i>flaA</i> geninin <i>DdeI</i> ile muamele edilmiş PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü..... 70
Şekil 7.	Koyunların gayta örneklerinden elde edilen <i>C. jejuni</i> ve <i>C. coli</i> izolatlarındaki <i>flaA</i> geninin <i>DdeI</i> ile muamele edilmiş PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü..... 72
Şekil 8.	Koyunların safra örneklerinden elde edilen <i>C. coli</i> izolatlarındaki <i>flaA</i> geninin <i>DdeI</i> ile muamele edilmiş PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü..... 73
Şekil 9.	Koyunların bağırsak içeriği örneklerinden elde edilen <i>C. coli</i>

	izolatlarındaki <i>flaA</i> geninin <i>DdeI</i> ile muamele edilmiş PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü.....	73
Şekil 10.	Sığırların safra örneklerinden elde edilen <i>C. jejuni</i> 'lerin RAPD ile tiplendirilmesi neticesinde gözlenen en yaygın profiller.....	75
Şekil 11.	Sığırların gayta, bağırsak içeriği ve safra sıvısı örneklerinden elde edilen <i>C. coli</i> 'lerin RAPD yöntemi ile tiplendirilmesi neticesinde elde edilen profiller.....	77
Şekil 12.	Koyunların bağırsak içeriği, safra ve gayta örneklerinden elde edilen <i>C. jejuni</i> ve <i>C. coli</i> izolatlarının RAPD yöntemi ile tiplendirilmesi neticesinde elde edilen profiller.....	79
Şekil 13.	Koyunların bağırsak içeriği ve safra sıvısı örneklerinden elde edilen <i>C. coli</i> izolatlarının RAPD yöntemi ile tiplendirilmesi neticesinde elde edilen profiller.....	81

1. ÖZET

Bu çalışmada, insanlarda akut bakteriyel gastroenteritisin en yaygın etkenleri olarak bilinen *Campylobacter jejuni* ve *Campylobacter coli*'nin, klinik olarak sağlıklı sığır ve koyunların dışkı ve iç organlarından multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu (multipleks PCR) ile araştırılması ve izolatlar arasındaki genetik heterojenite düzeyinin Flagellin A (*flaA*) tiplendirme ve Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) metotları ile belirlenmesi amaçlandı.

Toplam 1154 sağlıklı sığırdan toplanan bağırsak içeriği, safra sıvısı, karaciğer ve rektal svap örnekleri Preston Zenginleştirme Buyyonu ve Preston Selektif Agara ekildi. İncelenen sığır örneklerinin 301 (%26,1)'i konvansiyonel kültür metotları ile *Campylobacter* spp. pozitif olarak saptandı. Multipleks PCR ile incelenen izolatların % 59,5 (179/301)'inde *C. jejuni* ve % 10 (30/301)'unda *C. coli* identifiye edildi. Sığır karaciğer örneklerinin hiçbirinde *C. jejuni* ya da *C. coli* tespit edilemedi. *Campylobacter jejuni* ve *C. coli* olarak identifiye edilen izolatlar, *flaA* geninin 1,7 kb ampikon bölgesinin Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analizi (*flaA* tiplendirme) ve 10-mer primerini esas alan RAPD yöntemi ile tiplendirildi. Bütün izolatlar *flaA* tiplendirme yöntemi ile başarılı bir şekilde tiplendirilmesine rağmen, rektal svap ve bağırsak içeriğinden izole edilen *C. jejuni* suşlarının RAPD analizi neticesinde verimli sonuçlar elde edilemedi. Sığırlarda, *flaA* tiplendirme ve RAPD metodu ile sırasıyla 28 ve 42 adet bant profili tanımlandı.

Bu çalışmada, 610 sağlıklı koyundan toplanan bağırsak içeriği, safra sıvısı ve rektal svap örnekleri de *C. jejuni* ve *C. coli* yönünden incelendi.

Konvansiyonel kültür metotları neticesinde incelenen koyun örneklerinin 302 (% 49,5)'sinde *Campylobacter* spp. izolasyonu gerçekleştirildi. Multipleks PCR analizi neticesinde izolatların % 34,1 (103/302)'i *C. jejuni* ve % 33,1 (100/302)'i *C. coli* olarak identifiye edildi. *Campylobacter jejuni* ve *C. coli* olarak identifiye edilen izolatlar, *flaA* tiplendirme ve RAPD yöntemi ile başarılı bir şekilde tiplendirildi ve sırasıyla 48 ve 45 adet bant profili elde edildi.

Sonuç olarak, sığır ve koyunlardan elde edilen *C. jejuni* ve *C. coli* izolatları arasında yüksek bir genetik heterojenitenin mevcut olduğu ve bazı bant profillerinin diğer profillere göre daha dominant olduğu gözlendi. Ayrıca bu tez çalışmasından elde edilen veriler, *C. jejuni* ve *C. coli*'nin çevreyi ve gıda zincirini kontamine etmesinde sığır ve koyunların önemli role sahip olduklarını ve bu hayvanların *Campylobacter* infeksiyonlarının epidemiyolojinde göz önünde bulundurulması gerektiğini ortaya çıkarmıştır.

Anahtar Kelimeler: Sığır, koyun, *C. jejuni*, *C. coli*, multipleks PCR, RFLP, RAPD.

2. ABSTRACT

The objectives of this study were to isolate *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*, which are recognized as the major agents of bacterial gastroenteritis in humans, from internal organs and faecal samples of clinically healthy cattle and sheep and to identify the isolates by multiplex Polymerase Chain Reaction (multiplex PCR). In addition, the degree of genetic heterogeneity among these isolates was determined by using Flagellin A (*flaA*) typing and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) assays.

Intestinal content, gall bladder, liver and rectal swap samples collected from a total number of 1154 clinically healthy cattle were inoculated onto Preston Enrichment broth and Preston *Campylobacter* Selective agar. Of the cattle samples, 301 (26.1 %) were determined to be positive for *Campylobacter* spp. In the analysis of the isolates by multiplex PCR assay, *C. jejuni* and *C. coli* were identified from 59.5 % (179/301) and 10 % (30/301), respectively. None of the liver samples examined was found to be positive for either *C. jejuni* or *C. coli*. The isolates identified as *C. jejuni* or *C. coli* were subtyped by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis (*flaA* typing) of 1.7 kb amplicon portion of the *flaA* gene and by RAPD based on a single random 10-mer primer. Although all the isolates were successfully subtyped by *flaA* typing, no productive results could be obtained from *C. jejuni* isolates of intestinal contents and rectal swap samples by RAPD analysis. The total number of band patterns defined by *flaA* typing and RAPD were 28 and 42, respectively in cattle.

In addition, intestinal content, gall bladder and rectal swap samples collected from a total number of 610 clinically healthy sheep were examined for

the presence of *C. jejuni* and *C. coli* strains. Of the sheep samples, 302 (49.5 %) were determined to be positive for *Campylobacter* spp. by conventional culture methods. In the analysis of the isolates by multiplex PCR assay, *C. jejuni* and *C. coli* were identified from 34.1 % (103/302) and 33.1 % (100/302), respectively. All the isolates identified as *C. jejuni* or *C. coli* were successfully subtyped by *flaA* typing and RAPD assay. The total number of band patterns defined by *flaA* typing and RAPD were 48 and 45, respectively in sheep.

In conclusion, it was observed that a high degree of heterogeneity existed among *C. jejuni* and *C. coli* isolates of clinically healthy cattle and sheep origin and some of the *flaA* and RAPD profiles were represented by remarkably high percentages of the isolates. The results of the present study also suggest that healthy cattle and sheep can play significant role in the contamination of environment and human food chain by *Campylobacter* spp. and these animals should therefore be considered seriously in order to have a better understanding of the epidemiology of *Campylobacter* infections.

Key Words: Cattle, sheep, *C. jejuni*, *C. coli*, multiplex PCR, RFLP, RAPD.

3. GİRİŞ

3.1. Genel Bilgi

3.1.1. Etiyolojik Ajan

Campylobacter bakterisi ilk kez 1880 yılında Theodore Escherich tarafından ishalleri çocukların dışkılarında tanımlanmıştır (67). Benzer organizmalar 20. yüzyılın başlarında sığır ve koyunların abort vakalarından izole edilmiş ve *Vibrio fetus* olarak isimlendirilmişlerdir (131). Bugün termofilik *Campylobacter* olarak nitelenen organizmalar ilk kez Jones ve ark. tarafından 1931 yılında sığır ve koyunların bağırsaklarında saptanarak *Vibrio jejuni* adını almış ve sığırların kış dizanterisinden sorumlu tutulmuştur (95). Daha sonra domuz dizanterisinden sorumlu tutulan bir başka etken *Vibrio coli* olarak adlandırılmıştır (50). *Campylobacter* cinsine ait türler spiral görüntülerinden dolayı 1963 yılına kadar *Vibrio* cinsi içinde yer almıştır. Ancak bu türlerin oksijenli ortamda ürememeleri, karbonhidratları fermente edememeleri ve DNA baz yapısındaki guanin + sitozin (G+C) oranlarının farklılıkları, bu yıldan itibaren *Campylobacter* olarak isimlendirilmelerine yol açmıştır (99, 182). *Campylobacter* türlerinin izolasyonu için selektif besi yerleri ve filtrasyon tekniklerinin 1970 yılından itibaren yaygın olarak kullanılmaya başlanması ile birlikte bu türlerin insan ve birçok hayvan türünde çok yaygın olarak buldukları ve infeksiyonlara neden oldukları ortaya konmuştur (31, 41).

*Campylobacter*ler, taksonomik ve filogenetik çalışmalar sonucunda Proteobacteriaların epsilon alt sınıfına bağlı rRNA süperfamilya VI içinde sınıflandırılmışlardır. Bu süperfamilya *Campylobacteraceae* ve

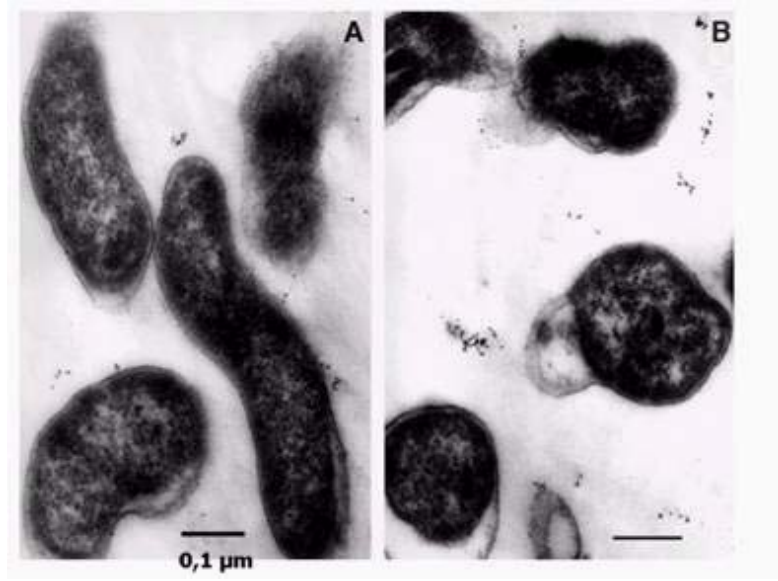
Helicobacteraceae familyalarını içine almaktadır. *Campylobacteraceae* familyası *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Sulfurospirillum* ve *Thiovulum* cinslerini içermektedir (69). *Campylobacter* cinsi içinde bulunan *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* ve *C. upsaliensis* türleri 42 °C'de üreyebilme özellikleri göz önüne alınarak termofilik campylobacterler olarak tanımlanmaktadır (201). *Campylobacter jejuni* ve *C. coli*'nin insanlarda görülen akut bakteriyel gastroenteritlerin en yaygın etkenleri olduğu ve infeksiyonların % 90-95'inden *C. jejuni*, % 5-10'undan ise *C. coli*'nin sorumlu olduğu bildirilmiştir (67). *Campylobacter* cinsi içinde termofilik campylobacterler dışında tanımlanan 11 tür daha bulunmaktadır (Tablo 1). Campylobacterler Gram (-), spiral ya da virgül, nadiren de eğik çomakçıklar şeklinde bulunan, sporsuz, kapsülsüz, bir veya her iki ucunda polar flagellaya sahip hareketli mikroorganizmalardır. Bu türler 0,2-0,5 µm genişliğinde ve 0,5-5 µm uzunluğunda olup diğer bakterilerden daha ince bir yapıya sahiptirler (Şekil 1A). Fimbrialara sahip olmayan *Campylobacter* türleri plazmid taşırlar ve bazı plazmidlerin antibiyotik dirençliliğinde rol oynadıkları bildirilmiştir (85, 168).

Tablo 1. *Campylobacter* türlerinin özellikleri (109, 201)

Tür	Biyokimyasal							Üreme		Tolerans		Duyarlılık	
	Katalaz	Hippurat	Üreaz	Nitrat	Selenit	H ₂ S (TSI agar)	İndoksil asetat	25 °C	42 °C	Glisin (%1)	NaCl (%4)	Nalidiksik asit	Sefalotin
<i>C. coli</i>	+	-	-	+	+	d	+	-	+	+	-	S	R
<i>C. concisus</i>	-	-	-	d	d	-	-	-	d	d	-	d	S
<i>C. curvus</i>	-	d	-	+	-	d	d	-	d	+	-	R	S
<i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i>	+	-	-	+	d	-	-	+	d	+	-	R	S
<i>C. fetus</i> ssp. <i>veneralis</i>	d	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	d	S
<i>C. gracilis</i>	d	-	-	d	-	-	d	-	d	+	-	d	S
<i>C. helveticus</i>	-	-	-	+	-	-	+	-	+	d	-	S	S
<i>C. hyointestinalis</i> ssp. <i>hyointestinalis</i>	+	-	-	+	+	+	-	d	+	+	-	R	d
<i>C. hyointestinalis</i> ssp. <i>lawsonii</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	+	d	-	R	S
<i>C. jejuni</i> ssp. <i>doylei</i>	d	+	-	-	-	-	+	-	-	d	-	S	S
<i>C. jejuni</i> ssp. <i>jejuni</i>	+	+	-	+	d	-	+	-	+	+	-	S	R
<i>C. lari</i>	+	-	d	+	d	-	-	-	+	+	-	d	R
<i>C. mucosalis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	d	-	d	S
<i>C. rectus</i>	d	-	-	+	-	-	+	-	d	+	-	d	S
<i>C. showae</i>	+	-	-	+	-	d	d	-	d	d	-	S	S
<i>C. sputorum</i>	d	-	d	+	d	+	-	-	+	+	d	d	S
<i>C. upsaliensis</i>	-	-	-	+	+	-	+	-	d	+	-	S	d
<i>C. lanienae</i>	+	-	?	+	?	-	-	-	+	-	?	R	R

d: Değişken, S: Duyarlı, R: Dirençli

Campylobacterlerin üreme sıcaklıkları 30-43 °C arasında değişir. Genellikle optimal üreme sıcaklıkları 37 °C olup termofilik olanlar 42-43 °C’de üreme özelliğine sahiptirler. Campylobacterler mikroaerofilik özellikte olup, optimal üremeleri için % 5 O₂, % 10 CO₂ ve % 85 N₂ içeren ortamlara ihtiyaç duyarlar (128) (Tablo 2). Campylobacterler oksidatif stres gibi faktörlerin bulunduğu ortamlarda spesifik şekillerini kaybedip kokoid forma dönüşmektedirler (19) (Şekil 1B).



Şekil 1. *Campylobacter jejuni*'nin elektron mikroskopik görüntüsü, A- Karakteristik spiral morfoloji B- Oksidatif strese maruz kalmış *C. jejuni*'nin kokoid morfolojisi (19).

Campylobacterlerin izolasyonu için zenginleştirilmiş ortamlara ve selektif besi yerlerine ihtiyaç vardır. Besi yerlerinde campylobacterlerin oluşturduğu koloni morfolojileri oldukça değişkenlik göstermektedir. Koloniler genellikle pigment meydana getirmezler ve kanlı agarda hemoliz oluşturmazlar. Kolonilerin oluşması için ortalama 48-72 saat süreye gereksinim vardır (11).

Campylobacterler karbonhidratları fermente edemedikleri için gereksinimleri olan enerjiyi trikarboksilik asit döngüsünden sağlayan bir respiratorik mekanizmaya sahiptirler. Oksidaz pozitif, lipaz aktiviteleri, jelatin, üre, Metil Red (MR) ve Voges-Proskauer (VP) testleri negatiftir. Üreme sıcaklık limitleri, katalaz, nitrat, hippurat, selenit redüksiyonu, H₂S, tuz ve glisin tolerans özellikleri türler arasında farklılıklar gösterir (11, 85) (Tablo 1).

Tablo 2. Termofilik *Campylobacter* türlerinin üreme özellikleri (85).

Özellik	Minimum	Optimum	Maksimum
Sıcaklık (°C)	32	42- 43	45
pH	4,9	6,5-7,5	~9
NaCl (%)	-	0,5	1,5
Su Aktivitesi (a _w)	>0,987	0,997	-
Atmosfer	-	% 5 O ₂ + % 10 CO ₂	-

Campylobacterlerin DNA baz kompozisyonları % 29 ile % 46 arasında farklılık gösterir. Termofilik *Campylobacter* DNA'larının G + C oranları diğer *Campylobacter* türlerinden ve birbirlerinden farklıdır. *Campylobacter jejuni* suşlarının ortalama G + C oranları % 31 mol, *C. coli*'nin % 32,6-34 mol ve *C. lari* 'nin % 32,1 mol'dür. *Campylobacter jejuni* genomunun 1,6 milyon baz çiftinden oluştuğu ve bunların 1654 geni kodladığı ve bu genlerin hiç birisinin faj ve plazmid DNA'sı içermediği bildirilmiştir (19, 128).

Campylobacterler oldukça hassas mikroorganizmalar olduğu için çevresel stres, kurutma, düşük pH, ısıtma, dondurma vb. faktörlerden diğer bakterilere oranla daha fazla etkilenmektedirler (51). Bu mikroorganizmalar konakçı dışındaki çevresel ortamlarda çoğalamazlar ve kısa sürede ölürlür. *Campylobacter jejuni* suda 4 °C'de dört hafta, sütte 25 °C'de 24 saat, 40 °C'de üç hafta infektif özelliğini korur. Campylobacterler pH'nın 4,9'un altında olduğu ortamlarda canlı kalamazlar. *Campylobacter jejuni* ve *C. coli*'lerin optimal üremeleri için gerekli pH değerleri 6,5 ile 7,5 arasında değişmektedir (Tablo 2). Campylobacterler % 10'luk formaldehitin % 2,5 solusyonu ile muamele edilirse 15 dk'da inaktive olurken, *C. jejuni* 1/50,000'lik amonyum veya % 0,125'lik gluteraldehit içeren % 0,15'lik organik fenolde bir dakikada inaktive olmaktadır (10).

3.1.2. Epidemiyoloji

3.1.2.1. 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 (23). Campylobacterlerin kontaminasyon siklusunun önemli bir aşaması olan çoğalmanın meydana geldiği yer sıcak kanlı hayvanların ve kuşların bağırsaklarıdır. Bu sebepten dolayı campylobacterlerin en büyük çevresel rezervuarları sıcak kanlı hayvanlar ve kuşlardır. Campylobacterler bu hayvanların bağırsak yollarında kommensal olarak bulunmakta ve dışkı ile etrafa saçılmaktadırlar (40, 145).

İnsanlardaki *Campylobacter* infeksiyonları diğer infeksiyonların aksine sporadik olarak meydana gelmekle beraber, nadir olarak kontamine çiğ süt ve klorlanmamış suların içilmesi ile büyük salgınlar meydana gelmektedir (135). Amerika'da 1978-1986 yılları arasında *C. jejuni*'nin sebep olduğu gıda kaynaklı 57 salgının 26'sının çiğ süt ve 11'inin kontamine sütlerin tüketilmesi ile meydana geldiği bildirilmiştir (195). Yine Amerika'da 1978 yılında suların yetersiz klorlanması veya klorlanmaması ile ilişkili olarak meydana gelen bir *Campylobacter* salgınından dolayı 3500 kişinin etkilendiği rapor edilmiştir (202). Su ve sütün kontaminasyonunda sığır, koyun, domuz ve kanatlı hayvanların dışkılarıyla etkenleri etrafa saçmalarının önemli rol oynadığı bildirilmiştir (116, 164, 191, 192). Sporadik vakaların yaklaşık % 70'inin kontamine kanatlı eti ve bu etlerin elle işlenmesi ile meydana geldiği ortaya konmuştur (4).

*Campylobacter*ler sığır ve koyun gibi çiftlik hayvanlarının dışkılarından kolaylıkla izole edilmiştir (70, 191, 192). *Campylobacter*lerin epidemiyolojisinde sığır ve koyunların önemi sadece mezbahada karkasların ve çiftlikte sütlerin kontaminasyonu için bir kaynak olmaları ile sınırlı değildir. Bu hayvanların akıntılarının yüzey sularını ve toprağı kontamine etmesi de etkenlerin çevreye yayılması açısından önemlidir (190). Karkaslar üzerinde yapılan prevalans ve vaka-kontrol çalışmalarında, kırmızı etlerin insan infeksiyonları için önemli bir risk oluşturduğuna dair çok az kanıt bildirilmiştir (190). Bunda karkaslar üzerinde termofilik *campylobacter*lerin üremesini ve canlı kalmalarını önemli derecede olumsuz etkileyen kurutma ve soğutma işlemlerinin uygulanmasının rolü vardır (75). Bağırsak içeriği ile karkasların kontaminasyonu bu organların çıkarılması esnasında meydana gelir. Kontaminasyonların çoğunlukla mezbaha çalışanlarının

elleri ve kullandıkları malzeme ile karkasların kros kontaminasyonu şeklinde meydana geldiği bildirilmiştir (190).

Moleküler tiplendirme metotlarının geliştirilmesinden önce insan *Campylobacter* infeksiyonlarının meydana gelmesinde kanatlı dışındaki hayvanların önemi hakkında çok az bilgi mevcuttur (155). Fitzgerald ve ark. (2001) insan ve bazı hayvanlar üzerinde yaptıkları bir tiplendirme çalışmasında elde ettikleri profillerin insan izolatları ile birlikte sığır, koyun ve kanatlı dışısından elde edilen izolatlarda da bulunduğu bildirmişlerdir (65). Bu veriler insanlarda infeksiyon kaynağı olarak sadece kanatlıların değil ruminantların da önemli rol oynadığını ve çevreyi kontamine ettiğini göstermektedir.

*Campylobacter*lerin diğer rezervuarları insektler, rodentler, pet hayvanları, domuzlar ve deniz ürünleridir. Deniz ürünlerinin tüketilmesi ile ilişkili iki *Campylobacter* salgını bildirilmiş ve bunun suların *Campylobacter* ile kontamine olması ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (198).

3.1.2.2. Prevalans

Sığırlarda *campylobacter*lerin prevalansının Amerika'da % 5-37 (83, 214), Danimarka'da % 23 (144), Japonya'da % 47 (70), Portekiz'de % 20 (32), Norveç'te % 1 (176) civarında olduğu rapor edilmiştir. *Campylobacter* prevalansının ülkeden ülkeye önemli farklılıklar göstermesinde; sürünün büyüklüğü, tipi, mevsim, hayvanların yaşı, örnek türü, örnek miktarı, bakım ve beslenme koşulları, izolasyon metotları ve coğrafik farklılıklar önemli rol oynamaktadır (190). Örneğin *C. jejuni*'nin prevalansının meralardaki sığırlarda kapalı alanlarda barındırılanlara oranla daha yüksek olduğu bildirilmiştir (68).

İzolasyon oranları sürüden sürüye de farklılık göstermektedir. İngiltere’de *Campylobacter* türlerinin üç farklı sürüde sırasıyla % 79, % 40 ve % 37 oranlarında izole edildiği rapor edilmiştir (14). Stanley ve ark. (1998), sığır bağırsak içeriği örnekleri ile ilgili yaptıkları bir çalışmada uygulanan izolasyon metodundaki farklılıkların prevalans üzerinde etkili olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar topladıkları svap örneklerini direkt izolasyon ve zenginleştirme yöntemleriyle incelemiş ve direkt izolasyon ile % 26,7, zenginleştirme yöntemi ile ise % 89,4 oranında *Campylobacter* izole etmişlerdir (192).

Koyunlarda termofilik campylobacterlerin prevalansı ülkeden ülkeye farklılık göstermekte olup Portekiz’de % 15 (32), Nijerya’da % 4 (2), İngiltere’de % 92 (191) ve İsviçre’de % 18 (221) civarında olduğu bildirilmiştir. Bu farklılıkta yukarıda sıralanan faktörlerin önemli rolü vardır. Kapalı alanda beslenen koyunlarda campylobacterlerin prevalansı önemli derecede düşükken, bu oran merada beslenen koyunlarda çok daha yüksektir. Ayrıca, süt kesimi ve doğum dönemindeki koyunlarda meydana gelen stresten dolayı campylobacterlerin prevalansının yükseldiği ve stres altındaki bu hayvanların çok sayıda etkeni saçarak çevreyi kontamine ettiği bildirilmiştir (190). Ruminantlarda *Campylobacter* varlığı ile mevsim arasındaki ilişki incelemiş ve campylobacterlerin prevalansında mevsimin de önemli rol oynadığı bildirilmiştir (89, 191, 192). Stanley ve ark. (1998), koyunlarda *Campylobacter* prevalansındaki mevsimsel farklılıkları ortaya koymak amacıyla yaptıkları bir çalışmada aylar arasında istatistiksel olarak farklılık olduğunu tespit etmişlerdir. *Campylobacter*lerin prevalansının bahar aylarında ve kışın başlangıcında pik yaptığı, buna karşın şubat ve ekim aylarında ise en düşük olduğu saptanmıştır

(191). Aynı araştırmacıların sığırlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada mevsimsel farklılığın besi sığırlarında istatistiksel anlamda önemli olmadığı, fakat süt ineklerinde campylobacterlerin prevalansı üzerinde etkisi olduğu bildirilmiştir (192).

Campylobacter türleri ayrıca sığır ve koyunların safra, karaciğer, rumen, mezenteriyal lenf yumrusu vb. iç organlarında değişik oranlarda izole edilmişlerdir. Stanley ve ark. (1998), sığır ve koyunlarda ince bağırsak (% 80-60) ve rumenden (% 30) *Campylobacter* türleri izole ederken sekum ve kolonlardan etken izole edememişlerdir (191, 192). Koyunların karaciğerlerinde % 11 ile % 73 oranında *Campylobacter* izole edilmiş ve gıda kökenli *Campylobacter* infeksiyonlarında karaciğerin önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (38, 104). Ruminant lenf yumrularında campylobacterlerin araştırılmasına yönelik çalışmalar oldukça azdır. Garcia ve ark. (1985)'nin yaptığı bir araştırmada 100 sağlıklı sığır lenf yumrusunda % 1 oranında *C. jejuni* elde edilmiştir (68).

Campylobacter türleri bütün dünyada olduğu gibi ülkemizde de ciddi bir sorun teşkil eden infeksiyonlar ile karşımıza çıkmaktadır. şu ana kadar ülkenin büyük bir coğrafik alanını içine alan geniş çaplı bir epidemiyolojik çalışma yapılmış değildir. Bu sebeple ülkemizde campylobacterlerin prevalansı ve infeksiyonun yayılmasında ruminantların rolünün ne olduğu konusunda yeterli veri bulunmamaktadır. Ruminantlarla ilgili yapılan bölgesel düzeydeki çalışmaların çoğunda sadece bir örnek tipi incelenmiş olup çeşitli numunelerin birlikte incelendiği geniş çapta bir çalışma söz konusu değildir. Bölgemizde Ertaş ve ark. (2003), sınırlı sayıda safra örneği kullanarak yaptıkları bir çalışmada % 34 oranında *C. jejuni* ve % 32 oranında *C. coli* izole ettiklerini bildirmişlerdir (58).

Yine Muz ve ark. (1992), bu bölgede yaptıkları bir çalışmada inceledikleri 112 adet sığır safrasında % 31 oranında *C. jejuni*, % 14 oranında *C. coli* izole etmişlerdir (137). Diker (1985), İç Anadolu bölgesinde yaptığı bir çalışmada incelediği sığır safra örneklerinde % 35, koyun safra örneklerinde ise % 57 oranında *Campylobacter* izole ve identifiye etmiştir (44). Türkiye'nin farklı bölgelerinde safra örneklerinde yapılan bu çalışmalarda sınırlı sayıda örnek kullanılmış olduğundan elde edilen veriler campylobacterlerin Türkiye'deki prevalansını tam olarak yansıtamamaktadır.

3.1.3. Patogenez ve Virulens

İnsan ve hayvanlarda gastrointestinal enfeksiyonlara sebep olan *C. jejuni* ve *C. coli* türlerinin patogenezi bugüne kadar tam olarak anlaşılamamıştır. Bu durum muhtemelen iyi bir hayvan modelinin olmamasından kaynaklanmaktadır (99). Birçok bakteri türünün oral yolla enfeksiyon oluşturabilmesi için yüzbinlerce sayıda bakterinin vücuda girmesi gerekirken, termofilik campylobacterlerin 500 adedi bile bağırsaklara kolonize olmak ve enfeksiyon oluşturmak için yeterlidir (21). Kontamine gıda ve suların konakçı tarafından alınması ile birlikte bu etkenler mide asit engelini 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 yangısal bir reaksiyon meydana getirerek indirekt yolla bağırsakların emilim kapasitesini bozarlar (217). Bazı bilimsel kanıtlar, bu etkenlerin intestinal epitel hücrelerinde bozukluklar oluşturup, buradan kan dolaşımına katılarak vücutta yayıldığını göstermiştir (184).

Campylobacterlerin bağırsaklara yerleşebilmesi için kemotaksis ve motiliteye ihtiyaçları vardır. Bu etkenler, konakçı bağırsak epitelinde yangısal reaksiyon sonucu meydana gelen kimyasal maddeleri algılama ve yangı bölgesine hareket etmelerini sağlayan mekanizmalara sahiptirler (99). Kemotaksisin önemi, *in vivo* ortamlarda yapılan çalışmalarda kemotaktik olmayan mutantların hasta bir fareye verildiğinde kolonize olmadığına ortaya konmasıyla kanıtlanmıştır (194). Ancak *in vitro* ortamlarda yapılan çalışmalarda kemotaksisin önemli olmadığı bildirilmiştir. Bu durum muhtemelen kemotaksisin oluşmasına neden olan *cheY* gibi bazı düzenleyici komponentlerin *in vitro* ortamda değişikliğe uğramasından kaynaklanmaktadır. Bu komponentleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar etkenin motilite ve invazyon yeteneğini etkilemezken, kemotaksis özelliğinin kaybolmasına neden olmaktadır (99, 220).

Campylobacterler, ya intestinal mukoza tabakası içinde kalarak canlılıklarını devam ettirirler ya da bağırsak epitel hücrelerini işgal ederler. İnvazyon esnasında etkenler öncelikle epitel hücrelerine akın ederler. *In vivo* ortamda yapılan çalışmalarda campylobacterlerin epitel hücrelerine invazyonu hücrede hasara, hücrelerin fonksiyonlarında kayıplara ve ishale neden olmaktadır (177, 207). Bu sebeple invazyon, *C. jejuni*'nin patogeneğinde önemli bir role sahiptir. Bakteriyel protein sentezinin invazyon için gerekli olduğu rapor edilmiştir. Campylobacterlerin hücre kültürlerinde üretildikleri zaman invazyon yeteneğine sahip en az 14 protein sentezledikleri radyoimmunoassay (RIA) yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir (102). Campylobacterlerin epitel hücrelerini işgal edebilmesi için öncelikle hücrelere yapışmaları gerekmektedir. Şimdiye kadar campylobacterlerde adhezif özelliklere sahip birkaç komponent tespit

edilmiştir ki bunlar etkenlerin epitel hücrelerine kolonizasyon ve invazyonunda önemli role sahiptirler (99). *In vivo* ve *in vitro* ortamlarda yapılan çalışmalarda campylobacterlerin epitel hücrelere adhezyonunda rol oynayan en önemli faktörün flagella olduğu tespit edilmiştir (33). Flagella, *Campylobacter* kolonilerinin nemli ve mikroskopta hareketli görünmesini sağlayan bir virulens 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 (142). Flagellaların hareketi, campylobacterleri 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, campylobacterlerin hücrelere ulaşmaları ve yakın temas kurmaları için gereklidir (208, 219).

In vitro ortamlarda yapılan çalışmalarda, lipopolisakkaridlerin (LPS) insan embriyonik bağırsak (INT-407) hücrelerine adhezyonunda önemli bir rol aldıkları rapor edilmiştir (119). Diğer Gram negatif bakterilerde olduğu gibi *Campylobacter* LPS'lerinin lipid A komponenti endotoksik aktiviteye sahiptir. Campylobacterlerin sistemik infeksiyonlarında salıverilen LPS'den dolayı sepsis ve şoklar meydana gelmektedir (134). *Campylobacter jejuni*'deki LPS, sakkarid yapısındaki çok sayıda O- antijenlerinden birine sahiptir. Bu O- antijenler hem polisakkarid hem de oligosakkarid yan zincirleri ile benzerlik gösterebilirler. Bu yüzden *Campylobacter* türleri, LPS ya da lipooligosakkarid (LOS) veya her ikisini birlikte üretebilirler (12). Lipopolisakkaridlerin, infeksiyonun ilerlemesine

neden olan serum dirençliliği, fagositik yıkıma karşı direnç oluşumu ve hücre toksisitesine katkı sağladığı bildirilmiştir (99).

Campylobacter jejuni'nin dış membranından elde edilen dört proteinin (PEB1, PEB2, PEB3, PEB4) Hep-2 hücrelerine yapışma yeteneğinde olduğu ortaya konmuştur (159). İmmunojenik karakterdeki bu proteinlerden biri olan PEB1, epitel hücrelerinde bulunan ve büyük bir yapışma proteini olan CEB1 ile benzerdir (159). PEB1'in yokluğu, farelere kolonize olmanın yanı sıra epitel hücrelerin adhezyonu ve invazyonu da olumsuz etkiler (158). Gastrointestinal epitel hücrelerindeki ekstraselüler matriksin bir proteini olan fibronektin glikoprotein yapısındadır ve gastrointesinal patojenlerin büyük bir çoğunluğu bu glikoproteine bağlanma özelliğindedir. *Campylobacter*lerin fibronektine bağlanması kolonizasyonun erken dönemlerinde meydana gelir ve bunu invazyon için gerekli olan novo protein sentezi takip eder (103). Son yıllarda *campylobacter*lerin hücre duvarlarında bulunan ve *Campylobacter* adhezyon geni (CadF) tarafından kodlanan CadF proteininin fibronektine bağlandığı gösterilmiştir (103). *In vivo* ortamlarda yapılan çalışmalarda *C. jejuni*'nin kanatlılara kolonize olması için CadF proteininin bulunması gerektiği bildirilmiştir (207). CadF'yi kodlayan genin, diğer bakterilerin dış membran proteinlerinin homoloğu olduğu tespit edilmiştir (103). Fimbrialar pek çok patojen bakterilerde bulunan önemli bir virulens faktördür ve bakterilerin hücrelere adhezyonunda görevlidirler (99). Klasik fimbrialar *campylobacter*lerde olmamasına rağmen, kıl benzeri fimbrial yapılar, bakterinin safra tuzu ile muamele edilmesi neticesinde gözlenmiştir (49). 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 identifiye edilememiştir (49).

Campylobacterlerle ilgili yapılan ilk araştırmalarda, virulens yönünden incelenen mekanizmalardan birisi, ishalleri neden olan *Vibrio cholerae* ve *Clostridium difficile* gibi bakterilerin de salgıladıkları toksin üretimidir. Araştırmalar enterotoksin ya da sitotoksin olarak isimlendirilen ekzotoksinler üzerine yoğunlaşmıştır (206). Enterotoksinler, hücre içinde siklik adenozin monofosfat (cAMP) seviyesinin yükselmesine ve hedef hücre reseptörlerine bağlanabilme yeteneğine sahip proteinler olarak tanımlanmaktadır (206). *Vibrio cholerae* toksin (CT) ve yakın ilişkili *Escherichia coli*'nin ısıya duyarlı toksini (LT) *Campylobacter* enterotoksinlerinin prototipleridir (188). *Vibrio cholerae* toksin ve LT iki alt üniteden 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. B alt ünitesi ile hücre reseptörlerine bağlanan enterotoksinler, A alt ünitesi ile hücre içine 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 ishallerin oluşmasına neden olur (206, 207).

Sitotoksinler hem hücre içinde hem de hücreler arasında etkili olan ve hedef hücreyi öldüren proteinler olarak tanımlanmaktadır. Hücre içi aktivite gösteren sitotoksinler hücreye yapışmayı takiben işlenerek hücre sitoplazmasına ulaşırlar ve hücreyi öldürürler. İkinci tür sitotoksinler hedef hücre porlarında formasyonlara, hücre içinde sitotoksin ve granül içeriklerinin salıverilmelerine

neden olurlar. Bu reaksiyon konakçı dokularında hafif lokal bozukluklara neden olur. Sitotoksinler ayrıca lökosit, granülosit ve makrofajları da öldürdükleri için konakçının immun cevabını baskırlar (99, 206). 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 (76) 2- HeLa ve Vero hücrelerini aktive eden sitotoksin ya da toksinler (66) 3- Cytolethal distending toksin (CDT) (94) 4- Shiga benzeri toksin (133) 5- Hemolitik etki gösteren sitotoksinler (101) 6-Hepatotoksinler (101) şeklinde sıralanmaktadır. Bunlardan CDT, genetik bölgesi klonlanmış ve sekans analizi yapılmış ilk toksindir. Benzer toksinler *E. coli*'de de tespit edilmiş (162) ve bu toksinin G2/Mitoz fazında HeLa hücre bölünmesini engellediği ve hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir (215).

3.1.4. Antimikrobiyal Dirençlilik

Son yıllara kadar insan ve hayvanlarda *Campylobacter* infeksiyonlarının tedavisi amacıyla en sık kullanılmış olan antibiyotikler florokinolonlardır. Florokinolonlar bakterilerdeki topoizomeraz IV ve DNA giraz (topoizomeraz II) enzimlerini inhibe ederek etkisini gösteren antimikrobiyal ajanlardır (88). Bu ajanlar geniş spektrumlu ve antimikrobiyal aktiviteleri yüksek olduklarından dolayı insan ve hayvanlardaki tüm bakteriyel infeksiyonların tedavisinde kullanıldıkları gibi *Campylobacter* ve diğer gastrointestinal infeksiyonların tedavisinde de sıklıkla kullanılmaktadırlar (87). Buna karşılık, 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 (54). Tayland'da 1994 yılında insan izolatlarında yapılan bir çalışmada *C. jejuni*'lerin büyük bir çoğunluğunun siprofloksasine dirençli olduğu bildirilmiştir (84). İngiltere'de ise tavuklara enrofloksasin ve sarafloksasin verilmeye başlanması, florokinolonlara dirençli *Campylobacter* infeksiyonunda artışlara neden olmuştur (178). Gelişmiş ülkelerde florokinolonlara dirençli *C. jejuni* izolatlarının ortaya çıkması, hayvan-gıda üretiminde dikkatli antimikrobiyal ilaç kullanımının gerekliliğini ortaya koymuştur. Campylobacterlerde antimikrobiyal dirençliliğe neden olan birçok faktör vardır. Örneğin, DNA giraz subunit A (*gyrA*) genindeki nokta mutasyonları campylobacterlerde florokinolonlara karşı direncin oluşmasına neden olmaktadır. Ayrıca bakteriyel hücre duvarındaki geçirgenliğin azalması ve eflüks pompasının aktivitesindeki yükselme florokinolonlarla birlikte tetrasiklin gibi diğer antibiyotiklere karşı dirençliliğin artmasına neden olmaktadır (88). Türkiye'de florokinolonlar 1989 yılında broylerlerde koruyucu amaçla yoğun olarak kullanılmaya başlanmasına rağmen, 1992 yılına kadar florokinolonlara dirençli *Campylobacter* izolatları tespit edilememiştir (46). Savaşan ve ark. (2004), kanatlı hayvanlarda kinolonlara karşı oluşan direnç ile ilgili yaptıkları bir çalışmada, 1987 yılındaki kanatlı izolatlarında enrofloksasin ve siprofloksasine karşı bir dirençliliğin olmadığını, 2000 yılında ise enrofloksasine % 76, siprofloksisine ise % 73 oranında bir direnç olduğunu tespit etmişlerdir (180). Bu sonuçlar, Türkiye'de kontrolsüz florokinolon kullanımının *Campylobacter* suşlarında yüksek düzeyde direnç oluşumuna ve yayılımına yol açtığını, bunun da gıda güvenliği ve hekimlik yönünden ciddi sonuçlar doğurabileceğini göstermektedir.

Campylobacter coli izolatları arasında antimikrobiyal ajanlara karşı meydana gelen direnç, *C. jejuni* izolatları ile kıyaslandığında oldukça yüksektir (1). Bae ve ark. (2005), sığırlarda yaptığı bir çalışmada siprofloksasine dirençliliğin *C. coli* izolatlarında % 44, *C. jejuni*'lerde % 5 ve diğer termofilik campylobacterlerde ise % 25 olduğu bildirmişlerdir (17).

Campylobacter türleri ayrıca tetrasiklin, ampisilin, klindamisin, nalidiksik asit, azitromisin, metronidazol vankomisin, rifampin, trimethoprim ve sefalosporin gibi antibiyotiklere de direnç göstermektedirler (4). Larkin ve ark.'nın (2006) besi sığırlarında yaptıkları bir çalışmada campylobacterlerin ampisiline % 18, azitromisine % 67, klindamisine % 47, tetrasikline % 44 ve streptomisine % 57 oranında dirençli olduğu bildirilmiştir (106).

3.1.5. Bağışıklık

Campylobacterler konakçı tarafından alındıktan sonra bunlara karşı doğal ve spesifik immun yanıt meydana gelir. Mide asiditesi gibi spesifik olmayan savunmalar, campylobacteriosis'in patogenezinde önemli rol oynamalarına rağmen etkenlerin bağırsak epiteline kolonize olması ve infeksiyonun önlenmesinde yeterli değildir (203). Konakçı tarafından alınan bu etkenlere karşı fagositik hücrelerden interlökin-8 (IL-8) adı verilen bir ön yangı sitokini salıverilir (81). Bu gibi doğal konakçı cevabı, infeksiyonun yayılmasını sınırlayabilmekle birlikte kısmen de olsa semptomlar meydana gelebilir. Ekstraselüler patojen olarak bilinen campylobacterlerin meydana getirdiği infeksiyonlara karşı humoral immun yanıt oluşur. 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 (96, 204) Erken yaşlarda *Campylobacter* etkenlerini alan hayvanlarda kademeli olarak gelişen bu antikorlar hayvanları daha sonraki infeksiyonlardan genellikle korur ve bağırsaktaki etkenlerin zamanla buradan eliminasyonunu sağlarlar. Meydana gelen bu sekonder immün yanıt hastalığın yayılmasını sınırlayan bir bariyer görevi görür. İmmün sistemi baskılanmış hastalarda hastalığın daha uzun, şiddetli seyretmesi ve nükslerin görülmesi bu görüşü destekler (187). Humoral immün yanıtı ilave olarak hücresel immün yanıt bakteriyel infeksiyonu ortadan kaldırmada ya da sınırlamada önemlidir (207). Hücresel immün yanıt genel olarak zorunlu ya da fakültatif hücre içi patojenlere karşı gelişen spesifik bir immün yanıtıdır. *Campylobacter* etkenleri ekstraselüler patojen olmalarına rağmen, yapılan çalışmalar bu etkenlerin bağırsak epitel hücreleri ve makrofajların içinde de canlı kalabildiğini göstermiştir (203). Özellikle infeksiyonun şiddetli seyrettiği hipo ve agammaglobulinemili hastalarda hücresel immün yanıtın infeksiyondan korunmada önemli bir role sahip olduğu rapor edilmiştir (15, 126). Vuckovic ve ark. (2006), C57BL/6 farelerinde yaptıkları bir araştırmada CD8⁺ ve CD4⁺ T lenfositlerinin fareleri *Campylobacter* infeksiyonlarına karşı korumada önemli rol aldıklarını bildirmişlerdir (203). *Campylobacter 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 (207). İnfeksiyon özellikle immün sistem

baskılayan HIV ve benzeri hastalık durumlarında oldukça şiddetli bir şekilde seyreder (165). Genç yaşlarda etkene maruz kalan insan ve hayvanlar, ileriki yaşlarda etkenle tekrar infekte olduklarında hastalıktan etkilenmezler ve geçici bir taşıyıcılık gösterirler (35).

3.1.6. Klinik Belirtiler

Campylobacter jejuni ve *C. coli* gebe sığırlarda sporadik abortlarla seyrederken gebe koyunlarda enzootik abortlara neden olurlar. Gebe hayvanlarda abortus öncesi veya sonrasında hafif bir ishal görülür. *Campylobacter*ler kuzularda besi ishali olarak adlandırılan enteritlere neden olurlar. İnfeksiyon sulu bir ishalle karakterizedir. Bu etkenler ayrıca genç kuzularda sporadik seyirli dizanterik enterit ve kolitise de neden olabilirler. Bu infeksiyon tipinde vücut sıcaklığı artar, dışkı yumuşar, mukoid bir hal alır ve taze kan pıhtıları görülür. *Campylobacter jejuni* ve *C. coli* yeni doğan ve süten kesilen buzağılarda da enterik infeksiyonlar oluştururlar. İnfeksiyon koyunlarda olduğu gibi genellikle dizanterik formda seyreder. Hayvanlarda bakteriyemiye bağlı olarak yüksek ateş, mukuslu veya kanlı dışkı dikkati çeker (11, 169). Termofilik *campylobacter*ler sığırların mastitis vakalarından da izole edilmişlerdir (172).

3.1.7. İnsanlarda *Campylobacter* İnfeksiyonları

Campylobacter jejuni ve *C. coli* bütün dünyada insanlardaki akut bakteriyel gastroenteritisin en önemli etkenleridir. Amerika'da her yıl 2,5 milyon *campylobacteriosis* vakasının meydana geldiği bildirilirken (120), İngiltere'de sadece 2001 yılında 54 binin üzerinde *campylobacteriosis* vakası rapor edilmiştir

(8). *Campylobacter*lerin insanlarda meydana getirdiği enteritis vakalarının *Salmonella*, *Shigella* ve *E. coli* gibi diğer bakterilerle kıyaslandığında oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (120). Örneğin İngiltere’de 1999 yılında 55000 civarında *Campylobacter* vakası meydana gelirken aynı periyot içinde bu miktar *Salmonella* için 17500 civarındadır (4). *Campylobacteriosis* gelişmiş ülkelerde olduğu kadar gelişmekte olan ülkelerde özellikle de çocuklar arasında büyük bir problem olarak ortaya çıkmaktadır (207).

İnsanlarda *C. jejuni* ve *C. coli*’nin yaptığı hastalıkların klinik belirtileri, şiddetli yangısal ishalden, genellikle orta şiddette yangısal olmayan sulu ishale kadar değişir. İlki, gelişmiş ülkelerde görülen en yaygın klinik belirti iken, ikincisi ise, genellikle gelişen ülkelerde görülen hastalık belirtileridir. Klinik olarak *Campylobacter* infeksiyonları, *Salmonella*, *Shigella* ve *Yersinia* türleri gibi diğer bakteriyel patojenlerin sebep olduğu akut gastrointestinal hastalıklardan ayırt edilemez (24). Yangısal hastalıkla sonuçlanan *C. jejuni* ve *C. coli* infeksiyonları, akut abdominal ağrı, sık sık görülen ateş ve genel rahatsızlık belirtileri ile seyreder. İshalli dışkı genellikle taze kan, mukus ve lökositli yangısal eksudat içerir. *Campylobacter*ler, enteritli hastalardan izole edildiği gibi klinik belirtilerin bitiminden sonraki birkaç hafta içerisinde de dışkıdan izole edilebilir. İnfeksiyon, bir haftadan daha uzun ve şiddetli hastalık belirtileri ile seyretmesine rağmen, hastalık kendi kendini sınırlar ve komplikasyonlar yaygın değildir (97).

Campylobacter infeksiyonlarının lokal komplikasyonları gastrointestinal yollarda bulunan etkenlerin direkt yayılması sonucu oluşur. Gastrointestinal hemorajiler, peritonitis, pankreatitis, kolitis gibi komplikasyonlar şekillenebilir. *Campylobacter* infeksiyonlarının ekstraintestinal komplikasyonları oldukça

nadirdir ve neonatal sepsis, osteomyelitis, septik artritis, endokarditis ve meningitis gibi belirtileri içerir (186). İnfeksiyon sonrası en önemli bozukluğun Guillain-Barre Sendrom (GBS) olduğu bildirilmiştir. Bu sendrom periferel sinirleri etkileyerek felçlere neden olan bir hastalıktır ve üç farklı klinik formu vardır. Akut demiyalize formu sekonder aksonal dejenarasyona, akut motor aksonal formu akut motor-sensörlerde bozuklara neden olur. Son form ise oftalmoplejilerin ve ataksilerin meydana geldiği Miller-Fischer sendromdur. Gelişmiş ülkelerde GBS hastalığının yıllık insidensinin 100 bin vakada 1,3 olduğu bildirilmiştir (140).

3.1.8. Tanı

Campylobacter infeksiyonlarının tanısı, genellikle dışkı, kan ve diğer örneklerden etken izolasyonu ile yapılır. Enteritli hastaların dışkılarının direkt incelemesinde; lökosit varlığının yanı sıra karanlık saha veya faz-kontrast mikroskopta hızlı hareket eden bakterilerin görülmesi tanıya yardımcı bulgulardır (74). Bazik fuksin ya da karbol fuksin kullanılarak modifiye edilmiş bir Gram boyama, dışkıdan direkt olarak organizmanın tespiti için kullanılır, fakat kesin tanı için dışkı kültürü yapılması gerekir (138). *Campylobacter*ler hayvan, gıda ve çevresel örneklerde düşük oranlarda bulduklarından dolayı diğer mikroorganizmalar bu bakterilerin izolasyonunu büyük oranda baskılamaktadır. *Campylobacter*ler vankomisin, polimiksin B, trimetoprim laktat ve sefalosporin gibi bazı antibiyotiklere karşı dirençlidirler, dolayısıyla bu antibiyotikler *campylobacter*lerin izolasyonu için kullanılan besi yerlerine sıklıkla ilave edilmektedirler (143). *Campylobacter*lerin dışkıdan ilk izolasyonu vankomisin,

polimiksin B ve trimetoprim içeren selektif bir besi yerini geliştiren Skirrow tarafından gerçekleştirildi (183). Skirrow besi yeri dışkıdan campylobacterlerin izolasyonu için etkili olmasına rağmen, kontamine gıdalar ve çevresel örnekler için uygun değildir. Bu durum gıda ve çevreden campylobacterlerin izolasyonu için daha etkili ve uygun bir besi yeri olan Preston besi yerinin geliştirilmesine yol açmıştır (26). Blaser ve ark. (1979) klinik laboratuvarlarda çok yaygın olarak kullanılan Campy-BAP besi yerini (22), Bolton ve ark. (1984) ise sefazolin ve sodyum deoksikolat içeren CCD besi yerini (25) tanımlamışlardır. Ayrıca Karmali ve ark. (1986), campylobacterlerin selektif izolasyonu amacı ile vankomisin, sikloheksimid, sefoperazon içeren CSM ve trimetoprim, polimiksin B, vankomisin içeren SKM besi yerlerini geliştirerek kullanmışlardır (98). Bu selektif besi yerlerinin dışında son yıllarda campylobacterlerin dışkıdan izolasyonu amacı ile daha etkili ve duyarlı olan CAT (sefoperazon, amfoterin B, teikoplanin) ve modifiye edilmiş CCDA (sefoperazon, amfoterin B) gibi selektif besi yerleri geliştirilerek kullanılmaktadır (13, 39).

Campylobacterlerin izolasyonu için bazen ön zenginleştirme metodu kullanmak gerekmektedir. Zenginleştirme aşaması, ishallerden toplanan dışkı örnekleri gibi klinik numuneler için gerekli olmamakla birlikte, gıda ve çevresel örneklerden etken izolasyonu için önem arz etmektedir. Bu çeşit örneklerde *Campylobacter* etkenleri düşük miktarlarda bulunduğu için zenginleştirme aşaması izolasyon oranını yükseltebilir (3, 73). Campylobacterlerin izolasyonu için kullanılan diğer bir metot membran-filtrasyon tekniğidir. Birçok bakterinin aksine campylobacterler 0,45 µm çapındaki filtrelerden rahatlıkla geçebilirler. Genellikle dışkıların % 10 süspansiyonu

membran filtresi üzerine konur ve filtre edilmiş örnekler selektif besi yerine ekilir. Riberio ve Price (1984), filtrasyon tekniği ve Preston selektif besi yeri kombinasyonunun *Campylobacter* izolasyon oranını artırdığını bildirmişlerdir (170).

Selektif besi yerleri kullanılarak campylobacterlerin izolasyonu oldukça uzun sürmektedir. Özellikle bu etkenlerin çok düşük oranlarda bulunduğu gıda ve çevresel örneklerden izolasyonunda zenginleştirme aşaması da gerektiğinden, izolasyon için yaklaşık beş günlük bir süreye gereksinim vardır. Kültür metotlarının bu dezavantajından dolayı gıda ve çevreden campylobacterlerin saptanabilmesi için alternatif metotların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Konakçıda campylobacterlere spesifik poli ve monoklonal antikoların oluşması, bu antikoları tespit eden teşhis metotlarının geliştirilerek kullanılmasına yol açmıştır (78, 139). *Campylobacter* antijenlerinin antikolarla aglütinasyonunda Campyslide BBC Microbiology system, Meritec-Campy Meridian Diagnostics ve Microscreen Mercia Diagnostics gibi çeşitli testler kullanılmaktadır. Bu testler, *C. jejuni*, *C. coli* ve *C. lari* gibi enteropatojen campylobacterlerin teşhisi için tasarlanmıştır. Meritec-Campy yönteminin çok basit bir şekilde uygulanabilmesi avantajı iken, *C. lari* gibi bazı türleri tespit edememesi dezavantajdır (139). Microscreen, *Campylobacter* türlerinin büyük bir çoğunluğu ile reaksiyona girerek bu türleri tespit edebilir. Ayrıca *Campylobacter* olmayan türlerle kros reaksiyon oluşturmaması ve Campyslide'ye göre kullanımının daha kolay olması gibi avantajları vardır (78). Lateks aglütinasyon metotları standart kültür metotları kadar duyarlı olmamasına rağmen dışkı ve gıda örneklerinden campylobacterlerin direkt tespiti için sıklıkla kullanılmaktadır (139). Yine dışkı örneklerinden

campylobacterlerin direkt tespiti için Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA) tekniği kullanılmaktadır. Bu tekniğin spesifitesinin % 99, sensitivitesinin ise % 96 olduğu, 50 adet *Campylobacter* kültür pozitif ve 114 adet kültür negatif dışkı örneğini inceleyen araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (197). İmmunolojik metotlar rutin laboratuvarlarda kolaylıkla uygulanabilir olup, çok pahalı değillerdir. Bu testler konvansiyonel kültür metotlarıyla karşılaştırıldığında, sonuçların daha çabuk elde edilmesi, kolay yorumlanabilmesi ve çevresel koşullara daha az duyarlı olması gibi birçok avantaja sahiptirler (150).

Campylobacterlerin insan ve hayvanlardaki prevalansının artış göstermesi, bu türlerin daha çabuk ve güvenilir bir şekilde saptanmasına olanak sağlayacak yeni teşhis yöntemlerinin geliştirilmesi ihtiyaını doğurmuştur. Son zamanlarda, konvansiyonel kültür metotları ile kıyaslandığında sensitivite ve spesifitesi daha yüksek olan ve çok daha kısa sürede sonuç veren nükleik asit tabanlı moleküler metotlar teşhis amaı ile sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Etkenin flagellin gen bölgelerini hedef alan spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) campylobacterlerin teşhisi amaçıyla uygulanmıştır (37, 156). Ayrıca etkenin 16S ribozomal DNA (rDNA) (34), *ceuE* (demir bağlayan protein) (58), aspartokinaz (125), oksidoredüktaz (125) ve hippurikaz genini (18) hedef alan PCR uygulamalarına gidilmiştir. Bu yöntemle çok sayıda örneğin etkene spesifik primerler yardımıyla çok kısa süre içerisinde teşhis edilmesi mümkündür. Aynı zamanda PCR metodunda, kültür işlemine gerek kalmadan numuneden direkt DNA ekstraksiyonu ile doğru bir şekilde etken teşhisi yapmak mümkündür (90). Bununla birlikte, son zamanlarda multipleks PCR gibi yöntemler ile birden fazla etkenin aynı anda saptanabilmesine olanak tanıyan

metotlar geliştirilmiştir (125, 163). Bu metotların dışında nested PCR ve PCR-ELISA gibi modifiye edilmiş farklı PCR teknikleri de campylobacterlerin saptanması için kullanılmıştır (86, 216). Yine son yıllarda real-time PCR tekniği *Campylobacter* ve diğer mikroorganizmaların teşhisinde sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Bu tekniğin avantajları; PCR sonrası elektroforez vb. ekstra görüntülemeye gerek duyulmaması ve DNA'nın kantitatif olarak yoğunluğunu hesaplamaya olanak vermesidir (93, 148).

3.1.9. Tedavi ve Koruma

Campylobacter infeksiyonları sığır ve koyunlarda genellikle kendiliğinden geçtiğinden dolayı tedaviye gerek yoktur. Ancak özellikle genç hayvanlarda meydana gelen *Campylobacter* infeksiyonlarının tedavisi gerekmektedir. Bu amaçla, hayvanlara oral ya da parenteral yolla kloramfenikol, eritromisin, gentamisin ve tetrasiklin gibi antibiyotik tedavisinin yanı sıra sıvı tedavisi uygulanmalıdır. Gebe hayvanlarda ise tedavinin başarı şansı erken teşhise bağlıdır. Eğer erken dönemde hastalık teşhis edilip antibiyotik tedavisi uygulanırsa abort olayları büyük oranda önlenir (6, 62).

Campylobacter jejuni ve *C. coli* koyun ve sığırların bağırsaklarında kommensal olarak bulunabildiğinden hijyenik tedbirlerle infeksiyonu önlemek mümkün değildir. *Campylobacter*lerin meydana getirdiği abortlardan korunmanın en etkin yolu aşılama değildir. Bu amaçla *C. jejuni*, *C. coli* ve *C. fetus* subsp. *fetus*'u içeren bivalent aşılar kullanılmaktadır. Hastalığı atlatan hayvanlar bağışıklık kazandıkları için böyle hayvanlara aşı yapılmasına gerek yoktur. Aşılama sadece sürüye yeni giren hayvanlar ile ilk kez gebe kalan hayvanlara uygulanır. Enterik

Campylobacter infeksiyonlarına karşı ise bir aşı geliştirilememiştir. Böyle infeksiyon durumlarında hasta hayvanların sürüden ayrılması, farklı hayvan türleri arasındaki temasın azaltılması, yem ve suların dışkı ile bulaşmasının engellenmesi başlıca koruyucu önlemlerdir (11, 62).

3.2. *Campylobacter jejuni* ve *C. coli*'nin Moleküler Tiplendirilmesi

Epidemiyolojik araştırmaların temel amacı mikroorganizmaların kaynak, rezervuar ve yayılma yollarını belirleyerek bunlara karşı kontrol önlemleri geliştirmektir. Bu nedenle infeksiyon olgularından izole edilen aynı cins veya türden olan etkenlerin birbirinin aynı olup olmadıklarının belirlenmesi yani alt tiplendirmenin yapılması gereklidir. Genel anlamda ele alınacak olursa alt tiplendirme; infeksiyon epidemilerinin, çapraz yayılımın bulunup bulunmadığının, infeksiyon kaynaklarının, özellikle virulent suşların tanımlanmasında ve aşılama programlarının izlenmesinde büyük önem taşımaktadır. İnfeksiyon olgularından izole edilen etkenlerin tiplendirilmesi, sadece etkin sağaltıma yönelik ve koruyucu önlemlerin alınmasında değil, aynı zamanda bunlara yönelik eradikasyon planlarının kısa sürede hazırlanması bakımından da oldukça önemlidir (147, 166).

*Campylobacter*lerin doğru bir şekilde tiplendirilmesi, hem klinik ve epidemiyolojik veriler açısından hem de infeksiyon kaynağının doğru bir şekilde tespit edilmesi açısından oldukça önemlidir. *Campylobacter* türlerinin tiplendirilmesi için fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılmaktadır.

3.2.1. Fenotiplendirme

Campylobacterlerin tiplendirilmesinde en yaygın olarak kullanılan fenotipik yöntemler, serotiplendirme ve biyotiplendirmedir.

3.2.1.1. Serotiplendirme

Campylobacterlerin serotiplendirilmesinde kullanılan iki yöntemden biri olan Penner yöntemi, pasif hemaglutinasyon tekniklerinin kullanılmasına dayanan ısıya dayanıklı (HS) antijenler esas alınarak yapılır. Penner'in ısıya dayanıklı yönteminde, lipopolisakkarid O (somatik) antijeni kullanılır. İndirekt hemaglutinasyon tekniği kullanılarak yapılan bir araştırmada, *C. jejuni*'nin 47 ısıya dayanıklı (HS ya da O) serotipi, *C. coli*'nin ise 18 HS serotipi tanımlanmıştır (161). Lior yöntemi, ısıya duyarlı (HL) antijenlerin kullanılmasına dayanan bir bakteriyel aglutinasyon yöntemidir. Bu yöntem ile *C. jejuni* ve *C. coli*'nin 100'ün üzerinde serotipi tanımlanmıştır (108). Bu iki tekniğin en büyük dezavantajları tiplendirilemeyen suşların fazla olması, zaman kaybı ve kompleks olmasıdır. Serotiplendirme yöntemleri için antiserum ayıraçlar yaygın olarak mevcut değildir. Bu gibi sorunlardan dolayı ulusal ve uluslararası epidemiyolojik araştırmalar için serotiplendirme yöntemlerinin kullanımı sınırlıdır (157).

3.2.1.2. Biyotiplendirme

Rutin laboratuvarlarda *Campylobacter* türlerini ayırmak için çoğunlukla biyokimyasal testlere başvurulur. Önceki yıllarda yapılan çalışmalarda campylobacterler; katalaz (+), katalaz (-) ve termofilik campylobacterler gibi özel gruplar halinde ayrılıyordu (174, 175). Campylobacterlerin taksonomisinde

meydana gelen önemli değişiklikler, bu testlerin doğruluğu ve geçerliliğinin azalmasına sebep olmuştur. Ayrıca *C. jejuni* ve *C. coli*'yi ayırmak için tek biyokimyasal test olan hippurat testi kullanılmaktadır (Tablo 1). *Campylobacter jejuni* hippurat pozitif, *C. coli* ise negatif olmasına rağmen bazı durumlarda hippurat negatif *C. jejuni* suşları tespit edilmiştir. Bu nedenle sadece bu testi kullanarak *C. coli*'leri hippurat negatif olan *C. jejuni*'lerden ayırt etmek olası değildir (185). Bazı *Campylobacter* türleri doğal olarak nalidiksik aside dirençli olduğundan dolayı identifikasyonda bu test de kullanılmaktadır. Ancak kinolonlara dirençli *Campylobacter* türlerinde, çapraz dirençle nalidiksik aside direnç de arttığı için bu testle campylobacterleri ayırmak zordur (171).

Campylobacter türlerinin alt tiplendirilmesinde kullanılan diğer fenotipik yöntemler arasında; antimikrobiyal maddelere duyarlılık (resistotyping), faj tiplendirmesi, etkenlerin çeşitli özelliklerinin (morfolojik, toksin, flagella, kapsül vs.) tespiti, immunblotlama (immunoblotting) ve multilokus enzim elektroforezi (MEE) sayılabilir (130, 132, 205).

Fenotipik testler kullanılarak campylobacterleri ayırt etmede iki ana sorun ile karşılaşmaktadır. İlki, kullanılan testlerin standardizasyon eksikliğidir. Uygulanan fenotipik testlerin sonucunun kullanılan metodolojiden etkilendiği bildirilmiştir (167). Çoğu araştırmacı bu testleri laboratuvarlarında farklı biçimlerde uygularlar. Bu da aynı testi kullanılarak aynı suşlardan farklı sonuçlar elde eden araştırmacılar arasındaki belirgin çelişkiyi açıklar. Sonuç olarak bu testlerin doğruluğu ve geçerliliği şüphelidir (150). İkinci büyük sorun, mevcut fenotipik testlerin mikroorganizmaları identifiye etmedeki yetersizliğidir. Şu ana kadar tanımlanan çoğu testler bilinen bir sınıfın fenotipik profili ile bilinmeyen

sonuçlarının karşılaştırılması esasına dayanır. Bu nedenden dolayı, *Campylobacter* gibi taksonomisi kompleks olan bakterilerde bu testlerin kullanılması zordur (167). Bu testler nadir bulunan ve yeni tanımlanan türlerle karşılaşıldığında ya da türler arasında belirgin ayrıcalıklı özellikler yoksa hatalı sonuçlara neden olabilir (149).

3.2.2. Genotiplendirme

Campylobacterlerin tiplendirilmesinde kullanılan fenotipik yöntemlerin yukarıda sayılan birçok dezavantajlarının olması, bu türlerin tiplendirilmesinde alternatif yöntemlere gereksinim duyulmasına yol açmıştır. Bu amaçla son yıllarda birçok genotipik metot geliştirilerek kullanılmaya başlanmıştır. Genotiplendirme yöntemleri fenotiplendirmeye göre; tekrarlanabilirlik, tiplendirilebilirlik ve ayırım gücü yönünden daha üstündür. Genotiplendirme yöntemlerinin geliştirilmesiyle infeksiyonların epidemiyolojisinin açıklanmasında büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu metotlar ile, tür içinde değişken ancak suşlarda stabil olan belirli genetik göstergeler kullanılarak, epidemiyolojik olarak ilişkili aynı tür içindeki izolatların genetik olarak da ilişkili olup olmadıkları araştırılmaktadır. Moleküler tiplendirme yöntemleri; infeksiyonların kaynağı ve yayılma yolları hakkında hipotezlerin test edilmesi, infekte hayvanların epidemiyolojik olarak birbiri ile olan ilişkilerinin belirlenmesi, antibiyotik tedavisinin etkinliğinin belirlenmesi, antibiyotik direncinden sorumlu genler hedef alınarak yapılan tiplendirme ile dirençli suşların tanımı ve yaygınlıklarının belirlenmesi, popülasyondaki epidemik suşların zaman içindeki prevalansını izleyerek epidemiyolojik olarak koruma ve kontrol yöntemlerinin

değerlendirilmesi, virulensten sorumlu genlerin belirlenmesi ve bunları taşıyan suşların populasyon içindeki yaygınlıklarının ortaya konulması gibi amaçlara ulaşmada yardımcı olur (9, 53, 210).

Son yıllarda campylobacterlerin epidemiyolojisini ortaya koymak için çeşitli tiplendirme metotları geliştirilerek kullanılmıştır. Bu moleküler tiplendirme metotlarının başlıcaları; *flaA* tiplendirme, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), ribotiplendirme, Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) ve Multilocus Sequence Typing (MLST) yöntemleridir.

3.2.2.1. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) – Flagellin A (*flaA*) Tiplendirme

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) metodu, farklı suşların DNA'larının PCR ile amplifikasyonunu müteakip restriksiyon enzimleriyle muamele edilmesi ve agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak bant görünümündeki farklılıkların ortaya konulmasını amaçlayan bir metot olarak karşımıza çıkar (9). Yani bilinen bir gen dizisinin amplifiye edilmesi ve restriksiyon endonükleazlarla kesilmesini içerir. RFLP metodu, uygulanması ve yorumlanması kolay olan, yaklaşık bir gün gibi bir sürede sonuç veren bir metot olarak birçok mikroorganizmanın ayırımına olanak tanımıştır (147, 200).

Campylobacter türlerinin PCR-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 PCR ürünlerinin RFLP

analizi için uygundur (121). Ayrıca *Campylobacter* spp.'deki *flaA* geni, önemli bir sekans heterojenitesi gösterir ve dolayısıyla moleküler analizler için iyi bir epidemiyolojik marker olarak kullanılır (141). *Campylobacter jejuni* ve *C. coli* *flaA* genlerindeki korunma bölgeleri diğer *Campylobacter* türlerinde de kısmen bulunduğundan dolayı *C. jejuni* ve *C. coli*'nin tiplendirilmesi için geliştirilen primerler diğer *Campylobacter* türlerinin tiplendirilmesinde de kullanılmaktadır (153).

Campylobacter türlerinin tiplendirilmesi için bugüne kadar farklı prosedürlere sahip en az yedi *fla* tiplendirme yöntemi geliştirilmiş ve kullanılmıştır (16, 20, 30, 100, 141, 146). Fakat en yaygın olarak kullanılan *fla* tiplendirme metotları Nachamkin ve ark. (1996) ile Ayling ve ark. (1996) tarafından geliştirilmiştir (16, 141). Bu iki teknik arasında PCR yönteminin uygulanması ile ilgili farklılıklar mevcuttur. Ayling ve ark. (1996) *flaA* ve *flaB* gen bölgelerinin her ikisini de çoğaltmak amacı ile üç farklı primer kullanmışlardır. *FlaA* gen bölgesi birkaç noktada *flaB* gen bölgesinden önemli derecede farklılık gösterdiğinden dolayı, her iki gen bölgesinin birlikte çoğaltılıp *fla* tiplendirmeye tabi tutulmasının ilave bir ayırım gücü sağladığı bildirilmiştir (16). Diğer yandan Nachamkin ve ark. (1996) sadece *flaA* gen bölgesini amplifiye ederek tiplendirmeye tabi tutmuşlardır (141). Ayrıca her iki metotta kullanılan restriksiyon enzimlerinde de farklılık vardır. Her iki metotta da *DdeI* enzimi kullanılmasına rağmen ikinci enzim olarak Ayling ve ark. (1996) *HinfI*, Nachamkin ve ark. (1996) ise *AluI* restriksiyon enzimini kullanmışlardır (16, 141).

PCR ürünlerini fragmentlere ayırmak için kullanılan restriksiyon enzimleri önemli derecede farklılık gösterir. *Campylobacter*lerin PCR-RFLP ile tiplendirilmesi için şimdiye kadar *AluI*, *DdeI*, *HinI*, *EcoRI* ve *PstI* gibi enzimler yalnız ya da çeşitli kombinasyonlarda kullanılmıştır (5, 30). Sadece *HinI* ile yapılan kesme işleminin yeterli olmadığı görülmüştür (154). Buna karşılık *DdeI*, veteriner izolatları için en iyi ayırım gücü sağlayan enzim olarak bildirilmiştir (16).

3.2.2.2. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı tiplendirme metodlarından bir diğeri olan RAPD yönteminde bilinen özgül bir DNA bölgesini çoğaltmak yerine randomize edilen bir veya daha fazla primerle DNA'daki birçok bölgenin çoğaltılması gerçekleştirilmektedir (212). İzolatların büyük bir çoğunluğunu araştırmak ve tiplendirmek amacı ile kullanılan en etkili, basit ve ucuz tekniklerden biri olan RAPD yöntemi, bakteriyel genomun tamamındaki polimorfizmi araştırmaya uygun olduğundan, *Campylobacter* ve diğer çok sayıdaki bakterinin moleküler tiplendirilmesi için sıklıkla kullanılmış ve ayırım gücünün oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (79, 80, 82, 111). *Campylobacter* türlerinin RAPD ile tiplendirilmesinde en sık kullanılan primerin OPA-11 olduğu rapor edilmiştir (79, 80). RAPD metodu teorikte yüksek bir tiplendirme sağlarken, pratikte incelenen suşların %14'ü DNaz aktivitesinden dolayı tiplendirilememiştir (60). Kullanılan primerlerin seçimi RAPD analizinin sonucunu etkiler. İki primerin kullanılması kompleks bantların oluşmasına sebep olmaktadır (118). 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. Bu sorunları gidermek için kullanılan hedef DNA ekstraksiyon protokolü ile birlikte DNA, MgCl₂ ve *Taq* DNA polimeraz enzim konsantrasyonlarının da çalışma süresince sabit tutulması gerekmektedir (160, 212).

Salgınlardan elde edilen *C. jejuni* ve *C. coli* izolatlarının RAPD ile yapılan tiplendirilmesinde bantlarda küçük farklılıklar meydana gelebilir ve bu farklılıklar verilerin yorumlanmasında karışıklığa yol açabilir. Bu gibi farklılıklar hedef olarak saflaştırılmış DNA kullanıldığı zaman bile meydana gelebilir. Bu farklılığın oluşmasında; thermal cycler'deki hatalar, hedef DNA'nın saflaştırılması ve uygulanan yöntemler muhtemel sebep olarak düşünülebilir. Bantların analizlerinin bilgisayar ortamında yapılması verilerin kıyaslanmasına ve daha iyi yorumlanmasına yardımcı olabilir (110, 160).

3.2.2.3. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Bakteriyel kromozomların restriksiyon enzimleriyle muamelesinin birçok bakteri için faydalı bir tiplendirme tekniği olduğu kanıtlanmıştır (196). Elde edilen DNA fragmentleri, genelde çok büyük olmasına (20-200 kb) rağmen, özel elektroforetik koşullar kullanılarak büyüklüklerine göre ayrılabilirler (189). *Campylobacter* türlerinin sahip olduğu herhangi bir plazmid, PFGE ile tespit edilebilir. Ekstrakte edilen ve saflaştırılan DNA'yı içeren bloklar direkt olarak agaroz jele yüklenir. Elektrik alanın yönünü bir nabız tarzında değiştiren ortamlar kullanılarak elektroforez işlemi gerçekleştirilir (63). PFGE, ilk olarak *C. jejuni* ve *C. coli* için geliştirilmiş (218), daha sonra *C. upsaliensis* ve diğer türlere adapte

edilmiştir (28). PFGE metodunda kromozomal DNA'yı kesmek için çeşitli restriksiyon enzimleri kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda *SmaI*, *SaII*, *KpnI*, *ApaI* ve *BssHIII* ile tatmin edici sonuçlar alınmıştır (72, 117). PFGE ayırım gücü oldukça yüksek olmasına rağmen, pahalı, ekipman ve uzun zaman gerektiren bir tekniktir (210).

3.2.2.4. Ribotiplendirme

Campylobacter kromozomları üzerinde ribozomal RNA (rRNA) gen bölgesinin çeşitli kopyaları (16S ve 23S rRNA) farklı pozisyonlarda bulunmaktadır. Ribozomal RNA genindeki bölgelerin korunması ve bağlanma bölgelerinin yüksek oranda değişkenlik göstermesinden dolayı bu genler alt tiplendirme amaçları için uygun hedeflerdir (42). 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 (210). Önceki ribotiplendirme yöntemleri *C. jejuni* ve *C. coli* suşlarının tam olarak ayırımında başarısız kalmıştır (59). Ancak son yıllarda 16S rRNA genine spesifik prob ile iki restriksiyon enzimi kullanılarak campylobacterler tiplendirilmiştir (64). Ribotiplendirmede kromozomları kesmek amacıyla kullanılan restriksiyon enzimleri farklılıklar göstermektedir. *PstI*, *HaeIII*, *HindIII* ve *PvuII* tek başlarına, çift ya da bazen üç enzimi içeren kombinasyonlar halinde kullanılabilir (59, 71). Bu metot, 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 (210).

3.2.2.5. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Bu teknik ilk olarak bitkilerin genetik analizi için geliştirilmiş (107), daha sonra bakterilerin tiplendirilmesi amacıyla da kullanılmıştır (92). Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), biri 4 bp bölgesini diğeri 6 bp bölgesini tanıyan iki restriksiyon enzimi ile kromozomal DNA'nın kesilmesi esasına dayanır. Amplifikasyonda kullanılan primerlerden biri radyoaktif ya da flöresan işaretlidir. İşaretli PCR ürünleri poliakrilamid jel ile analiz edilir. Bu, 50-500 nükleotid uzunluğundaki fargmentlerin ayırımına izin verir. AFLP, herhangi bir bakteriyel tür için adapte edilebilir, fakat kullanılan restriksiyon enzimleri ve spesifik nükleotitler her bir tür için ayrı ayrı düzenlenmelidir (210). AFLP analizi son yıllarda *C. jejuni* suşlarının alt tiplendirilmesi için sıklıkla kullanılmıştır (52). Bu tekniğin en büyük avantajı ayırım gücünün yüksek, dezavantajı ise kompleks olmasıdır. Ayrıca maliyeti diğer testlerle karşılaştırıldığında oldukça yüksektir (210).

3.2.2.6. Multilocus Sequence Typing (MLST)

Her ne kadar diğer yöntemlere göre biraz pahalı olsa da son yıllarda multilocus sequence typing (MLST) metodu giderek rağbet görmektedir. Bu yöntemde, bütün campylobacterlerde bulunan ve protein kodlayan genlerin birkaç tanesinin belli bölgelerinin dizi analizi yapılmakta ve internet üzerinde karşılaştırmaların yapılabileceği kısmen standardize edilmiş bir veri tabanı bulunmaktadır (113, 193). Bakterilerde meydana gelen mutasyon ve

rekombinasyon gibi değişiklikler kromozomlarda genetik farklılıklara neden olmaktadır. Hücredeki metabolik fonksiyonların devamını sağlayan protein kodlayan genler (housekeeping) meydana gelen bu genetik değişikliklere karşı dayanıklıdırlar. Bu sebeple MLST yönteminde hedef gen olarak kullanılmaktadırlar (56, 193). *Campylobacter*lerde 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 (199). MLST, *Campylobacter* türlerini de içeren birçok bakterinin tiplendirilmesi için sıklıkla kullanılmıştır (48, 122, 123). Ancak *campylobacter*lerle ilgili yapılan çalışmaların çoğunda insanlardan elde edilen izolatlar üzerine yoğunlaşmış olup, veteriner izolatları üzerine yapılan çalışmalar oldukça azdır (36, 115).

Yukarıda belirtilen tiplendirme metotları 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. 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 (16, 82). Bu tiplendirme metotlarından RAPD'nin ayırım gücünün PFGE ve diğer birçok tiplendirme metodu ile karşılaştırıldığında oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (145, 151).

3.3. Amaç

Bu çalışmada;

- a) Elazığ ili ve çevresindeki sığır ve koyunlardan toplanan rektal svap örnekleri ile Elazığ merkezindeki bir mezbahada kesilen sığır ve koyunlardan toplanan karaciğer, bağırsak içeriği ve safra örneklerinden *Campylobacter* spp. izolasyonu ve *C. jejuni* ve *C. coli*'nin spesifik multipleks PCR ile identifikasyonu,
- b) *Campylobacter jejuni* ve *C. coli* olarak identifiye edilen izolatların *flaA* gen bölgesinin spesifik PCR ile çoğaltılması,
- c) Bu etkenler arasındaki genetik farklılıkların *flaA* ve RAPD tiplendirme yöntemleri ile ortaya konması,
- d) *FlaA* ve RAPD metotlarının ayırım kapasitelerinin karşılaştırılması amaçlandı.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Örneklerin Toplanması

4.1.1. Sığırlarda Örnek Toplanması

Çalışmada materyal olarak Temmuz-Eylül 2003 tarihleri arasında Elazığ ilindeki bir mezbahada kesilen toplam 904 sığırdan; 379 safra sıvısı, 325 karaciğer ve 200 bağırsak içeriği örneği toplandı. Bu çalışmada ayrıca Ekim 2003 tarihinde güneydoğuda bir üretim çiftliğindeki sığırlardan 250 adet rektal svap örneği toplandı (Tablo 3).

4.1.2. Koyunlarda Örnek Toplanması

Mart-Nisan 2004 tarihleri arasında Elazığ ilindeki bir mezbahada kesilen 460 koyundan; 250 safra sıvısı ve 210 bağırsak içeriği örneği toplandı. Rektal svap örnekleri ise, Mayıs 2004 tarihinde Elazığ'ın doğusundaki bir yerleşim yerinde üç farklı sürüdeki 150 koyundan toplandı (Tablo 3). Hayvan sahipleri koyunlardan karaciğer toplanmasına izin vermedikleri ve çalışmanın bütçesi bu örneklerin satın alınmasına olanak sağlamadığı için koyunlardan karaciğer örnekleri toplanamadı.

Çalışmada örnek toplanan hayvanların hiçbirinde klinik olarak belirgin bir semptom ya da mezbahada karkas incelemesinde makroskopik olarak herhangi bir lezyon gözlenmedi.

Karaciğer örnekleri steril naylon poşetlerle, safra örnekleri ise steril enjektörler vasıtası ile alındı. Dışkı örnekleri steril svaplar yardımı ile sığır ve koyunlardan rektal yolla alındı. Bağırsak içerikleri kesimden hemen sonra dışarı

çıkarılan ince bağırsaklardan svap yardımı ile alınarak % 0,9 NaCl içeren tüplere transfer edildi. Örnekler toplanırken tüm hijyenik tedbirlere uyuldu ve rutin bakteriyolojik incelemeler için uygun şartlar altında (+4 °C'de) kısa süre içerisinde laboratuvara ulaştırıldı.

Tablo 3. Çalışmada incelenen örnekler ve hayvan türlerine göre dağılımı

Kaynak	Sığır	Koyun	Toplam
Safra	379	250	629
Karaciğer	325	-	325
Bağırsak içeriği	200	210	410
Rektal svap	250	150	400
Toplam	1154	610	1764

4.2. *Campylobacter* İzolasyonu ve İdentifikasyonu

4.2.1. *Campylobacter* İzolasyonu

Karaciğer ve safra örnekleri, %7 at kanı (SR0048, Oxoid) ve Preston *Campylobacter* Selective Supplement (SR117, Oxoid) içeren Preston *Campylobacter* Selective Agar'a bir öze yardımı ile ekimleri yapılarak mikroaerobik koşullarda (mum yöntemi) 42 °C'de 48-72 saat süre ile inkubasyona tabi tutuldu. Bağırsak içeriği ve rektal svap örnekleri ise aseptik şartlar altında %7 at kanı, *Campylobacter* Growth Supplement (SR0048, Oxoid) ve Preston *Campylobacter* Selective Supplement içeren 10 ml *Brucella* Broth'a (Difco, Detroit, MI) transfer edildi ve 42 °C'de mikroaerobik ortamda 48-72 saat

inkubasyona tabi tutularak ön zenginleştirme yapıldı. İnkubasyonu takiben sıvı besi yerinden bir öze dolusu alınarak Preston *Campylobacter* Selective Agar'a inokule edildi ve aynı koşullar altında inkube edildi. Üreme görülen vasatlar, koloni morfolojisi, mikroskopik görünüm (Gram boyama) ve hareketlilik yönünden incelendi. *Campylobacter* spp. yönünden şüpheli görünen 4-5 koloni, Blood Agar Base No: 2 (CM271, Oxoid) besi yerine geçilerek saflaştırıldı ve moleküler aşamalarda kullanılmak üzere %15 glycerol içeren Nutrient Broth (CM0001, Oxoid) besi yerine aktarılarak -20 °C'de muhafaza edildi.

4.2.2. Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Multipleks PCR) ile *C. jejuni* ve *C. coli*'nin İdentifikasyonu

4.2.2.1. DNA Ekstraksiyonu

Campylobacter spp. izolatlarının tür bazında multipleks PCR ile identifikasyonu amacıyla öncelikle şüpheli izolatlardan DNA ekstraksiyonu işlemi gerçekleştirildi. Bu amaçla, şüpheli izolatların Nutrient Broth'da hazırlanan kültürlerinin her birinden Eppendorf tüpler içerisine 300 µl alındı. Her bir süspansiyon eşit miktarda TNES buffer ve Proteinase K (200 µg/ml) ile muamele edildi ve 37 °C'de 2 saat tutularak inaktive edildi. Daha sonra 30 dk kaynatmayı müteakip eşit miktarda fenol (Tris-HCl ile sature edilmiş) süspansiyona ilave edildi. Süspansiyon 5 dk elle çalkalandıktan sonra 11, 600 g'de 10 dk santrifüj edildi. Üst faz, fenollü kısma dokunmaksızın dikkatli bir şekilde alınarak diğer bir Eppendorf tüpüne aktarıldı ve bu basamaktan sonra sodyum asetat ve etanol ile presipitasyon işlemine geçildi. DNA süspansiyonuna 3 M sodyum asetat'tan 0,1 volüm ve % 95'lik etanolden ise 2,5 volüm katılarak -20 °C'de bir gece

bekletildi. Daha sonra süspansiyon 11,600 g'de 10 dk süreyle santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Elde edilen pelet sırasıyla % 90 ve % 70'lik etanol ile, her basamaktan sonra 11,600 g'de 5 dk'lık bir santrifüj işlemi uygulanarak yıkandı. Son olarak elde edilen pelet bir saat süre ile kurumaya bırakıldı ve 50 µl steril distile suda süspansiyon edildi. Bu süspansiyondan 5 µl alınarak PCR'de hedef DNA olarak kullanıldı.

4.2.2.2. Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Multipleks PCR)

Toplam 50µl'lik volümde hazırlanan PCR karışımına; 5 µl 10× PCR buffer, 5 µl 25 mM MgCl₂, deoksिनुकлеотитlerin her birinden 250 µM, 1,25 U *Taq* DNA polymerase enzimi (MBI, Fermentas) ve Misawa ve ark. (2002) tarafından bildirilen *C. jejuni*'nin oksidoredüktaz geni ile *C. coli*'nin aspartokinaz genine spesifik olmak üzere toplam iki çift primerin (Tablo 4) her birinden 1 µM ve 5 µl template DNA ilave edildi (125). PCR reaksiyonları, PCR-Sprint thermalcycler (Thermo Hybaid, İngiltere) cihazında gerçekleştirildi. PCR amplifikasyonunda 94 °C'de 1 dk ön denaturasyon aşamasını takiben, toplam 35 PCR siklusu 94 °C'de 30 sn denaturasyon, 58 °C'de 30 sn hibridizasyon ve 72 °C'de 1 dk sentez olarak gerçekleştirildi. Son siklusu müteakip 72 °C'de 5 dk ekstra sentez işlemi yapıldı. Amplifiye edilen PCR ürünleri % 1,5'luk agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra ethidium bromide (10 mg/ml) ile 30 dk süreyle boyandı ve Ultra Viole (UV) transilluminatörde incelenerek sonuçlar gözlemlendi. Oluşan bantların moleküler ağırlığını saptamak amacıyla 100 bp 'lik DNA ladder (MBI, Fermentas SM 0321) kullanıldı. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi neticesinde oluşan 159 bp moleküler uzunluğundaki bantlar *C. jejuni* ve 502 bp moleküler

uzunluğundaki bantlar *C. coli* göstergesi olarak kabul edildi. Metodun herhangi bir aşamasında meydana gelebilecek muhtemel bir kontaminasyonu tespit etmek amacıyla gerek DNA ekstraksiyonu basamaklarında ve gerekse PCR’de pozitif kontrol olarak *C. jejuni* [NCTC (National Collection of Type Cultures, London, UK) 11322] ve *C. coli* [NCTC 11366] referans suşları ve negatif kontrol olarak distile su kullanıldı.

4.3. *Campylobacter jejuni* ve *C. coli*’nin Moleküler Tiplendirilmesi

4.3.1. Flagellin A (*FlaA*) Geninin PCR Amplifikasyonu

Tür spesifik PCR ile *C. jejuni* ya da *C. coli*’ye ait olduğu belirlenen DNA örneklerinde *flaA* geninin varlığını araştırmak amacıyla Nachamkin ve ark. (1996) tarafından bildirilen ve *flaA* geninin 1700 bp’lik bir kısmını amplifiye eden bir çift spesifik primer (Tablo 4) kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirildi (141). PCR karışımı hazırlandıktan sonra amplifikasyon işlemi; 94 °C’de 1 dk denaturasyon, 45 °C’de 2 dk hibridizasyon ve 72 °C’de 1 dk sentez olmak üzere toplam 35 siklusa gerçekleştirildi. Son siklustan sonra 72 °C’de 5 dk ekstra sentez işlemi uygulandı.

4.3.2. Flagellin A Geninin Restriction Fragment Length Polymorphism Analizi (*FlaA* Tiplendirme)

Elektroforez işlemi müteakip *flaA* geni yönünden pozitif olduğu belirlenen PCR ürünleri restriksiyon işlemine tabi tutuldu. *DdeI* (Promega, Madison) restriksiyon enzimi ile kesimi gerçekleştirmek amacıyla 12,5 µl PCR ürünü için, 0,2 µl restriksiyon enzimi ve 1,5 µl 10x restriksiyon buffer katılarak

hacim steril distile su ile 20 µl'ye tamamlandıktan sonra 37 °C'de 2 saatlik inkubasyon işlemi uygulandı. Restriksiyona maruz bırakılan ürünler % 2'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu. Ethidium bromide ile boyamayı takiben oluşan profiller UV transilluminatörde analiz edildi ve Polaroid GelCam ile fotoğraflandı.

4.3.3. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analizi

Campylobacter jejuni ve *C. coli* izolatlarının RAPD analizinde reaksiyon karışımı; 5 µl DNA, 10x PCR buffer, 3,5 mM MgCl₂, 200 µM deoxynucleoside triphosphates, 1,25 U *Taq* DNA polymerase (MBI, Fermentas) ve 1 µM OPA-11 primer (Tablo 4) içeren toplam 50 µl lik bir hacimde hazırlandı. PCR karışımı; 94 °C'de 1dk ön denaturasyon aşamasını takiben, 94 °C'de 1 dk denaturasyon, 36 °C'de 1 dk hibridizasyon ve 72 °C'de 2 dk sentez olmak üzere toplam 45 siklüs amplifikasyona tabi tutuldu. Son olarak 72 °C'de 5 dk ekstra sentez işlemi uygulandı. Elektroforez işleminden sonra ethidium bromide ile boyamayı müteakip sonuçlar UV transilluminatör altında fotoğraflanarak analiz edildi.

Campylobacter jejuni ve *C. coli* izolatları için uygulanan RFLP ve RAPD reaksiyonları farklı zamanlarda iki kez tekrar edildi ve sonuçlar iki bağımsız araştırmacı tarafından yorumlandı.

4.4. İstatistiksel Analiz

Sağlıklı görünüşteki sığır ve koyunlardan elde edilen *Campylobacter* türlerinin izolasyon oranları arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemliliğini ortaya koymak amacı ile χ^2 testi kullanıldı. P< 0,05 bulunan olasılık değerleri istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

Tablo 4. *Campylobacter jejuni* ve *C. coli* izolatlarının PCR analizinde ve tiplendirilmesinde kullanılan primerler

Primer	Spesifiklik	Gen Bölgesi	Sekans (5'-3')	Literatür
C1	<i>C. jejuni</i> (f)	oksidoredüktaz	CAA ATA AAG TTA GAG GTA GAA TGT	(125)
C4	<i>C. jejuni</i> (r)	oksidoredüktaz	GGA TAA GCA CTA GCT AGC TGA T	(125)
CC18	<i>C. coli</i> (f)	aspartokinaz	GGT ATG ATT TCT ACA AAG CGA G	(125)
CC519	<i>C. coli</i> (r)	aspartokinaz	ATA AAA GAC TAT CGT CGC GTG	(125)
FLA1	Flagellin A (f)	<i>flaA</i>	ATG GGA TTT CGT ATT AAC AC	(141)
FLA2	Flagellin A(r)	<i>flaA</i>	CTG TAG TAA TCT TAA AAC ATT TTG	(141)
OPA11	RAPD	random	CAA TCG CCG T	(80)

f: Forwad primer; r: Reverse primer

4.5. Kùltür ve PCR Aşamalarında Kullanılan Ayıraçlar

4.5.1. İzolasyonda Kullanılan Ayıraçlar

Campylobacter Agar Base (Oxoid, CM0689, Basingstoke, Hampshire)

'Lab-Lemco' powder	10 g
Peptone	10 g
Sodium chloride	5 g
Agar	12 g

Campylobacter Agar besi yerinden 18,5 g tartılarak 475 ml distile su içerisinde eritilip, 121 °C'de 15-20 dk otoklavlandı. Besi yeri 45-50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine 25 ml lize edilmiş at kanı ve 1 vial Preston *Campylobacter* Selective Supplement ilave edildi. Dikkatli bir şekilde karıştırılıp steril petri kutularına 15-20 ml taksim edildi.

Preston *Campylobacter* Selective Supplement (Oxoid, SR0117, Basingstoke, Hampshire)

Polymyxin B	2,500 IU
Rifampicin	5 mg
Trimethoprin	5 mg
Cycloheximide	50 mg

Aseptik şartlarda 1:1 oranında aseton/distile su karışımından 2 ml alınarak Preston *Campylobacter* Selective Supplement içeren vial ilave edildi ve iyice çözünmesi için dikkatli bir şekilde karıştırıldı. Daha önce hazırlanmış 500 ml *Campylobacter* Agar ya da Nutrient Broth'a bir vial ilave edildi.

***Campylobacter* Growth Supplement (Oxoid, SR0084, Basingstoke, Hampshire)**

Sodium pyruvate	0,125 g
Sodium metabisulphite	0,125 g
Ferrous sulphate	0,125 g

Campylobacter Growth Supplement içeren vialer aseptik şartlarda 2 ml steril distile su ilave edilip, dikkatli şekilde karıştırılarak çözdürüldü ve 500 ml Nutrient Broth'a ilave edilerek karıştırıldı.

Laked Horse Blood (Oxoid, SR0048, Basingstoke, Hampshire)

Hazırlanan *Campylobacter* Agar Base ya da Nutrient Broth'a % 7 oranında lize edilmiş at kanı ilave edildi.

Nutrient Broth (Oxoid, CM0001, Basingstoke, Hampshire)

'Lab-Lemco' powder	1 g
Yeast extract	2 g
Peptone	5 g
Sodium chloride	5 g

Nutrient Broth besiyerinden 13 g tartılarak 1 L distile su içerisine ilave edildi ve çözülmesi için iyice karıştırıldı. 121 °C'de 15-20 dk otoklavlanarak steril tüpler içerisine 10'ar ml dağıtıldı.

Blood Agar Base No. 2 (Oxoid, CM0271, Basingstoke, Hampshire)

Proteose pepton	15 g/L
Liver digest	2,5 g/L
Yeast extract	5 g/L
Sodium chloride	5 g/L
Agar	12 g/L

Blood Agar Base No: 2 besi yerinden 40 g tartılarak 1 L distile su içerisinde eritildi ve 121 °C’de 15 dk otoklavlandı. Besi yeri 45-50 °C’ye kadar soğutulduktan sonra içerisine % 7 steril koyun kanı ilave edildi. Dikkatli bir şekilde karıştırılıp steril petri kutularına 15-20 ml taksim edildi.

***Brucella* Broth (Difco, Detroit, Michigan)**

Bacto-Tryptone	10 g
Bacto- Peptamin	10 g
Bacto- Dextrose	1 g
Bacto- Yeast extract	2 g
Sodium chloride	5 g
Sodium bisulfite	0,1 g

Brucella Broth besi yerinden 28 g tartılarak 1 L distile su içinde iyice çözdürüldükten sonra 121 °C’de 15 dk otoklavlandı. Besi yeri 45-50 °C’ye kadar soğutulduktan sonra içerisine % 5 steril at kanı ilave edildi. Dikkatli bir şekilde karıştırılıp steril tüplere 10-15 ml taksim edildi.

4.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) İşleminde Kullanılan Ayıraçlar

4.5.2.1. DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Ayıraçlar

Proteinase K Solüsyonu (100 mg, Sigma, P2308, St. Louis, MO)

Mililitresinde 100 µg olacak şekilde hazırlandı.

TNES buffer tampon solüsyonu

20 mM Tris, pH 8,0

150 mM NaCl

10 mM EDTA

%0,2 SDS

Yukarıdaki maddeler tartılıp ihtiyaç duyulan miktarda hazırlandı ve her örnek için 300 µl kullanıldı.

Phenol equilibrated, stabilized: Chloroform: Isoamyl alcohol 25:24:1

(A0889, Applichem, Darmstadt)

Phenol equilibrated, stabilized 500 ml/L

Chloroform 480 ml/L

Isoamyl alcohol 20 ml/L

pH (20 °C) 7,6-8,0

Bu karışımdan her bir örnek için 600 µl miktarında kullanıldı.

Natriumacetat krist. (Merck, Darmstadt)

DNA'nın presipitasyonu amacı ile süspansiyona 0,1 volüm (3M) miktarında ilave edildi.

Absolute ethanol (Delta)

DNA'nın belirli ekstraksiyon aşamalarında kullanılmak üzere %95, %90 ve %70 oranlarında hazırlandı.

4.5.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Analizinde Kullanılan Ayırmaçlar

10x PCR Buffer (MBI Fermentas)

750 mM Tris-HCl (pH 8,8; 25 °C)

200 mM (NH₄)₂SO₄

% 0,1 Tween 20

Her PCR numunesi için 5 µl kullanıldı.

MgCl₂ (MBI Fermentas)

MgCl₂ (25 mM), her PCR numunesi için 5 µl miktarında kullanıldı.

dNTP Set (100mM; dATP, dCTP, dGTP, dTTP; MBI Fermentas)

Her deoksinükleotitten eşit oranda alındı ve steril distile su ile 1/20 oranında sulandırıldı. Her PCR numunesi için 4 µl kullanıldı.

***Taq* DNA Polymerase Enzimi (500 U; MBI Fermentas)**

Her PCR numunesi için 1,25 U (0,25 µl) kullanıldı.

Primerler (IDT, Coralville)

Çalışmada kullanılan tüm primerler Integrated DNA Technologies (IDT) firmasından temin edildi. Primerler her PCR numunesi için ortalama 25–50 pmol olacak şekilde sulandırıldı.

4.5.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) Analizinde Kullanılan Ayıraçlar

***DdeI* Restriksiyon Enzimi (10U/µl; Promega, Madison)**

Her PCR ürünü için 0,2 µl enzim kullanıldı.

10x Restriksiyon Buffer (*DdeI*; Promega, Madison)

60 mM Tris-HCl (pH 7,9)

1,5 M NaCl

60 mM MgCl₂

10 mM DTT

0,1 mg/ml Acetylated Bovine Serum Albumin (BSA)

Her PCR ürünü için 1,5 µl 10x restriksiyon buffer'ı kullanıldı.

4.5.2.4. Elektroforez İşleminde Kullanılan Ayıraçlar

5x Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) Elektroforez Tampon Solüsyonu

Tris	54,4 g
Borik Asit	27,2 g
EDTA	4,6 g

Yukarıdaki maddeler tartılıp distile su ile 1 L'ye tamamlandı ve pH 8,3'e ayarlandı. Elektroforez solüsyonu olarak 1/5 oranında sulandırılarak kullanıldı.

Agarose LE, (Promega, Madison)

PCR ürünlerinin gözlenmesi için hazırlanan agaroz jeli 1x TBE ile % 1,5 oranında hazırlandı.

100 bp DNA Ladder (50µg/100µl; MBI Fermentas)

DNA Ladder 1/6 oranında sulandırıldı ve agaroz jel kuyucuğuna 5 µl yüklendi.

6x Loading Dye (Yükleme Boyası) Solüsyonu (1 ml; MBI Fermentas)

Yükleme boyası 1/5 oranında sulandırıldı ve her 20 µl PCR ürünü için 5 µl kullanıldı.

Ethidium Bromide (10 mg/ml; AppliChem GmbH, Darmstadt)

Ethidium bromide solüsyonundan 0,5 ml alınarak distile su ile 15 ml'ye tamamlandı. Agaroz jelin boyanması için 300 ml distile suya 600 µl ethidium bromide katılarak kullanıldı.

5. BULGULAR

5.1. *Campylobacter* İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

5.1.1. Sığırlarda *Campylobacter* İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Sağlıklı görünüşteki sığırlardan toplanan 1154 örneğin % 26,1'i (301/1154) uygulanan konvansiyonel kültür metotları neticesinde *Campylobacter* spp. yönünden pozitif olarak saptandı. *Campylobacter* spp.'nin en yüksek izolasyon oranı % 44 (110/250) ile rektal svap örneklerinden, en düşük izolasyon oranı ise % 6,5 (21/325) ile karaciğer örneklerinden elde edildi. Sığır örneklerinden elde edilen *Campylobacter* spp. izolasyon oranları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulundu ($P < 0,001$) (Tablo 5).

Tablo 5. Konvansiyonel kültür yöntemi ile sağlıklı görünüşlü sığırlardan elde edilen *Campylobacter* spp. izolatlarının örnek türüne göre dağılımı

Örnek Türü	Örnek Sayısı	İzolasyon Sayısı	%*
Safra	379	135	35,6
Karaciğer	325	21	6,5
Bağırsak içeriği	200	35	17,5
Rektal svap	250	110	44,0
Toplam	1154	301	26,1

* $P < 0,001$

5.1.2. Koyunlarda *Campylobacter* İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Konvansiyonel kültür metotları kullanılarak incelenen toplam 610 adet sağlıklı görünüşteki koyun örneğinin % 49,5'inden (302/610) *Campylobacter* spp. izolasyonu ve identifikasyonu yapıldı. *Campylobacter* spp.'nin en yüksek izolasyon oranı % 63,8 (134/210) ile bağırsak içeriği örneklerinden elde edilirken, safra ve rektal svap örneklerinden ise daha düşük izolasyon oranı (% 42) saptandı. Koyun örneklerinden elde edilen *Campylobacter* spp. izolasyon oranları arasındaki farklılıklar da istatistiksel olarak önemli bulundu ($P < 0,001$) (Tablo 6).

Tablo 6. Konvansiyonel kültür yöntemi ile sağlıklı görünüşlü koyunlardan elde edilen *Campylobacter* spp. izolatlarının örnek türüne göre dağılımı

Örnek Türü	Örnek Sayısı	İzolasyon Sayısı	%*
Safra	250	105	42,0
Bağırsak içeriği	210	134	63,8
Rektal svap	150	63	42,0
Toplam	610	302	49,5

* $P < 0,001$

5.2. Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Multipleks PCR) ile *C. jejuni* ve *C. coli* İdentifikasyon Bulguları

5.2.1. Sığırlarda Multipleks PCR ile *C. jejuni* ve *C. coli*'nin İdentifikasyon Bulguları

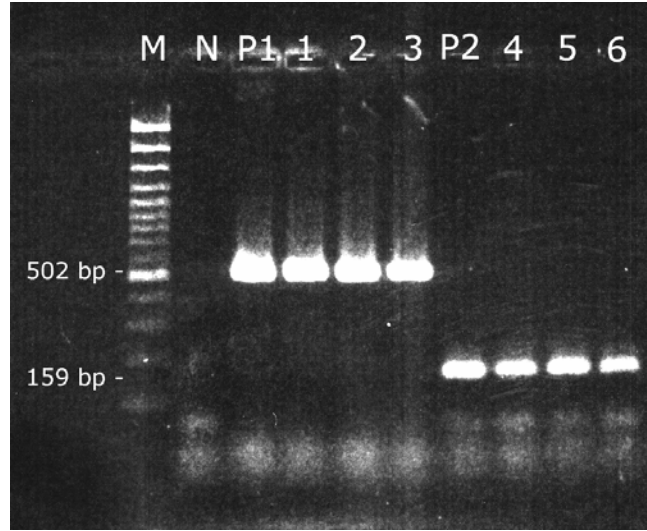
Sığırlarda *Campylobacter* spp. olarak identifiye edilen izolatlardan elde edilen DNA'ların *C. jejuni* ve *C. coli* türlerine spesifik iki çift primer ile multipleks PCR amplifikasyonuna tabi tutulmaları neticesinde % 59,5'inde (179/301) *C. jejuni*'ye spesifik 159 bp uzunluğunda bantlar ve %10'unda (30/301) *C. coli*'ye spesifik 502 bp uzunluğunda bantlar elde edildi (Tablo 7) (Şekil 2a). Örneklerin tamamı dikkate alındığında *C. jejuni* ve *C. coli* izolasyon ve identifikasyon oranları sırasıyla % 15,5 (179/1154) ve % 2,6 (30/1154) olarak hesaplandı ($P<0,001$). *Campylobacter jejuni*'nin en yüksek identifikasyon oranı % 85,2 (115/135) ile safra sıvısından elde edildi ve bunu % 50 (55/110) ile rektal svap örnekleri takip etti. *Campylobacter coli* ise % 21,8 (24/110) ile en yüksek oranda rektal svap örneklerinden elde edildi. Çalışmada incelenen 325 karaciğer örneğinden elde edilen *Campylobacter* spp. izolatlarının multipleks PCR analizi neticesinde *C. jejuni* ya da *C. coli* yönünden pozitif sonuç elde edilemedi. Sığırların bağırsak içeriği örneklerinden elde edilen *C. jejuni* ve *C. coli* izolasyon oranları arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunurken ($P>0,05$), safra ve rektal svap örneklerinden elde edilen *C. jejuni* ve *C. coli* izolasyon oranları arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulundu ($P< 0,001$) (Tablo 7).

Tablo 7. Sağlıklı görünümlü sığırlardan elde edilen *Campylobacter* izolatlarının multipleks PCR bulguları

Örnek	Kültür pozitif örnek sayısı	Multipleks PCR pozitif örnek sayısı (%)		
		<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter spp.</i>
Safra *	135	115 (85,2)	1 (0,7)	19 (14,1)
Bağırsak içeriği**	35	9 (25,7)	5 (14,3)	21 (60)
Karaciğer	21	0	0	21 (100)
Rektal svap *	110	55 (50)	24 (21,8)	31 (28,2)
Toplam	301	179 (59,5)	30 (10)	92 (30,5)

* P < 0,001

** P > 0,05



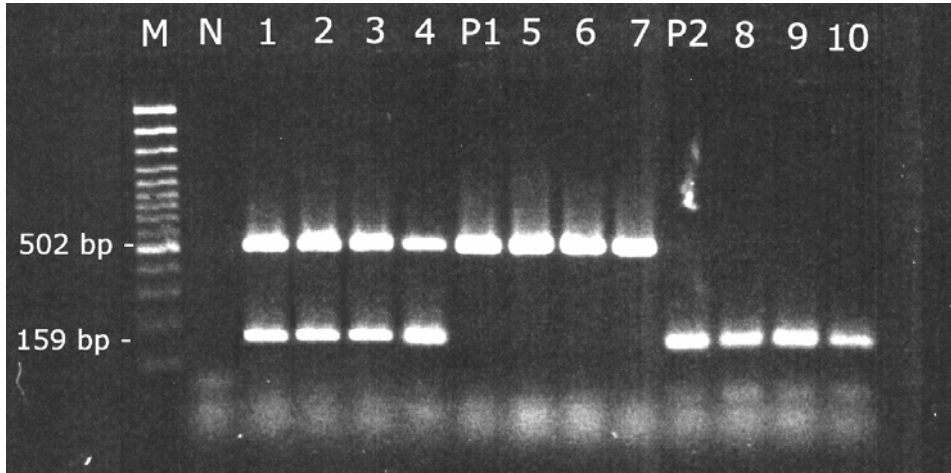
Şekil 2a. Sığırlarda *Campylobacter* spp. olarak tanımlanan kültürlerden elde edilen DNA'ların *C. jejuni* ve *C. coli* tür spesifik primerler kullanılarak yapılan multipleks PCR analizi sonucu oluşan ürünlerin etidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü.

M: DNA Ladder (100 bp), N: Negatif kontrol, P1: *C. coli* pozitif kontrol, 1-3: *C. coli* pozitif örnekler, P2: *C. jejuni* pozitif kontrol, 4-6: *C. jejuni* pozitif örnekler.

5.2.2. Koyunlarda Multipleks PCR ile *C. jejuni* ve *C. coli*'nin İdentifikasyon Bulguları

Koyunlarda *Campylobacter* spp. olarak tanımlanan izolatlardan elde edilen DNA'ların *C. jejuni* ve *C. coli* türlerine spesifik iki çift primer ile multipleks PCR amplifikasyonuna tabi tutulmaları neticesinde % 34,1'inde (103/302) *C. jejuni*'ye spesifik 159 bp uzunluğunda bantlar ve % 33,1'inde (100/302) *C. coli*'ye spesifik 502 bp uzunluğunda bantlar elde edildi (Tablo 8) (Şekil 2b). Örneklerin tamamı dikkate alındığında *C. jejuni* ve *C. coli* izolasyon ve tanımlama oranları sırasıyla % 16,9 (103/610) ve % 16,4 (100/610) olarak hesaplandı. *Campylobacter jejuni*'nin en yüksek tanımlama oranı % 40 (42/105) ile safra sıvısından elde edildi ve bunu % 39,5 (53/134) ile bağırsak

içeriği örnekleri takip etti. *Campylobacter coli* ise % 54 (34/63) ile en yüksek oranda rektal svap örneklerinden tanımlanmış ve bunu % 29,5 (31/105) oranla safra sıvısı örnekleri takip etti. Bağırsak içeriğinden elde edilen *Campylobacter* spp. izolatlarının multipleks PCR analizi neticesinde % 11,9’unda hem *C. jejuni* hem de *C. coli* tanımlanmış. *Campylobacter jejuni* bağırsak içeriği örneklerinde önemli oranda yüksek bulunurken ($P<0,05$), *C. coli* rektal svap örneklerinde daha yüksek oranda izole edildi ($P<0,001$). Safra sıvısı örneklerinden elde edilen *C. jejuni* ve *C. coli*’lerin izolasyon oranları arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz bulundu. ($P>0,05$) (Tablo 8).



Şekil 2b. Koyunlarda *Campylobacter* spp. olarak tanımlanmış kültürlerden elde edilen DNA’ların *C. jejuni* ve *C. coli* tür spesifik primerler kullanılarak yapılan multipleks PCR analizi sonucu oluşan ürünlerin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü.

M: DNA Ladder (100 bp), N: negatif kontrol, 1-4: *C. jejuni* ve *C. coli* pozitif örnekler, P1: *C. coli* pozitif kontrol, 5-7: *C. coli* pozitif örnekler, P2: *C. jejuni* pozitif kontrol, 8-10: *C. jejuni* pozitif örnekler.

Tablo 8. Sağlıklı görünümlü koyunlardan elde edilen *Campylobacter* izolatlarının multipleks PCR bulguları

Örnek	Kültür pozitif örnek sayısı	Multipleks PCR pozitif örnek sayısı (%)			
		<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>C. jejuni</i> ve <i>C. coli</i>
Safra *	105	42 (40)	31 (29,5)	32 (30,5)	
Bağırsak içeriği**	134	53 (39,5)	35 (26,1)	30 (22,4)	16 (11,9)
Rektal svap ***	63	8 (12,7)	34 (54)	21 (33,3)	-
Toplam	302	103 (34,1)	100 (33,1)	83 (27,5)	16 (5,3)

* P > 0,05

** P < 0,05

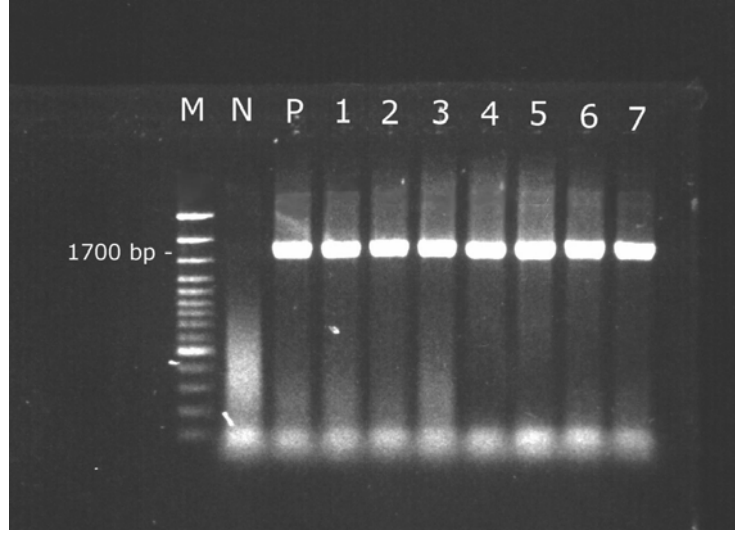
*** P < 0,001

5.3. Flagellin A (*FlaA*) Tiplendirme Bulguları

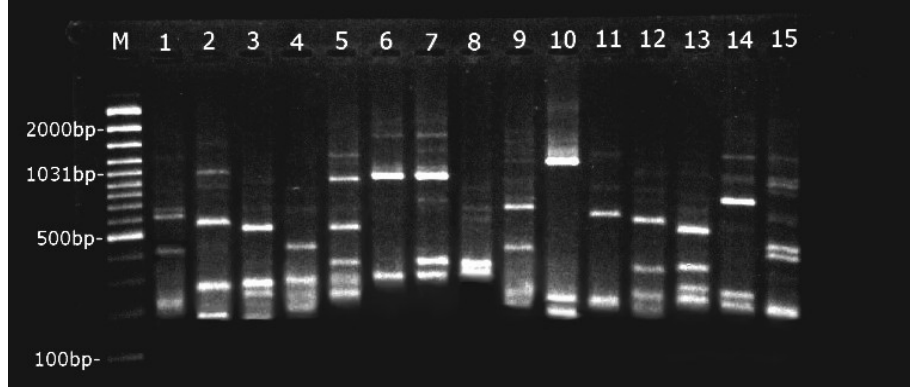
5.3.1. Sığırlarda *FlaA* Tiplendirme Bulguları

5.3.1.1. Sığırlardan İzole Edilen *C. jejuni*'lerin *FlaA* Tiplendirme Bulguları

Tür spesifik PCR ile *C. jejuni* olarak identifiye edilen 115 safra sıvısı, 55 rektal svap ve dokuz bağırsak içeriğinden elde edilen toplam 179 izolatin *flaA* genine spesifik primerler ile PCR amplifikasyonuna tabi tutulması neticesinde tüm izolatlarda 1700 bp uzunluğunda bantlar oluştu (Şekil 3). *FlaA* geni yönünden pozitif PCR ürünlerinin *DdeI* restriksiyon enzimi ile yapılan RFLP analizi neticesinde toplam 23 farklı profil elde edildi. Safra sıvısı örneklerinden elde edilen *C. jejuni* izolatlarından 15 farklı profil belirlendi ve en yaygın görülen iki profil sırasıyla izolatların % 37 ve % 34'ünde gözlemlendi (Şekil 4a) (Tablo 9). Rektal svap örneklerinden elde edilen *C. jejuni* izolatlarından ise sekiz farklı profil saptandı ve en sık gözlenen iki profil izolatların % 58 ve % 15'inde gözlemlendi (Şekil 4b) (Tablo 9). Diğer profiller izolatların % 7'sinden daha düşük bir oran ile temsil edildi. Bağırsak içeriği izolatlarından elde edilen iki profil ise safra sıvısında gözlenen profillerle benzerlik gösterdi. Buna karşılık rektal svap ve safra izolatlarından elde edilen profiller arasında farklılık saptandı.

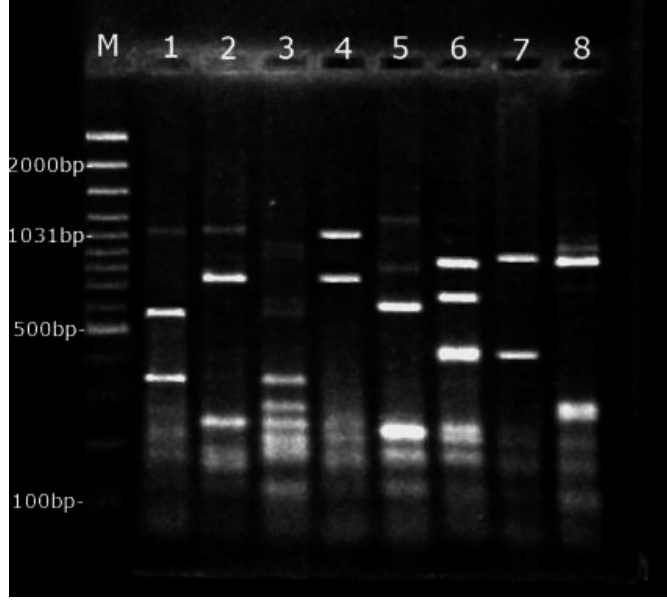


Şekil 3. *Campylobacter jejuni* ve *C. coli* türlerinin *flaA* genine spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR analizi sonucu oluşan ürünlerin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü. M: DNA Ladder (100 bp) N: Negatif Kontrol, P: Pozitif Kontrol, 1-7: *FlaA* geni pozitif örnekler.



Şekil 4a. Sığırların safra örneklerinden elde edilen *C. jejuni* izolatlarındaki *flaA* geninin *DdeI* ile muamele edilmiş PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü.

M: DNA Ladder (100 bp), 1-15: *FlaA* geninin farklı restriksiyon profilleri. Kuyucuk no (Profil no); 1 (XV), 2 (XIV), 3 (XIII), 4 (XII), 5 (XI), 6 (X), 7 (IX), 8 (VIII), 9 (VII), 10 (VI), 11 (V), 12 (IV), 13 (III), 14 (II), 15 (I). 15 ve 11 no'lu kuyucuklar en yaygın profilleri (I ve V) temsil etmektedir.



Şekil 4b. Sığırların rektal svap örneklerinden elde edilen *C. jejuni* izolatlarındaki *flaA* geninin *DdeI* ile muamele edilmiş PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü.

M: DNA Ladder (100 bp), 1-8: *FlaA* geninin farklı restriksiyon profilleri. Kuyucuk no (Profil no); 1 (XXIII), 2 (XXII), 3 (XXI), 4 (XX), 5 (XIX), 6 (XVIII), 7 (XVII), 8 (XVI). 8 ve 6 no'lu kuyucuklar en yaygın profilleri (XVI ve XVIII) temsil etmektedir.

Tablo 9. Sığırlardan elde edilen *C. jejuni* izolatlarının *flaA* tiplendirme bulguları (n: 179)

Profil No	İzolat sayısı (%)	Kaynak
I	42 (36,5)	Safra
II	4 (3,5)	Safra
III	8 (7,0)	Safra
	4 (45,5)	Bağırsak içeriği
IV	4 (3,5)	Safra
V	39 (33,9)	Safra
	5 (55,5)	Bağırsak içeriği
VI-IX**	8 (1,7)	Safra
X	5 (4,3)	Safra
XI-XV*	5 (0,9)	Safra
XVI	32 (58,1)	Rektal svap
XVII	7 (12,7)	Rektal svap
XVIII	8 (14,5)	Rektal svap
XIX-XXI *	3 (1,8)	Rektal svap
XXII	3 (5,5)	Rektal svap
XXIII	2 (3,6)	Rektal svap

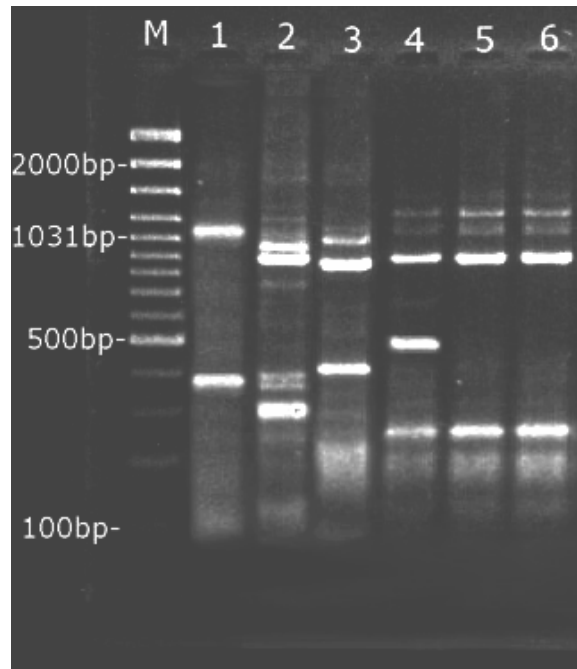
* Profillerin her biri sadece bir izolatta gözlemlendi.

** Profillerin her biri ikişer izolatta gözlemlendi.

5.3.1.2. Sığırlardan İzole Edilen *C. coli*'lerin *FlaA* Tiplendirme Bulguları

Tür spesifik PCR ile *C. coli* olarak tanımlanan 24 rektal svap, beş bağırsak içeriği ve bir safra sıvısından elde edilen toplam 30 *C. coli* izolatının *flaA* genine spesifik primerler ile PCR amplifikasyonuna tabi tutulması neticesinde tüm izolatlar 1700 bp uzunluğunda bantlar oluşturdu (Şekil 3). *FlaA* geni yönünden pozitif PCR ürünlerinin *DdeI* restriksiyon enzimi ile yapılan RFLP analizi neticesinde toplam beş farklı restriksiyon profili gözlemlendi. Bu profillerin

üçü rektal svap, ikisi bağırsak içeriğinden ve bir tanesi safradan elde edildi (Şekil 5). En yaygın görünen profiller bağırsak içeriği izolatlarının % 80'inde ve rektal svap izolatlarının % 42'sinde gözlemlendi (Tablo 10). Safrada gözlenen profil, bağırsak içeriğinde gözlenen profillerden birisi ile benzerlik gösterdi. Rektal svap örneklerinden elde edilen profiller, bağırsak içeriği ve safradan elde edilen profillerden tamamen farklılık gösterdi (Şekil 5).



Şekil 5. Sığırların safra, bağırsak içeriği ve rektal svap örneklerinden elde edilen *C. coli* izolatlarındaki *flaA* geninin *DdeI* ile muamele edilmiş PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü.

M: DNA Ladder (100 bp), 1-3: Rektal svap örneklerinden elde edilen restriksiyon profilleri. Kuyucuk no (Profil no); 1 (III), 2 (IV), 3 (V). 1 no'lu kuyucuk en yaygın profili (III) temsil etmektedir. 4-5: Bağırsak içeriğinden elde edilen restriksiyon profilleri; 4 (I), 5 (II). 4 no'lu kuyucuk en yaygın profili (I) temsil etmektedir. 6: Safradan elde edilen restriksiyon profili (II).

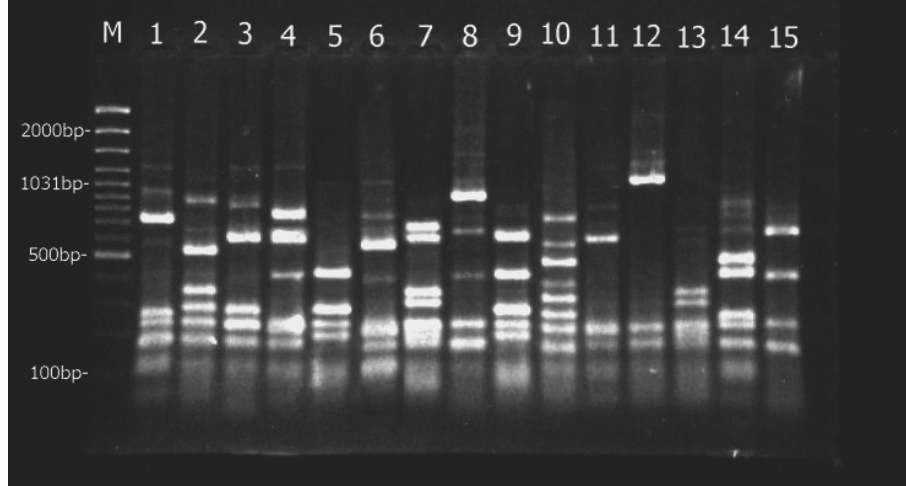
Tablo 10. Sığırlardan elde edilen *C. coli* izolatlarının *flaA* tiplendirme bulguları (n:30)

Profil No	İzolat sayısı (%)	Kaynak
I	4 (80)	Bağırsak içeriği
II	1 (20)	Bağırsak içeriği
	1 (100)	Safra
III	10 (41,7)	Rektal svap
IV	5 (20,8)	Rektal svap
V	9 (37,5)	Rektal svap

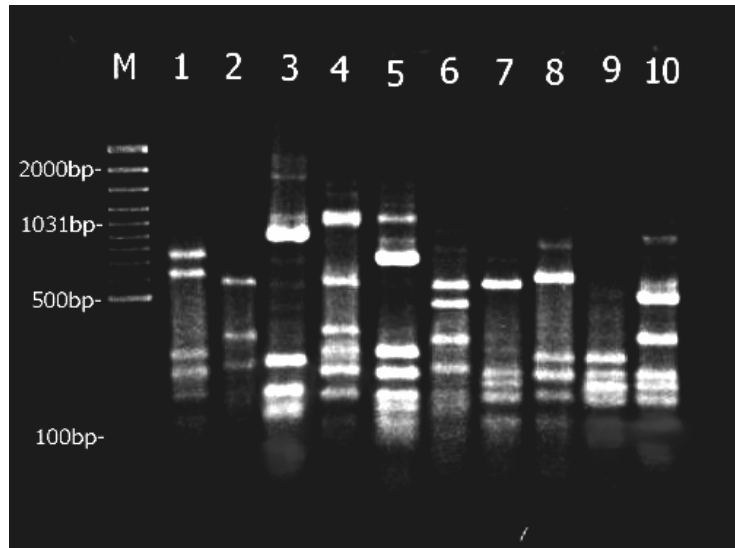
5.3.2. Koyunlarda *FlaA* Tiplendirme Bulguları

5.3.2.1. Koyunlardan İzole Edilen *C. jejuni*'lerin *FlaA* Tiplendirme Bulguları

Tür spesifik PCR ile *C. jejuni* olarak tanımlanan 53 bağırsak içeriği, 42 safra sıvısı ve sekiz rektal svap örneğinden elde edilen toplam 103 *C. jejuni* izolatının *flaA* genine spesifik primerler ile PCR amplifikasyonu tabii tutulması neticesinde tüm izolatlar 1700 bp uzunluğunda bantlar oluşturdu (Şekil 3). *FlaA* geni yönünden pozitif PCR ürünlerinin *DdeI* restriksiyon enzimi ile yapılan RFLP analizi neticesinde toplam 26 farklı restriksiyon profili elde edildi. Safra sıvısı örneklerinden elde edilen *C. jejuni* izolatlarından 15 farklı profil belirlendi ve en yaygın profil izolatların % 21,4'ünde gözlemlendi (Şekil 6a). Bağırsak içeriği örneklerinden elde edilen *C. jejuni* izolatlarından ise 10 farklı profil saptandı ve en yaygın profil izolatların % 45,3'ünde gözlemlendi (Şekil 6b). Rektal svap izolatından elde edilen profilin (XXVI), bağırsak içeriği ve safradan elde edilen profillerden tamamen farklı olduğu saptandı (Şekil 7) (Tablo 11).



Şekil 6a. Koyunların safra örneklerinden elde edilen *C. jejuni* izolatlarındaki *flaA* geninin *DdeI* ile muamele edilmiş PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü. M: DNA Ladder (100 bp), 1-15: *FlaA* geninin farklı restriksiyon profilleri. Kuyucuk no (Profil no); 1 (I), 2 (II), 3 (III), 4 (IV), 5 (V), 6 (VI), 7 (VII), 8, (VIII), 9 (IX), 10 (X), 11 (XI), 12 (XII), 13 (XIII), 14 (XIV), 15 (XV). 1 no'lu kuyucuk en yaygın profili (I) temsil etmektedir.



Şekil 6b. Koyunların bağırsak içeriği örneklerinden elde edilen *C. jejuni* izolatlarındaki *flaA* geninin *DdeI* ile muamele edilmiş PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü. M: DNA Ladder (100 bp), 1-10: *FlaA* geninin farklı restriksiyon profilleri. Kuyucuk no (Profil no); 1 (XVI), 2 (XVII), 3 (XVIII), 4 (XIX), 5 (XX), 6 (XXI), 7 (XXII), 8 (XXIII), 9 (XXIV), 10 (XXV). 1 no'lu kuyucuk en yaygın profili (XVI) temsil etmektedir.

Tablo 11. Koyunlardan elde edilen *C. jejuni* izolatlarının *flaA* tiplendirme bulguları (n:103)

Profil No	İzolat sayısı (%)	Kaynak
I	9 (21,4)	Safra
II	5 (11,9)	Safra
III	5 (11,9)	Safra
IV	5 (11,9)	Safra
V-VI***	6 (7,1)	Safra
VII-IX**	6 (4,8)	Safra
X-XV*	6 (2,4)	Safra
XVI	24 (45,3)	Bağırsak içeriği
XVII	8 (15,1)	Bağırsak içeriği
XVIII	7 (13,2)	Bağırsak içeriği
XIX-XX***	6 (5,7)	Bağırsak içeriği
XXI-XXIII**	6 (3,8)	Bağırsak içeriği
XXIV-XV*	2 (1,9)	Bağırsak içeriği
XXVI	8 (100)	Rektal svap

* Profillerin her biri sadece bir izolatta gözlemlendi.

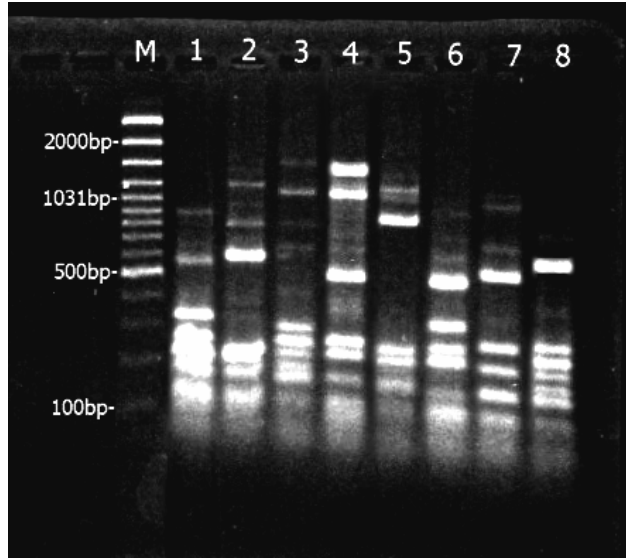
** Profillerin her biri ikişer izolatta gözlemlendi.

*** Profillerin her biri üçer izolatta gözlemlendi.

5.3.2.2. Koyunlardan İzole Edilen *C. coli*'lerin *FlaA* Tiplendirme Bulguları

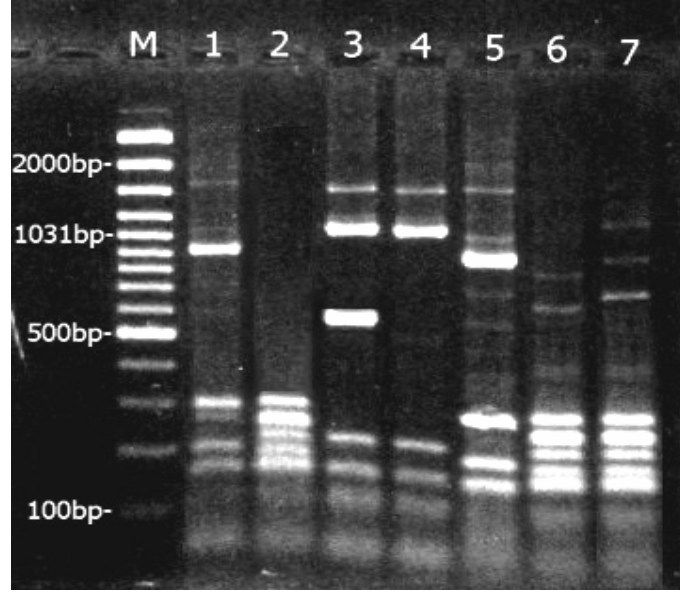
Tür spesifik PCR ile *C. coli* olarak tanımlanmış 35 bağırsak içeriği, 34 rektal svap ve 31 safradan elde edilen toplam 100 izolatın *flaA* genine spesifik primerler ile PCR amplifikasyonuna tabi tutulması neticesinde tüm izolatlar 1700

bp uzunluğunda bantlar oluşturdu (Şekil 3). *FlaA* geni yönünden pozitif PCR ürünlerinin *DdeI* restriksiyon enzimi ile yapılan RFLP analizi neticesinde toplam 22 farklı restriksiyon profili elde edildi. Rektal svap örneklerinden elde edilen *C. coli* izolatlarından yedi farklı profil belirlendi ve en yaygın profil izolatların % 41,2'sinde gözlemlendi (Şekil 7). Safra sıvısı örneklerinden elde edilen *C. coli* izolatlarından da yedi farklı profil saptandı ve en yaygın profil izolatların % 45,2'sinde gözlemlendi (Şekil 8). Bağırsak içeriği örneklerinden elde edilen *C. coli* izolatlarından ise sekiz farklı profil belirlendi ve en yaygın profil izolatların % 34,3'ünde gözlemlendi (Şekil 9) (Tablo 12).

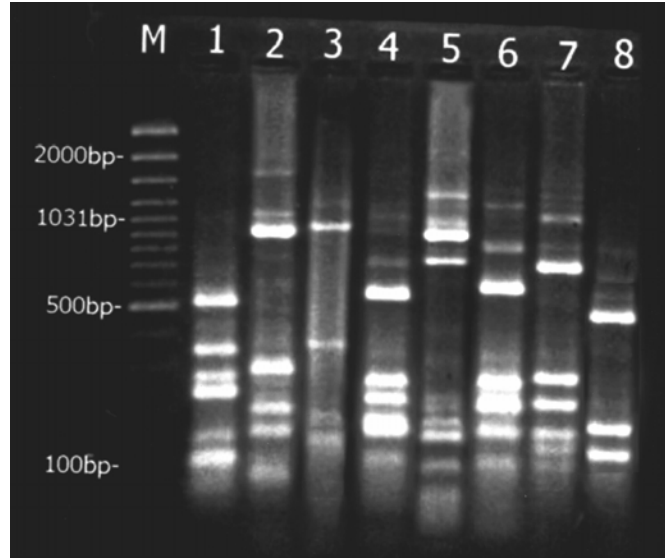


Şekil 7. Koyunların rektal svap örneklerinden elde edilen *C. jejuni* ve *C. coli* izolatlarındaki *flaA* geninin *DdeI* ile muamele edilmiş PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü.

M: DNA Ladder (100 bp), 1-7: *C. coli* *flaA* geninin farklı restriksiyon profilleri. Kuyucuk no (Profil no); 1 (XVI), 2 (XVII), 3 (XVIII), 4 (XIX), 5 (XX), 6 (XXI), 7 (XXII). 1 no'lu kuyucuk en yaygın profili (XVI) temsil etmektedir. 8: *C. jejuni* *flaA* geninin restriksiyon profili (XXVI).



Şekil 8. Koyunların safra örneklerinden elde edilen *C. coli* izolatlarındaki *flaA* geninin *DdeI* ile muamele edilmiş PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü. M: DNA Ladder (100 bp), 1-7: *FlaA* geninin farklı restriksiyon profilleri. Kuyucuk no (Profil no); 1 (I), 2 (II), 3 (III), 4 (IV), 5 (V), 6 (VI), 7 (VII). 1 no'lu kuyucuk en yaygın profili (I) temsil etmektedir.



Şekil 9. Koyunların bağırsak içeriği örneklerinden izole edilen *C. coli* izolatlarındaki *flaA* geninin *DdeI* ile muamele edilmiş PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü. M: DNA Ladder (100 bp), 1-8: *FlaA* geninin farklı restriksiyon profilleri. Kuyucuk no (Profil no); 1 (VIII), 2 (IX), 3 (X), 4 (XI), 5 (XII), 6 (XIII), 7 (XIV), 8 (XV). 1 no'lu kuyucuk en yaygın profili (VIII) temsil etmektedir.

Tablo 12. Koyunlardan elde edilen *C. coli* izolatlarının *flaA* tiplendirme bulguları (n: 100)

Profil No	İzolot sayısı (%)	Kaynak
I	14 (45,2)	Safra
II	6 (19,4)	Safra
III	5 (16,1)	Safra
IV-V**	4 (6,5)	Safra
VI-VII*	2 (3,2)	Safra
VIII	12 (34,3)	Bağırsak içeriği
IX	6 (17,1)	Bağırsak içeriği
X	5 (14,3)	Bağırsak içeriği
XI	4 (11,4)	Bağırsak içeriği
XII	4 (11,4)	Bağırsak içeriği
XIII	2 (5,7)	Bağırsak içeriği
XIV-XV*	2 (2,9)	Bağırsak içeriği
XVI	14 (41,2)	Rektal svap
XVII	7 (20,6)	Rektal svap
XVIII	5 (14,7)	Rektal svap
XIX-XX***	6 (8,8)	Rektal svap
XXI-XXII*	2 (2,9)	Rektal svap

* Profillerin her biri sadece bir izolatta gözlemlendi.

** Profillerin her biri ikişer izolatta gözlemlendi.

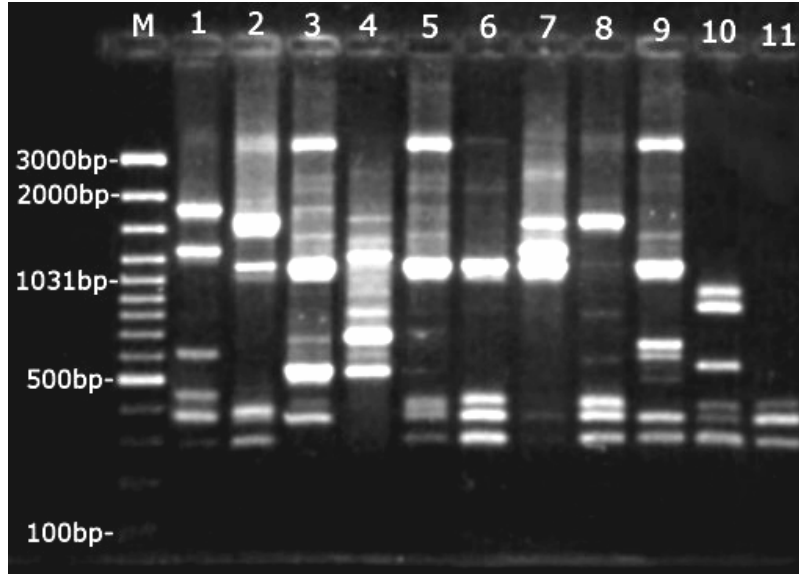
*** Profillerin her biri üçer izolatta gözlemlendi.

5.4. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Bulguları

5.4.1. Sığırlarda RAPD Bulguları

5.4.1.1. Sığırlardan İzole Edilen *C. jejuni*'lerin RAPD Bulguları

Sığır safra örneklerinden elde edilen 115 *C. jejuni* izolatının RAPD analizi neticesinde toplam 37 farklı profil gözlemlendi (Şekil 10). En yaygın gözlenen iki profil izolatların % 30,4 ve % 15,7'sinde saptandı. Geriye kalan profiller izolatların % 6'sından daha düşük bir oranı ile temsil edildi (Tablo 13). İki kez yapılan denemeye rağmen bağırsak içeriği ve rektal svap örneklerinden izole edilen *C. jejuni* izolatlarının RAPD ile tiplendirilmesinde oluşan profiller sağlıklı bir şekilde yorumlanamadı.



Şekil 10. Sığırların safra örneklerinden elde edilen *C. jejuni*'lerin RAPD ile tiplendirilmesi neticesinde gözlenen en yaygın profiller.

M: DNA Ladder (100 bp), 1-11: Farklı RAPD profilleri. Kuyucuk no (Profil no); 1 (XI), 2 (X), 3 (IX), 4 (VIII), 5 (III), 6 (IV), 7 (V), 8 (VI), 9 (VII), 10 (II), 11 (I). 5-6 no'lu kuyucuklar en yaygın profilleri (III ve IV) temsil etmektedir.

Tablo 13. Sığırlardan elde edilen *C. jejuni* izolatlarının RAPD bulguları (n:179)

Profil No	İzolat sayısı (%)	Kaynak
I	6 (5,2)	Safra
II	6 (5,2)	Safra
III	18 (15,7)	Safra
IV	35 (30,4)	Safra
V	6 (5,2)	Safra
VI	4 (3,5)	Safra
VII-VIII**	4 (1,7)	Safra
IX	4 (3,5)	Safra
X-XI***	6 (2,6)	Safra
XII-XXXVII*	26 (0,9)	Safra
a	9	Bağırsak içeriği
a	55	Rektal svap

* Profillerin her biri sadece bir izolatta gözlemlendi.

** Profillerin her biri ikişer izolatta gözlemlendi.

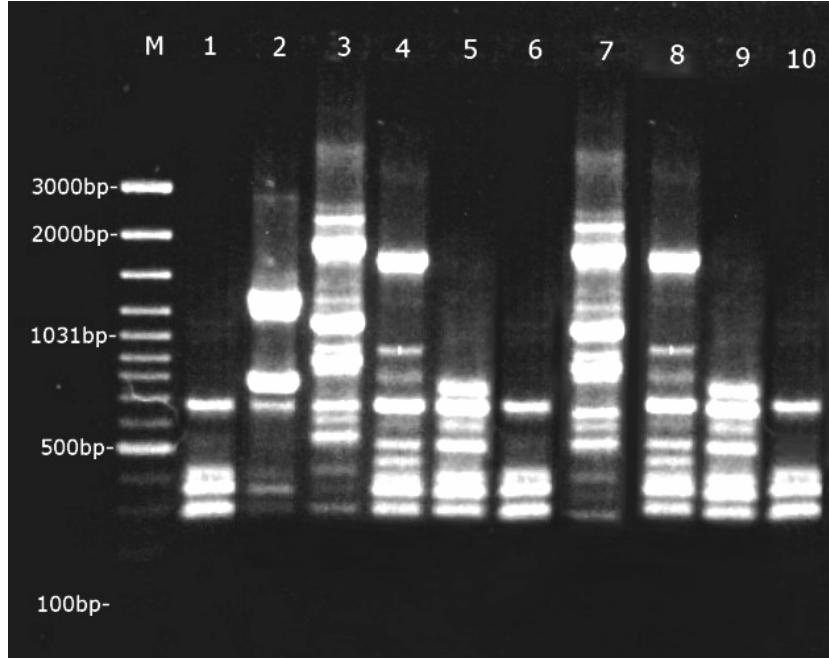
*** Profillerin her biri üçer izolatta gözlemlendi.

a : Tiplendirilemedi.

5.4.1.2. Sığırlardan İzole Edilen *C. coli*'lerin RAPD Bulguları

Sığırlardan elde edilen 30 *C. coli* izolatının RAPD analizi neticesinde toplam beş farklı profil gözlemlendi (Şekil 11). Bağırsak içeriği ve rektal svap izolatlarında gözlenen en yaygın profiller, sırasıyla izolatların % 40 ve % 33,3'ünde saptandı. Sığır orijinli *C. coli* izolatlarının RAPD profilleri arasında benzerlikler gözlemlendi. Elde edilen beş profilin hepsi rektal svap örneklerinden

elde edildi. Bağırsak içeriği izolatlarından elde edilen dört profil ve safradan elde edilen bir profil rektal svap izolatlarının RAPD profilleri ile benzerlik gösterdi (Tablo 14).



Şekil 11. Sığırların rektal svap, bağırsak içeriği ve safra sıvısı örneklerinden elde edilen *C. coli*'lerin RAPD yöntemi ile tiplendirilmesi neticesinde elde edilen profiller.

M: DNA Ladder (100 bp), 1-5: Rektal svap izolatlarında gözlenen RAPD profilleri. Kuyucuk no (Profil no); 1 (I), 2 (II), 3 (III), 4 (IV), 5 (V). 4 no'lu kuyucuk en yaygın profili (IV) temsil etmektedir. 6-9: Bağırsak içeriği izolatlarında gözlenen RAPD profilleri; 6 (I), 7 (III), 8 (IV), 9 (V). 8 no'lu kuyucuk en yaygın profili (IV) temsil etmektedir. 10: Safra izolatlarında gözlenen RAPD profili (I).

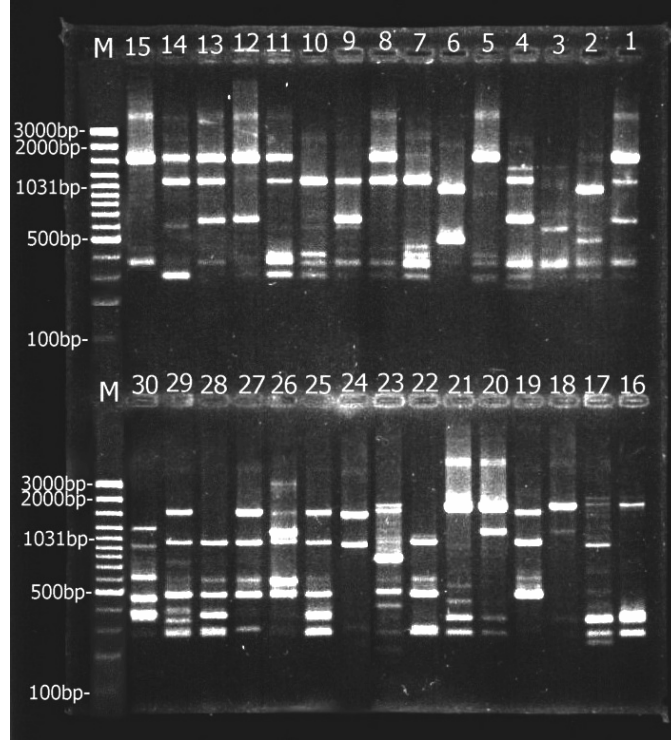
Tablo 14. Sığırlardan elde edilen *C. coli* izolatlarının RAPD bulguları (n:30)

Profil No	İzolat sayısı (%)	Kaynak
I	1 (100)	Safra
	1 (20)	Bağırsak içeriği
	2 (8,3)	Rektal svap
II	6 (25)	Rektal svap
III	1 (20)	Bağırsak içeriği
	4 (16,7)	Rektal svap
IV	2 (40)	Bağırsak içeriği
	8 (33,3)	Rektal svap
V	1 (20)	Bağırsak içeriği
	4 (16,7)	Rektal svap

5.4.2. Koyunlarda RAPD Bulguları

5.4.2.1. Koyunlardan İzole Edilen *C. jejuni*'lerin RAPD Bulguları

Koyunlardan elde edilen 103 *C. jejuni* izolatının RAPD analizi neticesinde toplam 21 farklı profil gözlemlendi. Bu profillerin; dokuzu safra, 10'u bağırsak içeriği ve ikisi rektal svap örneklerinde saptandı (Şekil 12). En yaygın gözlenen profiller; rektal svap izolatlarının % 62,5'inde, safra izolatlarının % 26,2'sinde ve bağırsak içeriği izolatlarının % 18,9'unda bulundu (Tablo 15).



Şekil 12. Koyunların bağırsak içeriği, safra ve rektal svap örneklerinden elde edilen *C. jejuni* ve *C. coli* izolatlarının RAPD yöntemi ile tiplendirilmesi neticesinde elde edilen profiller.

M: DNA Ladder (100 bp), 1-10: Bağırsak içeriğinden izole edilen *C. jejuni*'lerin RAPD profilleri. Kuyucuk no (Profil no); 1 (X), 2 (XI), 3 (XII), 4 (XIII), 5 (XIV), 6 (XV), 7 (XVI), 8 (XVII), 9 (XVIII), 10 (XIX). 9 ve 10 no'lu kuyucuklar en yaygın profilleri (XVIII ve XIX) temsil etmektedir. 11-19: Safradan elde edilen *C. jejuni*'lerin RAPD profilleri; 11 (I), 12 (II), 13 (III), 14 (IV), 15 (V), 16 (VI), 17 (VII), 18 (VIII), 19 (IX). 11 no'lu kuyucuk: en yaygın profili (I) temsil etmektedir. 20-21: rektal svaptan elde edilen *C. jejuni*'lerin RAPD profili; 20 (XX), 21 (XXI). 20 no'lu kuyucuk en yaygın profili (XX) temsil etmektedir. 22-30: Rektal svaptan elde edilen *C. coli*'lerin RAPD profilleri; 22 (XVI), 23 (XVII), 24 (XVIII), 25 (XIX), 26 (XX), 27 (XXI), 28 (XXII), 29 (XXIII), 30 (XXIV). 27 no'lu kuyucuk en yaygın profili (XXI) temsil etmektedir.

Tablo 15. Koyunlardan elde edilen *C. jejuni* izolatlarının RAPD bulguları (n:103)

Profil No	İzolot sayısı (%)	Kaynak
I	11 (26,2)	Safra
II	6 (14,3)	Safra
III-IV*	2 (2,4)	Safra
V	6 (14,3)	Safra
VI-VII***	6 (7,1)	Safra
VIII	9 (21,4)	Safra
IX	2 (4,8)	Safra
X	6 (11,3)	Bağırsak içeriği
XI-XII***	6 (5,7)	Bağırsak içeriği
XIII	4 (7,5)	Bağırsak içeriği
XIV- XV**	4 (3,8)	Bağırsak içeriği
XVI	5 (9,4)	Bağırsak içeriği
XVII	8 (15,1)	Bağırsak içeriği
XVIII	10 (18,9)	Bağırsak içeriği
XIX	10 (18,9)	Bağırsak içeriği
XX	5 (62,5)	Rektal svap
XXI	3 (37,5)	Rektal svap

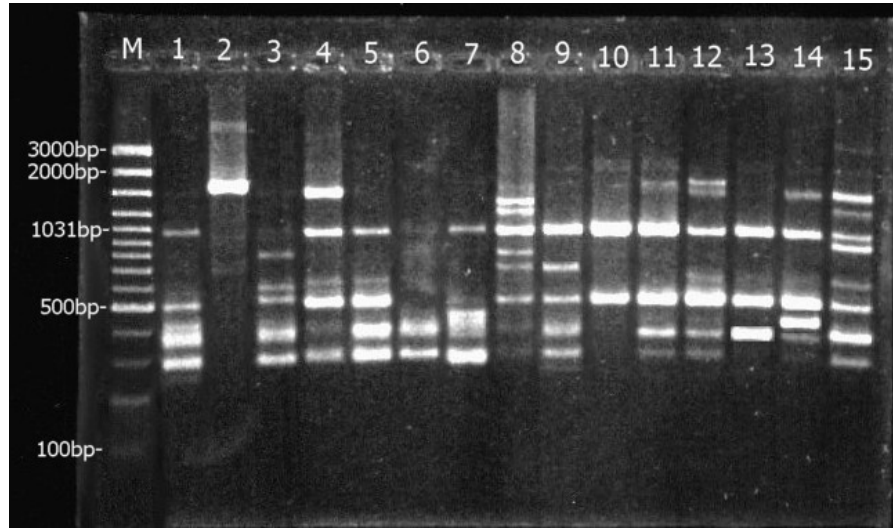
* Profillerin her biri sadece bir izolatta gözlemlendi.

** Profillerin her biri ikişer izolatta gözlemlendi.

*** Profillerin her biri üçer izolatta gözlemlendi.

5.4.2.2. Koyunlardan İzole Edilen *C. coli*'lerin RAPD bulguları

Koyunlardan elde edilen 100 *C. coli* izolatının RAPD analizi neticesinde toplam 24 farklı profil gözlemlendi. Bu profillerin dokuzu rektal svaptan (Şekil 12), sekizi bağırsak içeriği (Şekil 13) ve yedisi safradan (Şekil 13) elde edildi. En yaygın gözlenen profiller, safra izolatlarının % 48,4'ünde, rektal svap örneklerinin % 35,3'ünde ve bağırsak içeriği izolatlarının % 34,3'ünde bulundu. Geriye kalan profiller daha düşük oranlar ile temsil edildi (Tablo 16).



Şekil 13. Koyunların bağırsak içeriği ve safra sıvısı örneklerinden elde edilen *C. coli* izolatlarının RAPD yöntemi ile tiplendirilmesi neticesinde elde edilen profiller.

M: DNA Ladder (100 bp), 1-8: Bağırsak içeriğinden izole edilen *C. coli*'lerin RAPD profilleri. Kuyucuk no (Profil no); 1 (VIII), 2 (IX), 3 (X), 4 (XI), 5 (XII), 6 (XIII), 7 (XIV), 8 (XV). 2 no'lu kuyucuk en yaygın profili (IX) temsil etmektedir. 9-15: Safradan elde edilen *C. coli*'lerin RAPD profilleri; 9 (I), 10 (II), 11 (III), 12 (IV), 13 (V), 14 (VI), 15 (VII). 10 no'lu kuyucuk en yaygın profili (II) temsil etmektedir.

Tablo 16. Koyunlardan elde edilen *C. coli* izolatlarının RAPD bulguları (n:100)

Profil No	İzolat Sayısı (%)	Kaynak
I	8 (25,8)	Safra
II	15 (48,4)	Safra
III-V**	6 (6,5)	Safra
VI-VII*	2 (3,2)	Safra
VIII	8 (22,9)	Bağırsak içeriği
IX	12 (34,3)	Bağırsak içeriği
X-XII***	9 (8,6)	Bağırsak içeriği
XIII-XV**	6 (5,7)	Bağırsak içeriği
XVI-XVIII**	6 (5,9)	Rektal svap
XIX	10 (29,4)	Rektal svap
XX	3 (8,8)	Rektal svap
XXI	12 (35,3)	Rektal svap
XXII-XXIV*	3 (2,9)	Rektal svap

* Profillerin her biri sadece bir izolatta gözlemlendi.

** Profillerin her biri ikişer izolatta gözlemlendi.

*** Profillerin her biri üçer izolatta gözlemlendi.

6. TARTIŞMA

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de *Campylobacter* türlerinin meydana getirdiği hastalıklar hayvan yetiştiriciliği ve halk sağlığı açısından önemli bir sorun teşkil etmektedir. Bu etkenlerin insan ve hayvanlarda oluşturduğu hastalıkların teşhis ve tedavisinde harcanan paralar ülke ekonomisine büyük zararlar vermektedir. Amerika'da yılda yaklaşık 2,1 milyon olan *Campylobacter* vakalarının teşhis ve tedavisinde 700-1400 milyon dolar harcanması bu maddi zararın boyutunu ortaya koyan çok açık bir örnektir (120). *Campylobacter*lere karşı etkin koruyucu önlemlerin alınması ve eradikasyon planlarının kısa sürede hazırlanması için bu infeksiyonun epidemiyolojisinin kapsamlı bir biçimde ortaya konması gerekir.

Bu çalışmada, insanlarda akut bakteriyel gastroenteritisin en yaygın etkenleri olarak bilinen *C. jejuni* ve *C. coli*'nin, klinik olarak sağlıklı sığır ve koyunların rektal svap ve iç organlarından izolasyonu, multipleks PCR ile identifikasyonu ve moleküler tiplendirilmesi amaçlandı. Bunun için öncelikle konvansiyonel kültür metotları kullanılarak *Campylobacter* spp.'lerin izolasyonu ve identifikasyon işlemleri gerçekleştirildi. Bu işlemler neticesinde Elazığ ilindeki bir mezbahada ve güneydoğuda bir üretim çiftliğindeki sığırlardan toplanan 1154 örneğin %26,1'inde *Campylobacter* spp. izole edildi. En yüksek izolasyon % 44 ile sahada toplanan rektal svap örneklerinden elde edilirken, en düşük izolasyon % 6,5 ile mezbahada kesilen hayvanların karaciğer örneklerinde tespit edildi. Dünyada ve ülkemizde yapılan çalışmalar neticesinde sığırlarda *Campylobacter* spp. izolasyon oranının % 1 ile % 90 arasında değişiklik gösterdiği bildirilmiştir

(45, 137, 176, 192). Bu farklılıkta; yaş, mevsim, incelenen hayvan sayısı, izolasyon metodu, kullanılan selektif besi yerlerinin türü, hijyen ve coğrafik koşullar gibi birçok faktör önemli rol oynamaktadır (190). Ono ve Yamamoto'nun (1999) sığır dışkı örneklerinde yaptıkları bir araştırmada holştayn ineklerde % 44 ve yerel Japon ineklerde % 63 oranında *Campylobacter* spp. izole etmeleri, bu etkenlerin izolasyon oranları üzerinde incelenen sığırların cinsinin bile önemli rol oynayabileceğini ileri sürmektedir (152). Bu çalışmada sığır rektal svap örneklerinden elde edilen *Campylobacter* spp. izolasyon oranı, Minihan ve ark.'nın (2004) benzer bir metodoloji kullanılarak inceledikleri 600 sığır rektal svap örneğinden elde ettikleri % 54'den daha düşük bulunurken (124), Sato ve ark.'nın (2004) daha fazla sığır rektal svap örneği (n=1191) inceleyerek elde ettikleri % 28'den (179) daha yüksek bulundu. Sato ve ark.'nın (2004) daha düşük oranda *Campylobacter* spp. izole etmesinde, izolasyon amacı ile direkt ekim yöntemi kullanılmasının rol oynadığı düşünülmektedir. Araştırmacılar dışı, bağırsak içeriği ve çevresel örneklerden *Campylobacter* spp. izolasyon oranını artırmak ve kontaminasyon olasılığını minimuma indirmek amacı ile zenginleştirme metoduna sıklıkla başvurmuşlardır (29, 136). Garcia ve ark. (1985), sığırların bağırsak içeriği örneklerinde yaptıkları bir araştırmada, direkt ekim yöntemi ile *Campylobacter* spp. izole edemezlerken, zenginleştirme metodu ile % 52 oranında izolasyon yaptıklarını rapor etmişlerdir (68). Bu tez çalışmasında rektal svap ve bağırsak içeriğinden *Campylobacter* spp. izolasyonu amacıyla zenginleştirme metodu uygulanmasına rağmen, safra ve karaciğer örneklerinden izolasyon için direkt ekim tekniği kullanıldı. Sığır safra örneklerinde; Garcia ve ark. (1985) zenginleştirme metodu kullanarak % 15

oranında *Campylobacter* spp. izole ederken (68), direkt ekim ile bu çalışmada % 35 ve aynı bölgede Muz ve ark. (1992) ise % 47 oranında *Campylobacter* spp. izole ettiklerini bildirmişlerdir (137). Bu sonuçlar, safradan *Campylobacter* spp. izolasyonu amacıyla sadece direkt ekim yönteminin yeterli olabileceği kanısını doğrulamaktadır. Moore (2001) da karaciğerde yaptığı bir araştırmada, direkt ekim yöntemi ile elde ettiği izolasyon oranının zenginleştirme yöntemi ile elde edilenden daha yüksek olduğunu rapor etmiştir (127). Dolayısıyla bu çalışmada karaciğer örneklerinde izolasyon oranının düşük olması, direkt ekim yönteminin kullanılmasından ziyade izolasyon amacı ile kullanılan selektif besi yerlerinin yetersizliği ile açıklanabilir. Moore ve Madden (1998), karaciğerden termofilik *Campylobacter* spp. izolasyonu için Skirrow ve Blaser-Wang besi yerinin kombine olarak kullanılmasının en etkili izolasyon metodu olduğu bildirmişlerdir (129).

Klinik olarak sağlıklı görünüşteki koyunlardan toplanan 610 örnekten ise % 49,5 oranında *Campylobacter* spp. izole ve identifiye edildi. Koyunlarda en yüksek izolasyon % 63,8 ile mezbahada kesilen hayvanların bağırsak içeriğinden elde edildi. Bu oranın, *Campylobacter* spp. izolasyonu için benzer metodoloji kullanan Stanley ve ark.'nın (1998) bildirdikleri % 92'den daha düşük (191), Zweifel ve ark.'nın (2004) Skirrow besi yeri kullanarak ulaştıkları %18'den (221) ise daha yüksek olduğu gözlemlendi. Çalışmada rektal svap ve safra örneklerinden elde edilen *Campylobacter* spp. izolasyon oranı (% 42) bağırsak içeriği örneklerine kıyasla daha düşük bulundu. Rektal svaptan elde edilen *Campylobacter* spp. izolasyon oranının daha düşük bulunması, Stanley ve ark.'nın (1998) koyunlarda yaptığı bir çalışma ile de ortaya konmuştur (191). Yapılan

araştırmalarda kesim amacı ile mezbahaya nakledilen hayvanlardaki *Campylobacter* spp. oranının, stres gibi faktörlerden dolayı nakilden öncekine göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Wesley ve ark. (2005), hindilerde yaptıkları bir araştırmada, kesimhaneye nakilden önce *Campylobacter* spp. prevalansının % 65, nakilden sonra % 90 olduğunu bildirmişlerdir (213). *Campylobacter* spp. izolasyon oranının, sahada toplanan örneklerin laboratuvara taşınıp işlenmesi esnasında geçen süreden de etkilendiği bildirilmiştir. Ladron de Guevara ve ark. (1989), insan dışkı örneklerinde yaptıkları bir araştırmada, 4 °C'lik bir ortamda 24 saat süreyle saklanan örneklerde *Campylobacter* spp. izolasyon oranının % 16 oranında azaldığını rapor etmişlerdir (105). Bu çalışmada, koyun rektal svap örneklerinin sahadan toplanıp laboratuvara taşınması esnasında yaklaşık 10-12 saatlik bir süre geçmesinin daha düşük oranda *Campylobacter* spp. izole edilmesinde etkisi olabilir. Koyun bağırsak içeriği örneklerinden rektal svap örneklerine göre daha yüksek oranda *Campylobacter* spp. izolasyonu, bu etkenlerin hayvanlara bulaşmasında sadece dışkı ile bulaşık gıdaların rolünün olmadığını, bunun yanı sıra hayvanların çevreden horizontal yolla da bu etkenleri alabileceği kanısını doğurmaktadır. Ayrıca çevrenin *Campylobacter* ile kontamine olmasında dışkı ile birlikte mezbahada kesilen hayvan akıntılarının yüzey sularına bulaşmasının da önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada koyunlardaki *Campylobacter* izolasyon oranının sığırlardakinden yaklaşık iki kat daha yüksek olduğu tespit edildi. Bu sonuç, ülkemizde önceki yıllarda yapılan çalışmalarda da gözlenmiştir. Diker (1985), incelediği 150 adet sığır ve koyun safra örneğinde sırasıyla % 35 ve % 57

oranında *Campylobacter* spp. izole etmiştir (44). Bu çalışmada, sığır ve koyun örneklerinde izolasyon amacı ile aynı metodoloji uygulanmasına rağmen meydana gelen bu farklılıkta mevsimin de önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Koyun örneklerinin *Campylobacter* spp. izolasyonunun pik yaptığı ilkbahar aylarında (191) toplanması, buna karşılık sığır örneklerinin ise izolasyonun daha düşük olduğu yaz aylarında (89) toplanması bu görüşü desteklemektedir. Ayrıca hayvanların yetiştirme şekli ve koşullarının etkisi söz konusu olabilir. Şöyle ki; mezbahada kesilen hayvanların orijinleri hakkında bilgi mevcut olmamakla birlikte ülkemizde özellikle de Doğu Anadolu'da koyunların sürüler halinde ve bir arada tutulması, sığırların ise birkaç hayvandan ibaret küçük aile işletmelerinde yetiştirilmesi bu oranların elde edilmesinde etkili olabilir.

Konvansiyonel kültür metotları ile *Campylobacter* spp. olarak tespit edilen izolatların tür spesifik primerlerle yapılan multipleks PCR analizi neticesinde, sığır orijinli izolatların % 59,5'i *C. jejuni* ve % 10'u *C. coli* olarak tanımlanmıştır. *Campylobacter jejuni*'nin *C. coli*'den daha yaygın olarak saptanması birçok çalışmada rapor edilmiştir (17, 29, 77). Bae ve ark. (2005), inceledikleri 686 sığır rektal svap örneğinden % 34 oranında *C. jejuni* izole ederken, % 8 oranında *C. coli* izolasyonu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar besi sığırlarında *C. coli*'nin daha düşük, süt ineklerinde ise daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir (17). Bu çalışmada, örnek toplanması aşamasında herhangi bir kayıt tutulmamakla birlikte, örneklerin mezbahada kesim amacı ile getirilen besi ya da laktasyonda olmayan hayvanlardan toplanmasının *C. coli*'nin daha düşük oranda tespit edilmesine katkı sağladığı düşünülmektedir. Çalışmada multipleks PCR ile *C. jejuni* ve *C. coli* olarak tanımlanamayan izolatlar *Campylobacter* spp. olarak

kabul edildi. Bununla birlikte, 42 °C’de düşük oranda üremelerine rağmen *Arcobacter* spp. gibi *Campylobacter* benzeri bakteriler de olasılıklar arasında değerlendirilmelidir. Sığırların dışkı ve iç organlarında diğer *Campylobacter* türlerinin (*C. lanienae*, *C. hyointestinalis*, *C. lari*, *C. sputorum*, *C. fetus* ssp. *fetus* vb.) varlığını bildiren çalışmalar mevcuttur. Hatta bazı çalışmalarda *C. lanienae*’nın sığır dışkısında *C. jejuni*’den daha yaygın olarak saptandığı dikkatten kaçmamaktadır (90, 91). Örneğin; Inglis ve ark. (2004), sığır dışkı örneklerinde yaptıkları bir araştırmada % 56 oranında *C. lanienae* izole ederken, *C. jejuni* izolasyon oranını % 13 olarak bildirmişlerdir (90). Ancak ülkemizde sığırlarda *C. jejuni* ve *C. coli* dışındaki *Campylobacter* türlerinin varlığını ortaya koymaya yönelik çalışmalar bulunmadığı için bu konu hakkında spekülasyon yapma olasılığı bulunmamaktadır. Gelecek yıllarda *C. lanienae* ve diğer türlerin varlığını ortaya koymaya yönelik yapılacak araştırmalar campylobacterlerin epidemiyolojisinin daha iyi anlaşılması bakımından önem taşımaktadır.

Campylobacter jejuni ve *C. coli* rektal svap, bağırsak içeriği ve safra örneklerinde yüksek oranda tespit edilmesine rağmen sığır karaciğer örneklerinden izole edilemedi. *Campylobacter* türleri sağlıklı sığırların bağırsaklarında ve safrada kommensal olarak bulduklarından dolayı bu örneklerde campylobacterlerin yüksek oranda izole edilmesi sürpriz değildir. Kanatlıların vücut sıcaklıkları termofilik campylobacterlerin üremesine uygun olduğundan dolayı bu hayvanların karaciğer örneklerinde yüksek izolasyon oranları elde edilmiştir (27, 61). Yine yapılan çalışmalarda, koyun ve domuz gibi diğer hayvanların karaciğer örneklerinde *C. jejuni* ve *C. coli*’nin varlığı ortaya konmuş (38, 129) olmakla beraber klinik olarak sağlıklı sığır karaciğerinde bu

etkenlerin izolasyonu hakkında yeterli bilgi mevcut değildir. Kramer ve ark. (2000), perakende satılan sığır karaciğer örneklerinde yaptıkları bir araştırmada yüksek oranda *Campylobacter* spp. izole etmişlerdir (104). Bu durum karaciğerlerin işlenmesi ya da taşınması sırasında insan ve kullanılan ekipmanlar aracı ile oluşan kontaminasyondan kaynaklanabilir.

Koyunlarda, konvansiyonel kültür metotları ile *Campylobacter* spp. olarak tespit edilen izolatların tür spesifik primerlerle yapılan multipleks PCR analizi neticesinde % 34'ü *C. jejuni* ve % 33'ü *C. coli* olarak tanımlanmıştır. Bu oranlar, aynı bölgede Ertaş ve ark.'nın (2003) az sayıda koyun safra örneği ve aynı besi yeri ve metodoloji kullanarak elde ettikleri oranlarla (% 34 *C. jejuni* ve % 32 *C. coli*) paralellik göstermektedir (58). Bununla birlikte, ülkemizin farklı bölgelerinde koyunlarda yapılan çalışmalarda *C. jejuni* % 15- % 41, *C. coli* ise % 7- % 9 arasında değişen oranlarda izole edilmiştir (44, 45, 137). Yapılan araştırmalar, izolasyon amacı ile kullanılan Preston *Campylobacter* Selektif Agarın *C. coli* türünü, *C. jejuni*'ye kıyasla daha yüksek oranda tespit ettiğini göstermiştir (129). Bu çalışmada *C. coli*'nin ülkemizdeki diğer çalışmalardan daha yüksek oranda saptanmasında, birçok faktörün yanı sıra izolasyon amacıyla Preston *Campylobacter* Selektif Agarın kullanılmasının da rolü olduğu düşünülmektedir. Ayrıca koyunlarda *C. jejuni* ve *C. coli* izolasyon oranları benzerlik göstermesine rağmen örnek türü düzeyinde incelendiğinde; *C. jejuni*'nin mezbahe örneklerinde, *C. coli*'nin ise sahadaki örneklerde daha yüksek oranda bulunduğu ve bu farklılığın istatistiksel olarak önemli olduğu gözlemlendi. Robinson (1982), süt amacıyla yetiştirilen hayvanlarda *C. jejuni*'nin dışkı ile sürekli olarak çevreye atılmadığını bildirmiştir (173). Buna karşılık *C. coli*'nin dışkı ile çevreyi

sürekli olarak kontamine ettiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (7, 43). Bu çalışmada, saha örneklerinde *C. coli*'nin daha yüksek oranda bulunmasında bu faktörün rolü söz konusu olabilir. Ayrıca yapılan çalışmalarda çevresel su kaynaklarında *C. coli*'nin *C. jejuni*'ye göre daha yüksek oranda tespit edilmesi de (29), *C. coli*'nin daha yüksek oranda çevreyi kontamine ettiği fikrini desteklemektedir. Koyunların bağırsak içeriği izolatlarının yaklaşık %5'inde multipleks PCR ile hem *C. jejuni* ve hem de *C. coli*'nin identifiye edilmesi, söz konusu örneklerden saf izolasyon yapılamadığını düşündürmektedir.

Koyun karaciğerlerinin insan *Campylobacter* infeksiyonlarının muhtemel kaynakları olabileceği bildirilmiştir. Cornelius ve ark.'nın (2005) inceledikleri 272 karaciğer örneğinde yüksek oranda (% 66) *Campylobacter* izole etmeleri (38) bu görüşü desteklemektedir. Bu çalışmada, sığırların yanı sıra koyun karaciğer örneklerinde *Campylobacter* izolasyonunun yapılması planlandı. Ancak hayvan sahipleri koyunlardan karaciğer toplanmasına izin vermedikleri ve çalışmanın bütçesi bu örneklerin satın alınmasına olanak sağlamadığı için koyunlardan karaciğer örnekleri toplanmadı.

Bu çalışmadaki konvansiyonel kültür ve multipleks PCR verileri insanlarda akut bakteriyel gastroenteritisin en yaygın sebebi olan *Campylobacter* türlerinin tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de sığır ve koyunlarda yüksek seviyede seyrettiğini göstermektedir. *Campylobacter jejuni*'nin çevreyi ve karkasları kontaminasyonda hem sığır hem de koyunlar önemli rol oynarken, *C. coli*'nin çevreyi kontaminasyonunda ise koyunların rolünün sığırlara göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. Sonuç olarak, sağlıklı sığır ve koyunların termofilik campylobacterlerin major çevresel rezervuarları oldukları ve gıda zincirini ve

çevreyi kontamine etmede önemli role sahip oldukları kanaatine varıldı. Ancak bu hayvanların insan *Campylobacter* infeksiyonlarındaki rollerinin tam olarak anlaşılması için aynı bölgedeki insan ve çevresel örnekleri de kapsayan geniş ölçekli bir epidemiyolojik araştırmaya gereksinim olduğu düşünülmektedir.

Türkiye’de sığır ve koyun orijinli *Campylobacter* türlerinde ne oranda bir genetik polimorfizm olduğunu ya da bu etkenlerin kaç suşunun infeksiyonda dominant olduğunu ortaya koymaya yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Bu yönde yapılacak bir araştırma *Campylobacter* infeksiyonlarına karşı kontrol stratejileri geliştirerek gerekli koruyucu önlemlerin alınması ve dolayısıyla infeksiyonun popülasyondan eradike edilmesi açısından önem arz etmektedir. Çalışmada tür spesifik PCR sonucunda *C. jejuni* ve *C. coli* olarak tanımlanan izolatlar arasındaki genetik polimorfizm, diğer metotlarla karşılaştırıldığında birçok avantaja sahip olan *fla* tiplendirme ve RAPD metotları kullanılarak araştırıldı.

Campylobacter türlerinin PCR-RFLP analizi için en sık tercih edilen gen bölgesi flagelladır. *Campylobacter* spp.’deki *flaA* geni önemli bir sekans heterojenitesi gösterir ve dolayısıyla moleküler analizler için iyi bir epidemiyolojik marker olarak kullanılır. Ancak son yıllarda *fla* tiplendirme ve diğer moleküler yöntemlerin, genetik instabilitenin varlığından dolayı *Campylobacter* türlerinin tiplendirilmesinde yetersiz olabileceği ortaya konmuştur (211). Son yıllardaki çalışmalarda *Campylobacter* türlerinin flagella gen bölgesinde rekombinasyonların varlığı kanıtlanmıştır (209). Multilocus sequence typing (MLST) tekniği kullanılarak yapılan araştırmalarda diğer genetik bölgelerde de rekombinasyon ve mutasyonlardan dolayı genetik instabilitenin varlığı rapor

edilmiştir (47). Bu sebeple yapılacak en pratik çözüm birden fazla metot kullanılarak tiplendirme yapmaktır. *Fla* tiplendirme, diğer metotlara göre daha az emek sarf edilmesi, yapılışının kolay olması ve çok daha ucuz olması nedeni ile sıklıkla kullanılmıştır. Çalışmada sığırların safra, bağırsak içeriği ve rektal svap örneklerinden elde edilen *C. jejuni* ve *C. coli* izolatları *flaA* tiplendirme metodu ile başarılı bir şekilde tiplendirildi ve toplam 28 *flaA* profili elde edildi. Sığır orijinli *Campylobacter* türlerinin *flaA* tiplendirilmesi amacı ile farklı restriksiyon enzimleri kullanılarak yapılan önceki çalışmalarda dokuz ile 35 arasında *flaA* profili tespit edildiği bildirilmiştir (65, 112). *Campylobacter* türlerinden elde edilen *flaA* profil sayısındaki farklılıkta; kullanılan primerler, laboratuvar koşulları ve izolatların coğrafik dağılımının etkisinin olduğu rapor edilmiştir (16, 141). Bu çalışmada bağırsak içeriği ve safradan elde edilen *flaA* profillerinin rektal svap örneklerinden elde edilen profillerden tamamen farklı olduğu tespit edildi. Profiller arasındaki bu farklılıkta örneklerin farklı coğrafik bölgede toplanmasının rolü olduğu düşünülmektedir. Bazı *flaA* profilleri yüksek oranda tespit edilirken, bazıları da sadece birer izolatta gözlemlendi. Örneğin; sığırların rektal svap örneklerinden elde edilen *C. jejuni* izolatlarında en yaygın olarak bulunan profil % 58’lik bir oranla temsil edildi.

Koyun örneklerinden izole edilen *C. jejuni* ve *C. coli*’lerin *flaA* tiplendirilmesi neticesinde toplam 48 farklı profil elde edildi. Koyun orijinli *Campylobacter* izolatları arasındaki genetik heterojenitenin araştırılmasına yönelik çalışmalar oldukça sınırlıdır. Fitzgerald ve ark. (2001) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, *fla* tiplendirme yöntemi ile 71 koyun izolatından 14 farklı profil elde edilmiştir (65). Yine koyun abortlarından elde edilen 25 *C. jejuni*

izolatının PFGE analizinde, 10 farklı profil elde edildiği ve predominant profillerin izolatların % 66'sında gözlemlendiği bildirilmiştir (114). Bu tez çalışmasında da elde edilen *flaA* profillerinin bir kısmının bu çalışmaya paralel olarak diğer profillerle kıyaslandığında daha dominant olduğu gözlemlendi. Örneğin; koyunların bağırsak içeriği örneklerinden elde edilen *C. jejuni* ve safra örneklerinden elde edilen *C. coli* izolatlarında en yaygın olarak bulunan profiller % 45'lik bir oranla temsil edildi.

Çalışmada sığırlardan elde edilen *flaA* profilleri koyunlardakinden tamamen farklılık gösterdi. Ayrıca *flaA* tiplendirme neticesinde koyun orijinli termofilik *Campylobacter* izolatları arasındaki genetik heterojenitenin sığır izolatları ile kıyaslandığında daha yüksek olduğu tespit edildi. Örneğin; sığır orijinli *C. coli* izolatlarının *flaA* tiplendirmesi neticesinde 5 farklı restriksiyon profili elde edilirken, koyun orijinli izolatlarda 22 farklı profil saptandı. Bu farklılığın, incelenen sığır orijinli *C. coli* izolatlarının, koyunlara göre daha az sayıda olmasından da kaynaklanabileceği düşünülmektedir. *FlaA* tiplendirme neticesinde hem sığır hem de koyun izolatlarından elde edilen profillerden bazılarının diğer profillere kıyasla daha yüksek oranda bulunduğu saptandı. Bu bulguların ışığında, koyun ve sığırlarda campylobacterlere karşı koruyucu amaçla aşı çalışmaları yapılmadan önce, saha çalışması yaparak etkenler arasındaki genetik heterojenitenin araştırılması ve predominant izolatların mutlaka göz önünde bulundurulmasının uzun vadede başarılı sonuç elde etmek için büyük önem taşıdığı düşünülmektedir.

Campylobacter türlerinin tiplendirilmesinde başvurulan diğer bir metot, çeşitli primer ve reaksiyon koşulları kullanılarak uygulanan RAPD tekniğidir. Bu

metot, bakteriyel genomun tamamındaki polimorfizmi araştırmaya uygun olup, uygulanması kolay ve ayırım g¼c¼ olduğa y¼ksektir. Bu çalışmada, sığır orijinli *C. jejuni* ve *C. coli* izolatlarının OPA-11 primeri kullanılarak yapılan RAPD analizi neticesinde toplam 42 farklı profil saptandı. Bu, Nielsen ve ark.'nın (2000) elde ettiği 56 (145) ve Hernandez (1995) ve ark.'nın elde ettiği 118 RAPD profilinden (80) daha d¼ř¼kt¼r. İzolatların orijini, coğrafik farklılıklar ve profillerin yorumlanmasındaki farklılıkların yanı sıra kullanılan primerlerin t¼r¼ ve sayısı bu çalışmalarda birbirinden çok farklı sonuçlar elde edilmesinde rol oynayabilir.

Çalışmada sığır bağırsak içeriği ve rektal svap ¼rneklerinden elde edilen *C. jejuni* izolatları, birkaç deneme yapılmasına rağmen RAPD ile başarılı bir şekilde tiplendirilemedi. Rektal svap ve bağırsak içeriğinden saf izolasyon için zenginleştirme aşaması kullanılsa da izolatların saf olarak elde edilmemiş olması, bu başarısızlığın nedeni olarak d¼ř¼n¼lmektedir. *Campylobacter*lerin bağırsak içeriği ve rektal svap ¼rneklerinden saf olarak izolasyonu amacı ile daha ¼nceki çalışmalarda selektif besi yerleri ile birlikte filtrasyon tekniği kullanılmıştır (14, 55). Bu tez çalışmasının b¼tesi filtrasyon tekniğinin kullanılmasına olanak vermediğinden dolayı izolasyon amacı ile sadece Preston *Campylobacter* Selektif besi yeri kullanıldı.

Koyun orijinli *C. jejuni* ve *C. coli* izolatlarının RAPD analizinde t¼m izolatlar başarılı şekilde tiplendirildi ve toplam 45 farklı profil elde edildi. Profillerin birkaçının y¼ksek oranlarda tespit edilmesi ve diğer profiller arasında sadece az sayıdaki bant farklılıklarından kaynaklanan profil dağılımı g¼zlenmesinden dolayı mezbaha izolatları ile saha izolatları arasında genetik

olarak yakın bir ilişki olabileceği kanısı oluşmaktadır. Daha önce de ifade edildiği gibi koyun orijinli *Campylobacter* izolatlarındaki genetik heterojeniteyi ortaya koyan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Scates ve ark. (2003) koyun karaciğer orijinli 30 *Campylobacter* izolatında yaptıkları bir araştırmada, RAPD yöntemi ile sekiz farklı profil elde ettiklerini ve predominant profilin izolatların % 55'ini temsil ettiğini bildirmişlerdir (181). Bu tez çalışmasında, koyunlardan elde edilen en yaygın profiller; *C. jejuni* izolatlarının % 63'ü ile rektal svap örneklerinde ve *C. coli* izolatlarının % 48'i ile safra örneklerinde gözlemlendi.

Koyunlardan elde edilen *C. coli* izolatlarında saptanan RAPD profillerinin sayısı, sığır orijinli *C. coli* izolatları ile koyun orijinli *C. jejuni* izolatlarından elde edilen RAPD profillerinden daha fazla bulundu. Ayrıca koyun orijinli *C. jejuni* izolatları arasındaki genetik heterojenitenin sığır orijinli *C. jejuni* izolatlarına göre daha düşük olduğu gözlemlendi. Sığırlarda *C. jejuni* izolatlarından 37 farklı profil elde edilirken, koyunlarda 24 farklı profil saptandı. RAPD sonuçları; sığırlarda *C. jejuni* izolatları ve koyunlarda ise *C. coli* izolatları arasındaki genetik heterojenitenin daha yüksek olduğunu ortaya koymaktadır.

RAPD yönteminin ayırım gücünün RFLP tekniğine göre daha yüksek olduğu konusunda araştırmacılar arasında yaygın bir fikir mevcuttur. Çünkü RFLP ile belirli bir gen bölgesi hedef alınırken, RAPD yönteminde tüm genom hedef alınmakta ve tiplendirme yapılmaktadır. Sığır safra örneklerinden elde edilen *C. jejuni* izolatlarının RAPD ile tiplendirilmesinde saptanan profil sayısının *flaA* tiplendirme ile elde edilenden iki kat fazla olması bu görüşü desteklemektedir. Diğer yandan, RAPD yöntemi ile elde edilen bant profillerinin yorumlanması, küçük ve silik bant farklılıkları ile birlikte çok bant oluşmasından dolayı *flaA*

tiplendirmeye göre daha zordur (112, 145). Bu çalışmada, *flaA* tiplendirme ile elde edilen profillerin RAPD ile elde edilenlerle karşılaştırıldığında, ayırım ve yorumlanmasının daha kolay olduğu gözlemlendi. Buna karşılık yukarıda sözü edilen aksine, koyunlarda *flaA* tiplendirme ile elde edilen profillerin RAPD ile elde edilen profillerden daha fazla olduğu saptandı. Bu bulgular, sığırlardan elde edilen ve önceki çalışmalarda rapor edilen RAPD yönteminin ayırım gücünün daha yüksek olduğu sonucu ile tezat oluşturmaktadır. Ancak, benzer sonuçlara aynı bölgede Ertaş ve ark.'nın (2004) kanatlı hayvanlarda yaptıkları bir çalışmada da rastlanmıştır (57). RAPD analizlerinde; bant profillerinin bilgisayar ortamında değerlendirilerek sonuçların yorumlanması, bu teknikte yukarıda belirtilen nedenlerle karşımıza çıkan yorum farklılıklarının minimize edilmesinde ve dolayısıyla verilerin daha sağlıklı yorumlanmasında faydalı olmaktadır. Bu tez çalışmasında, gerekli alt yapı mevcut olmadığından izolatların RFLP ve RAPD yöntemi ile tiplendirilmesi neticesinde elde edilen profiller gözle değerlendirildi. Ayrıca çalışmada RAPD analizi için sadece bir primerin kullanılmasının, RFLP analizine göre daha düşük oranda bant profili elde edilmesinde rolü olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, sığır ve koyun orijinli *C. jejuni* ve *C. coli* suşları arasındaki genetik heterojeniteyi tespit etmeye yönelik olarak *flaA* tiplendirme ve RAPD yönteminin, bazı önemli noktalar dikkate alınmak sureti ile güvenilir bir şekilde kullanılabilmesi saptandı. Bununla birlikte metotların aynı anda kullanılmasının aralarındaki düşük korelasyon dolayısıyla tercih edilmemesi ya da farklı moleküler tiplendirme metotları ile desteklenmesi gerektiği düşünülmektedir. Bu çalışmanın sonuçları, saf izolasyonun zor olduğu rektal svap ve bağırsak içeriği

gibi örneklerden elde edilen izolatların tiplendirilmesinde *flaA* tiplendirmenin RAPD yöntemine göre daha avantajlı olabileceğini ileri sürmektedir. Buna karşılık RAPD tekniğinin saf izolasyonun kolay olduğu örneklerden elde edilen izolatların incelenmesinde tercih edilmesinin uygun olabileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışması sonucunda elde edilen veriler, *C. jejuni* ve *C. coli*'nin çevreyi ve gıda zincirini kontamine etmesinde sığır ve koyunların önemli role sahip olduklarını ve bu hayvanların *Campylobacter* epidemiyolojisinin incelenmesinde mutlaka göz önünde bulundurulması gerektiğini ortaya çıkarmıştır. *Campylobacter jejuni*'nin kaynağı olarak sığır ve koyunların her ikisi de önemli role sahip iken, *C. coli*'nin çevreye yayılmasında özellikle koyunların önemli rol oynadığı saptandı. Ayrıca yapılan tiplendirme neticesinde, koyun ve sığır orijinli izolatlar arasında yüksek bir genetik heterojenitenin mevcut olduğu ve bazı bant profillerinin diğer profillere göre daha dominant olduğu gözlemlendi. Sığır ve koyunların, insanlarda *Campylobacter* infeksiyonlarındaki rolünü ortaya koymak ve bu infeksiyonun epidemiyolojisini daha iyi anlayabilmek için, bu hayvanların yanı sıra insan ve çevresel kaynaklardan alınacak örneklerin PFGE gibi ayırım gücü ve standardizasyonu daha yüksek olan moleküler tiplendirme yöntemleri ile incelenmesini hedefleyen geniş ölçekli araştırmalara gereksinim duyulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

- 1- Aarestrup FM, Nielsen EM, Madsen M, Engberg J. (1997). Antimicrobial Susceptibility Patterns of Thermophilic *Campylobacter* spp. from Humans, Pigs, Cattle, and Broilers in Denmark. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:2244-2250.
- 2- Adesiyun AA, Kaminjolo JS, Loregnard R, Kitson-Piggott W. (1992). *Campylobacter* Infections in Calves, Piglets, Lambs and Kids in Trinidad. *Br. Vet. J.* 148:547-556.
- 3- Agulla A, Merino FJ, Villasante PA, Saz JV, Diaz A, Velasco AC. (1987). Evaluation of Four Enrichment Media for Isolation of *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 25:174-175.
- 4- Allos BM. (2001). *Campylobacter jejuni* Infections: Update on Emerging Issues and Trends. *Clin. Infect. Dis.* 32:1201-1206.
- 5- Alm RA, Guerry P, Trust TJ. (1993). Distribution and Polymorphism of the Flagellin Genes from Isolates of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.* 175:3051-3057.
- 6- Altekruse SF, Swerdlow DL, Stern NJ. (1998). Microbial Food Borne Pathogens. *Campylobacter jejuni*. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 14:31-40.
- 7- Alter T, Gaull F, Kasimir S, Gurtler M, Mielke H, Linnebur M, Fehlhaber K. (2005). Prevalences and Transmission Routes of *Campylobacter* spp. Strains within Multiple Pig Farms. *Vet. Microbiol.* 108:251-261.
- 8- Anonim. (2001). Trends in Selected Gastrointestinal Infectious. *CRD Wkly.* 11:1-2.
- 9- Arda M. (1994). *Biyoteknoloji: Bazı Temel İlkeler*. Kükem Derneği Bilimsel Yayınları No:2, İkinci Baskı.
- 10- Arda M, Minbay A, Aydın N, Akay Ö, İzgür M, Yardımcı H, Esendal ÖM, Erdeğer J, Akan M. (2002). *Kanatlı Hayvan Hastalıkları*. Medisan Yayın Serisi:50, Birinci Baskı.
- 11- Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N, Kahraman M, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür M, Diker KS. (1999). *Özel Mikrobiyoloji*. Medisan Yayın Serisi:26, Dördüncü Baskı.
- 12- Aspinall GO, McDonald AG, Pang H, Kurjanczyk LA, Penner JL. (1994). 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.* 33:241-249.
- 13- Aspinall ST, Wareing DR, Hayward PG, Hutchinson DN. (1993). Selective Medium for Thermophilic *Campylobacter*s including *Campylobacter upsaliensis*. *J. Clin. Pathol.* 46:829-831.
- 14- Atabay HI, Corry JE. (1998). The Isolation and Prevalence of *Campylobacter*s from Dairy Cattle using a Variety of Methods. *J. Appl. Microbiol.* 84:733-740.
- 15- Autenrieth IB, Schuster V, Ewald J, Harmsen D, Kreth HW. (1996). An Unusual Case of Refractory *Campylobacter jejuni* Infection in a Patient with X-Linked

- Agammaglobulinemia: Successful Combined Therapy with Maternal Plasma and Ciprofloxacin. *Clin. Infect. Dis.* 23:526-531.
- 16- Ayling RD, Woodward MJ, Evans S, Newell DG. (1996). Restriction Fragment Length Polymorphism of Polymerase Chain Reaction Products Applied to the Differentiation of Poultry *Campylobacter*s for Epidemiological Investigations. *Res. Vet. Sci.* 60:168-172.
 - 17- Bae W, Kaya KN, Hancock DD, Call DR, Park YH, Besser TE. (2005). Prevalence and Antimicrobial Resistance of Thermophilic *Campylobacter* spp. from Cattle Farms in Washington State. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:169-174.
 - 18- Bang DD, Wedderkopp A, Pedersen K, Madsen M. (2002). Rapid PCR using Nested Primers of the 16S rRNA and the Hippuricase (Hip O) Genes to Detect *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Environmental Samples. *Mol. Cell Probes.* 16:359-369.
 - 19- Barros-Velazquez J, Jimenez A, Villa TG. (1999). Isolation and Typing Methods for the Epidemiologic Investigation of Thermotolerant *Campylobacter*s. *Int. Microbiol.* 2:217-226.
 - 20- Birkenhead D, Hawkey PM, Heritage J, Gascoyne-Binzi DM, Kite P. (1993). PCR for the Detection and Typing of *Campylobacter*s. *Lett. Appl. Microbiol.* 17:235-237.
 - 21- Black RE, Levine MM, Clements ML, Hughes TP, Blaser MJ. (1988). Experimental *Campylobacter jejuni* Infection in Humans. *J. Infect. Dis.* 157:472-479.
 - 22- Blaser MJ, Berkowitz ID, LaForce M, Cravens J, Reller LB, Wang WL. (1979). *Campylobacter enteritis*: Clinical and Epidemiologic Features. *Ann. Intern. Med.* 91:179-185.
 - 23- Blaser MJ, Hardesty HL, Powers B, Wang WL. (1980). Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in Biological Milieus. *J. Clin. Microbiol.* 11:309-313.
 - 24- Blaser MJ, Wells JG, Feldman RA, Pollard RA, Allen JR. (1983). *Campylobacter* Enteritis in the United States. A Multicenter Study. *Ann. Intern. Med.* 98:360-365.
 - 25- Bolton FJ, Hutchinson DN, Coates D. (1984). Blood-Free Selective Medium for Isolation of *Campylobacter jejuni* from Feces. *J. Clin. Microbiol.* 19:169-171.
 - 26- Bolton FJ, Robertson L. (1982). A Selective Medium for Isolating *Campylobacter jejuni/coli*. *J. Clin. Pathol.* 35:462-467.
 - 27- Boukraa L, Messier S, Robinson Y. (1991). Isolation of *Campylobacter* from Livers of Broiler Chickens with and without Necrotic Hepatitis Lesions. *Avian Dis.* 35:714-717.
 - 28- Bourke B, Sherman PM, Woodward D, Lior H, Chan VL. (1996). Pulsed-Field Gel Electrophoresis Indicates Genotypic Heterogeneity among *Campylobacter upsaliensis* Strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 143:57-61.
 - 29- Brown PE, Christensen OF, Clough HE, Diggle PJ, Hart CA, Hazel S, Kemp R, Leatherbarrow AJ, Moore A, Sutherst J, Turner J, Williams NJ, Wright EJ, French NP. (2004). Frequency and Spatial Distribution of Environmental *Campylobacter* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:6501-6511.

- 30- Burnens AP, Wagner J, Lior H, Nicolet J, Frey J. (1995). Restriction Fragment Length Polymorphism among the Flagellar Genes of the Lior Heat-Labile Serogroup Reference Strains and Field Strains of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Epidemiol. Infect.* 114: 423-431.
- 31- Butzler JP, Dekeyser P, Detrain M, Dehaen F. (1973). Related *Vibrio* in Stools. *J. Pediatr.* 82:493-495.
- 32- Cabrita J, Rodrigues J, Braganca F, Morgado C, Pires I, Goncalves AP. (1992). Prevalence, Biotypes, Plasmid Profile and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* Isolated from Wild and Domestic Animals from Northeast Portugal. *J. Appl. Bacteriol.* 73:279-285.
- 33- Caldwell MB, Guerry P, Lee EC, Burans JP, Walker RI. (1985). Reversible Expression of Flagella in *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 50:941-943.
- 34- Callicott KA, Stern NJ, Hiatt KL. (2005). Isolation of DNA for PCR Assays from Noncultivable *Campylobacter jejuni* Isolates. *Poult. Sci.* 84:1530-1532.
- 35- Calva JJ, Ruiz-Palacios GM, Lopez-Vidal AP, Ramos A, Bojalil R. (1988). Cohort Study of Intestinal Infection with *Campylobacter* in Mexican Children. *Lancet.* 1:503-506.
- 36- Colles FM, Jones K, Harding RM, Maiden MC. (2003). Genetic Diversity of *Campylobacter jejuni* Isolates from Farm Animals and the Farm Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7409-7413.
- 37- Comi G, Ferroni P, Cocolin L, Cantoni C, Manzano M. (1995). Detection and Identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by Two-Step Polymerase Chain Reaction. *Mol. Biotechnol.* 3:266-268.
- 38- Cornelius AJ, Nicol C, Hudson JA. (2005). *Campylobacter* spp. in New Zealand Raw Sheep Liver and Human Campylobacteriosis Cases. *Int. J. Food Microbiol.* 99:99-105.
- 39- Corry JE, Atabay HI. (1997). Comparison of the Productivity of Cefoperazone Amphotericin Teicoplanin (CAT) Agar and Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate (mCCD) Agar for Various Strains of *Campylobacter*, *Arcobacter* and *Helicobacter pullorum*. *Int. J. Food Microbiol.* 38:201-209.
- 40- Corry JE, Atabay HI. (2001). Poultry as a Source of *Campylobacter* and Related Organisms. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* 30:96-114.
- 41- Dekeyser P, Gossuin-Detrain M, Butzler JP, Sternon J. (1972). Acute Enteritis due to Related *Vibrio*: First Positive Stool Cultures. *J. Infect. Dis.* 125:390-392.
- 42- Denes AS, Lutze-Wallace CL, Cormier ML, Garcia MM. (1997). DNA Fingerprinting of *Campylobacter fetus* Using Cloned Constructs of Ribosomal RNA and Surface Array Protein Genes. *Vet. Microbiol.* 54:185-193.
- 43- Devane ML, Nicol C, Ball A, Klena JD, Scholes P, Hudson JA, Baker MG, Gilpin BJ, Garrett N, Savill MG. (2005). The Occurrence of *Campylobacter* Subtypes in Environmental Reservoirs and Potential Transmission Routes. *J. Appl. Microbiol.* 98:980-990.

- 44- Diker KS. (1985). Studies on the Identification of *Campylobacter* Species Isolated from Sheep and Cattle. *Doğa Bil. Derg.* 9:232-240.
- 45- Diker KS. (1987). *Campylobacter* Türlerinin Çeşitli Hayvanlardan İzolasyonu ve Zoonotik Yönlerinin Değerlendirilmesi. *Mikrobiol. Bült.* 21:268-273.
- 46- Diker KS. (1993). *In Vitro* Susceptibility of Campylobacters Isolated from Poultry to Enrofloxacin and Ciprofloxacin. *Acta. Gastroenterol.* 56:36.
- 47- Dingle KE, Colles FM, Falush D, Maiden MC. (2005). Sequence Typing and Comparison of Population Biology of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 43:340-347.
- 48- Dingle KE, Colles FM, Wareing DRA, Ure R, Fox AJ, Bolton FE, Bootsma HJ, Willems RJL, Urwin R, Maiden MCJ. (2001). Multilocus Sequence Typing System for *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 39:14-23.
- 49- Doig P, Yao R, Burr DH, Guerry P, Trust TJ. (1996). An Environmentally Regulated Pilus-Like Appendage Involved in *Campylobacter* Pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 20:885-894.
- 50- Doyle LP. (1948). The Etiology of Swine Dysentery. *Am. J. Vet. Res.* 9:50.
- 51- Doyle MP, Roman DJ. (1982). Sensitivity of *Campylobacter jejuni* to Drying. *J. Food Prot.* 45:507-510.
- 52- Duim B, Wassenaar TM, Rigter A, Wagenaar J. (1999). High-Resolution Genotyping of *Campylobacter* Strains Isolated from Poultry and Humans with Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2369-2375.
- 53- Durmaz R. (2004). Moleküler Epidemiyoloji Neden Gerekli, Başlarken Nelere Dikkat Edilmelidir? 3. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara, Sayfa:52-59.
- 54- Endtz HP, Ruijs GJ, Van Klingeren B, Jansen WH, Van Der Reyden T, Mouton RP. (1991). Quinolone Resistance in *Campylobacter* Isolated from Man and Poultry Following the Introduction of Fluoroquinolones in Veterinary Medicine. *J. Antimicrob. Chemother.* 27:199-208.
- 55- Engberg J, On SLW, Harrington CS, Gerner-Smidt P. (2000). Prevalence of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Sutterella* spp. in Human Fecal Samples as Estimated by a Reevaluation of Isolation Methods for Campylobacters. *J. Clin. Microbiol.* 38:286-291.
- 56- Enright MC, Spratt BG. (1999). Multilocus Sequence Typing. *Trends Microbiol.* 7:482-487.
- 57- Ertas HB, Cetinkaya B, Muz A, Ongor H. (2004). Genotyping of Broiler-Originated *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolates Using *Fla* Typing and Random Amplified Polymorphic DNA Methods. *Int. J. Food Microbiol.* 94:203-209. Erratum in: *Int. J. Food Microbiol.* 97:105-106.

- 58- Ertas HB, Ozbey G, Kilic A, Muz A. (2003). Isolation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from the Gall Bladder Samples of Sheep and Identification by Polymerase Chain Reaction. *J. Vet. Med. B.* 50:294-297.
- 59- Fayos A, Owen RJ, Desai M, Hernandez J. (1992). Ribosomal RNA Gene Restriction Fragment Diversity amongst Lior Biotypes and Penner Serotypes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 74:87-93.
- 60- Fayos A, Owen RJ, Hernandez J, Jones C, Lastovica A. (1993). Molecular Subtyping by Genome and Plasmid Analysis of *Campylobacter jejuni* Serogroups O1 and O2 (Penner) from Sporadic and Outbreak Cases of Human Diarrhoea. *Epidemiol. Infect.* 111:415-427.
- 61- Fernandez H, Pison V. (1996). Isolation of Thermotolerant Species of *Campylobacter* from Commercial Chicken Livers. *Int. J. Food Microbiol.* 29:75-80.
- 62- Fields PI, Swerdlow DL. (1999). *Campylobacter jejuni*. *Clin. Lab. Med.* 19:489-504.
- 63- Finney M. (1993). Pulsed-Field Electrophoresis. FM Ausubel, R Brent, RE Kingston, DD Moore, JG Seidman, JA Smith ve K Struhl (Editörler). *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, Current Protocols Greene-Wiley, New York, N.Y. Sayfa:9-17.
- 64- Fitzgerald C, Owen RJ, Stanley J. (1996). Comprehensive Ribotyping Scheme for Heat-Stable Serotypes of *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 34:265-269.
- 65- Fitzgerald C, Stanley K, Andrew S, Jones K. (2001). Use of Pulsed Field Gel Electrophoresis and Flagellin Gene Typing in Identifying Clonal Groups of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Farm and Clinical Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1429-1436.
- 66- Florin I, Antillon F. (1992). Production of Enterotoxin and Cytotoxin in *Campylobacter jejuni* Strains Isolated in Costa Rica. *J. Med. Microbiol.* 37:22-29.
- 67- Friedman CR, Neimann J, Wegener HC, Tauxe RV. (2000). Epidemiology of *Campylobacter jejuni* Infections in the United States and Other Industrialized Nations. In: *Campylobacter*, 2nd edition. I Nachamking ve MJ Blaser (Editörler). ASM Press, Washington, D.C. Sayfa:121-138.
- 68- Garcia MM, Lior H, Stewart RB, Ruckerbauer GM, Trudel JR, Skljarevski A. (1985). Isolation, Characterization, and Serotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Slaughter Cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:667-672.
- 69- Garrity GM. (2001). The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.1, 2nd Edition" DR Boone, RW Castenholz (Editörler). Williams & Wilkins, Baltimore.
- 70- Giacoboni GI, Itoh K, Hirayama K, Takahashi E, Mitsuoka T. (1993). Comparison of Fecal *Campylobacter* in Calves and Cattle of Different Ages and Areas in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 55:555-559.
- 71- Gibson JR, Fitzgerald C, Owen RJ. (1995). Comparison of PFGE, Ribotyping and Phage-Typing in the Epidemiological Analysis of *Campylobacter jejuni* Serotype HS2 Infections. *Epidemiol. Infect.* 115:215-225.

- 72- Gibson JR, Sutherland K, Owen RJ. (1994). Inhibition of DNase Activity in PFGE Analysis of DNA from *Campylobacter jejuni*. Lett. Appl. Microbiol. 19:357-358.
- 73- Gilchrist MJ, Grewell CM, Washington JA. (1981). Evaluation of Media for Isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from Fecal Specimens. J. Clin. Microbiol. 14:393-395.
- 74- Goossens H, Butzler JP. (1992). Isolation and Identification of *Campylobacter* spp. I Nachamkin, MJ Blaser ve LS Tompkins (Editörler). *Campylobacter jejuni*: Current Status and Future Trends. ASM Press, Washington, D.C. Sayfa:93.
- 75- Grau FH. (1991). *Campylobacter jejuni/coli*. In: Foodborne Microorganisms of Public Health Significance, 4th edn. KA Buckle (Editör). AIFST (NSW Branch): Food Microbiology Group. Sayfa:136-151.
- 76- Guerrant RL, Wanke CA, Pennie RA, Barrett LJ, Lima AAM, O'Brien AD. (1987). Production of a Unique Cytotoxin by *Campylobacter jejuni*. Infect. Immun. 55:2526-2530.
- 77- Harvey RB, Droleskey RE, Sheffield CL, Edrington TS, Callaway TR, Anderson RC, Drinnon DL, Ziprin RL, Scott HM, Nisbet DJ. (2004). *Campylobacter* Prevalence in Lactating Dairy Cows in the United States. J. Food Prot. 67:1476-1479.
- 78- Hazeleger WC, Beumer RR, Rombouts FM. (1992). The Use of Latex Agglutination Tests for Determining *Campylobacter* Species. Lett. Appl. Microbiol. 14:181-184.
- 79- Hernandez J, Fayos A, Alonso JL, Owen RJ. (1996). Ribotypes and AP-PCR Fingerprints of Thermophilic *Campylobacter* from Marine Recreational Waters. J. Appl. Bacteriol. 80:157-164.
- 80- Hernandez J, Fayos A, Ferrus MA, Owen RJ. (1995). Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* Isolated from Human Faeces, Seawater and Poultry Products. Res. Microbiol. 146:685-696.
- 81- Hickey TE, Baqar S, Bourgeois AL, Ewing CP, Guerry P. (1999) *Campylobacter jejuni*-Stimulated Secretion of Interleukin-8 by INT407 Cells. Infect. Immun. 67:88-93.
- 82- Hilton AC, Mortiboy D, Banks JG, Penn CW. (1997). RAPD Analysis of Environmental, Food and Clinical Isolates of *Campylobacter* spp. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 18: 119-124.
- 83- Hoar BR, Atwill ER, Elmi C, Utterback WW, Edmondson AJ. (1999). Comparison of Fecal Samples Collected Per Rectum and off the Ground for Estimation of Environmental Contamination Attributable to Beef Cattle. Am. J. Vet. Res. 60:1352-1356.
- 84- Hoge CW, Gambel JM, Srijan A, Pitarangsi C, Echeverria P. (1998). Trends in Antibiotic Resistance among Diarrheal Pathogens Isolated in Thailand over 15 years. Clin. Infect. Dis. 26:341-345.
- 85- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore.
- 86- Hong Y, Berrang ME, Liu T, Hofacre CL, Sanchez S, Wang L, Maurer JJ. (2003). Rapid Detection of *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, and *Salmonella enterica* on Poultry Carcasses

- by Using PCR Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3492-3499.
- 87- Hooper DC. (1998). Clinical Applications of Quinolones. *Biochim. Biophys. Acta.* 1400:45-61.
- 88- Hooper DC. (1999). Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance. *Drug Resist. Updates* 2:38-55.
- 89- Hutchison ML, Walters LD, Avery SM, Munro F, Moore A. (2005). Analyses of Livestock Production, Waste Storage, and Pathogen Levels and Prevalences in Farm Manures. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1231-1236.
- 90- Inglis GD, Kalischuk LD, Busz HW. (2004). Chronic Shedding of *Campylobacter* Species in Beef Cattle. *J. Appl. Microbiol.* 97:410-420.
- 91- Inglis GD, Kalischuk LD, Busz HW, Kastelic JP. (2005). Colonization of Cattle Intestines by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter lanienae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5145-5153.
- 92- Janssen P, Coopman R, Huys G, Swings J, Bleeker M, Vos P, Zabeau M, Kersters K. (1996). Evaluation of the DNA Fingerprinting Method AFLP as a New tool in Bacterial Taxonomy. *Microbiol.* 142:1881-1893.
- 93- Jensen AN, Andersen MT, Dalsgaard A, Baggesen DL, Nielsen EM. (2005). Development of Real-Time PCR and Hybridization Methods for Detection and Identification of Thermophilic *Campylobacter* spp. in Pig Faecal Samples. *J. Appl. Microbiol.* 99:292-300.
- 94- Johnson WM, Lior H. (1988). A New Heat-Labile Cytolethal Distending Toxin (CLDT) Produced by *Campylobacter* spp. *Microb. Pathog.* 4:115-126.
- 95- Jones FS, Orcutt M, Little RB. (1931). Vibriosis (*Vibrio jejuni*, n. Sp.) Associated with Intestinal Disorders of Cows and Calves. *J. Exp. Med.* 53:853.
- 96- Kaldor J, Speed BR. (1984). Guillain-Barré Syndrome and *Campylobacter jejuni*: a Serological Study. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)*. 288:1867-1870.
- 97- Kapperud G, Lassen J, Ostroff SM, Aasen S. (1992). Clinical Features of Sporadic *Campylobacter* Infections in Norway. *Scand. J. Infect. Dis.* 24:741-749.
- 98- Karmali MA, Simor AE, Roscoe M, Fleming PC, Smith SS, Lane J. (1986). Evaluation of a Blood-Free, Charcoal-Based, Selective Medium for the Isolation of *Campylobacter* Organisms from Feces. *J. Clin. Microbiol.* 23:456-459.
- 99- Ketley JM. (1997). Pathogenesis of Enteric Infection by *Campylobacter*. *Microbiol.* 143:5-21.
- 100- King V, Clayton CL. (1991). Genomic Investigation of Phenotypic Variation in *Campylobacter jejuni* Flagellin. *FEMS Microbiol. Lett.* 84:107-112.
- 101- Kita E, Oku D, Hammuro A, Nishikawa F, Emoto M, Yagyu Y, Katsui N, Kashiba S. (1990). Hepatotoxic Activity of *Campylobacter jejuni*. *J. Med. Microbiol.* 33:171-183.

- 102-Konkel ME, Cieplak W. (1992). Altered Synthetic Response of *Campylobacter jejuni* to Cocultivation with Human Epithelial Cells is Associated with Enhanced Internalization. *Infect. Immun.* 60:4945-4949.
- 103-Konkel ME, Garvis SG, Tipton SL, Erson DE, Cieplak W. (1997). Identification and Molecular Cloning of a Gene Encoding a Fibronectin Binding Protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Mol. Microbiol.* 24:953-963.
- 104-Kramer JM, Frost JA, Bolton FJ, Wareing DR. (2000) *Campylobacter* Contamination of Raw Meat and Poultry at Retail Sale Identification of Multiple Types and Comparison with Isolates from Human Infection. *J. Food Prot.* 63:1654-1659.
- 105-Ladron de Guevara C, Perez-Pomata MT, Agulla A, Merino FJ, Villasante PA, Velasco AC. (1989). Recovery of *Campylobacter* from Human Faeces Stored at 4 Degrees C. *Epidemiol. Infect.* 102:281-285.
- 106-Larkin C, Van Donkersgoed C, Mahdi A, Johnson P, McNab B, Odumeru J. (2006). Antibiotic Resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolated from Hog, Beef, and Chicken Carcass Samples from Provincially Inspected Abattoirs in Ontario. *J. Food Prot.* 69:22-26.
- 107-Lin JJ, Kuo J. (1995). AFLP: a Novel PCR-Based Assay for Plant and Bacterial DNA Fingerprinting. *Focus.* 17:52-56.
- 108-Lior H, Woodward DL, Edgar JA, Laroche LJ, Gill P. (1982). Serotyping of *Campylobacter jejuni* by Slide Agglutination Based on Heat-Labile Antigenic Factors. *J. Clin. Microbiol.* 15:761-768.
- 109-Logan JM, Burnens A, Linton D, Lawson AJ, Stanley J. (2000). *Campylobacter lanienae* sp. nov., a New Species Isolated from Workers in an Abattoir. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2:865-872.
- 110-MacPherson JM, Eckstein PE, Scoles GC, Gajadhar AA. (1993). Variability of the Random Amplified Polymorphic DNA Assay among Thermal Cycles, and Effects of Primer and DNA Concentration. *Mol. Cell. Probes.* 7:293-299.
- 111-Madden RH, Moran L, Scates P. (1996). Sub-typing of Animal and Human *Campylobacter* spp. Using RAPD. *Lett. Appl. Microbiol.* 23:167-170.
- 112-Madden RH, Moran L, Scates P. (1998). Frequency of Occurrence of *Campylobacter* spp. in Red Meats and Poultry in Northern Ireland and Their Subsequent Subtyping Using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism and the Random Amplified Polymorphic DNA Method. *J. Appl. Microbiol.* 84:703-708.
- 113-Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. (1998). Multilocus Sequence Typing: A Portable Approach to the Identification of Clones within Populations of Pathogenic Microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:3140-3145.

- 114- Mannering SA, West DM, Fenwick SG, Marchant RM, O'connell K. (2006). Pulsed-Field Gel Electrophoresis of *Campylobacter jejuni* Sheep Abortion Isolates. *Vet Microbiol.* 115:237-242.
- 115- Manning G, Dowson CG, Bagnall MC, Ahmed IH, West M, Newell DG. (2003). Multilocus Sequence Typing for Comparison of Veterinary and Human Isolates of *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6370-6379.
- 116- Manser PA, Dalziel RW. (1985). A Survey of *Campylobacter* in Animals. *J. Hyg. (Lond).* 95:15-21.
- 117- Matsuda M, Tsukada M, Fukuyama M, Kato Y, Ishida Y, Honda M, Kaneuchi C. (1995). Detection of Genomic Variability among Isolates of *Campylobacter jejuni* from Chickens by Crossed-Field Gel Electrophoresis. *Cytobios.* 82:73-79.
- 118- Mazurier S, Van Der Giessen A, Heuvelman K, Wernars K. (1992). RAPD Analysis of *Campylobacter* Isolates: DNA Fingerprinting without the Need to Purify DNA. *Lett. Appl. Microbiol.* 14:260-262.
- 119- McSweeney E, Walker RI. (1986). Identification and Characterization of Two *Campylobacter jejuni* Adhesins for Cellular and Mucous Substrates. *Infect. Immun.* 53:141-148.
- 120- Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. (1999). Food Related Illness and Death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5:607-625.
- 121- Meinersmann RJ, Helsel LO, Fields PI, Hiatt KL. (1997). Discrimination of *Campylobacter jejuni* Isolates by *Fla* Gene Sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 35:2810-2814.
- 122- Miller WG, Englen MD, Kathariou S, Wesley IV, Wang G, Pittenger-Alley L, Siletz RM, Muraoka W, Fedorka-Cray PJ, Mandrell RE. (2006). Identification of Host-Associated Alleles by Multilocus Sequence Typing of *Campylobacter coli* Strains from Food Animals. *Microbiol.* 152:245-255.
- 123- Miller WG, On SL, Wang G, Fontanoz S, Lastovica AJ, Mandrell RE. (2005). Extended Multilocus Sequence Typing System for *Campylobacter coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. helveticus*. *J. Clin. Microbiol.* 43:2315-2329.
- 124- Minihan D, Whyte P, O'Mahony M, Fanning S, McGill K, Collins JD. (2004). *Campylobacter* spp. in Irish Feedlot Cattle: a Longitudinal Study Involving Pre-Harvest and Harvest Phases of the Food Chain. *J. Vet. Med. B.* 51:28-33.
- 125- Misawa N, Kawashima K, Kawamoto H, Kondo F. (2002). Development of a Combined Filtration-Enrichment Culture Followed by a One-Step Duplex PCR Technique for the Rapid Detection of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in Human Faecal Samples. *J. Med. Microbiol.* 51:86-89.
- 126- Moore J, Curran M, Wareing D, Fox A, Boyd N, Glynn G. (2001). Investigation of Infection with *Campylobacter jejuni* in a Man with Hypogammaglobulinaemia Using

- PCR-Single-Stranded Conformational Polymorphism (PCR-SSCP) Typing. *Int. J. Med. Microbiol.* 291:21-25.
- 127-Moore JE. (2001). An Optimised Recovery Method for Thermophilic *Campylobacter* from Liver. *BMC Microbiol.* 1:32.
- 128-Moore JE, Corcoran D, Dooley JS, Fanning S, Lucey B, Matsuda M, McDowell DA, Megraud F, Millar BC, O'Mahony R, O'Riordan L, O'Rourke M, Rao JR, Rooney PJ, Sails A, Whyte P. (2005). *Campylobacter*. *Vet. Res.* 36:351-382.
- 129-Moore JE, Madden RH. (1998). Occurrence of Thermophilic *Campylobacter* spp. in Porcine Liver in Northern Ireland. *J. Food Prot.* 61:409-413.
- 130-Moore JE, Madden RH. (2003). Comparison of Eight Phenotypic Methods for Subspecies Characterization of Thermophilic *Campylobacter* spp. Isolated from Pig Liver. *J. Food Prot.* 66:1079-1084.
- 131-Moore JE, Matsuda M. (2002). The History of *Campylobacter*: Taxonomy and Nomenclature. *Irish Vet. J.* 10:495-501.
- 132-Moore JE, O'Riordan L, Wareing DR, Doyle R, Lanser J, Stanley T, Matsuda M, Matsui T, Murphy PG. (2003). Phenotypic and Genotypic Relationship between *Campylobacter* spp Isolated from Humans and Chickens in Northern Ireland-A Comparison of Three Phenotyping and Two Genotyping Schemes. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 206:211-216.
- 133-Moore MA, Blaser MJ, Perez-Perez GI, O'Brien AD. (1988). Production of a Shiga-Like Cytotoxin by *Campylobacter*. *Microb. Path.* 4:455-462.
- 134-Moran AP. (1995). Biological and Serological Characterization of *Campylobacter jejuni* Lipopolisaccharides with Deviating Core and Lipid A Structures. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 11:121-130.
- 135-Morgan D, Gunneberg C, Gunnell D, Healing TD, Lamerton S, Soltanpoor N, Lewis DA, White DG. (1994). An Outbreak of *Campylobacter* Infection Associated with the Consumption of Unpasteurised Milk at a Large Festival in England. *Eur. J. Epidemiol.* 10:581-585.
- 136-Murinda SE, Nguyen LT, Oliver SP. (2004). Problems in Isolation of *Campylobacter jejuni* from Frozen-Stored Raw Milk and Bovine Fecal Samples: Genetic Confirmation Using Multiplex PCR. *Foodborne Pathog. Dis.* 1:166-171.
- 137-Muz A, Ozcan C, Gurcay M, Angin M. (1992). Investigation on Aerobic, Anaerobic and Microaerophilic Bacteria in the Gall Bladders of Sheep and Cattle Slaughtered in Meat and Fish Organization in Elazig. *F. U. Sag. Bil. Derg.* 6:98-104.
- 138-Nachamkin I. (1995). *Campylobacter* and *Arcobacter*. In: *Manual of Clinical Microbiology*. PR Murry, EJ Baron ve MA pfaller (Editörler). ASM Press, Washington, D. C. Sayfa:483.
- 139-Nachamkin I, Barbagallo S. (1990). Culture Confirmation of *Campylobacter* spp. by Latex Agglutination. *J. Clin. Microbiol.* 28:817-818.

- 140-Nachamkin I, Allos MB, Ho T. (1998). *Campylobacter* Species and Guillain- Barré Syndrome. Clin. Microbiol. Rev. 11:555-567.
- 141-Nachamkin I, Ung H, Patton CM. (1996) Analysis of HL and O Serotypes of *Campylobacter* Strains by the Flagellin Gene Typing System. J. Clin. Microbiol. 34:277-281.
- 142-Newell DG, McBride H, Dolby JM. (1985). 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. 95:217-227.
- 143-Ng LK, Stiles ME, Taylor DE. (1985). Inhibition of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by Antibiotics Used in Selective Growth Media. J. Clin. Microbiol. 22:510-514.
- 144-Nielsen EM. (2002). Occurrence and Strain Diversity of Thermophilic *Campylobacter*s in Cattle of Different Age Groups in Dairy Herds. Lett. Appl. Microbiol. 35:85-89.
- 145-Nielsen EM, Engberg J, Fussing V, Petersen L, Brogren CH, On SL. (2000). Evaluation of Phenotypic and Genotypic Methods for Subtyping *Campylobacter jejuni* Isolates from Humans, Poultry, and Cattle. J. Clin. Microbiol. 38:3800-3810.
- 146-Nishimura M, Nukina M, Yuan JM, Shen BQ, Ma JJ, Ohta M, Saida T, Uchiyama T. (1996). PCR-Based Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analysis and Serotyping of *Campylobacter jejuni* Isolates from Diarrheic Patients in China and Japan. FEMS Microbiol. Lett. 142:133-138.
- 147-Olive DM, Bean P. (1999). Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. J. Clin. Microbiol. 37:1661-1669.
- 148-Oliveira TC, Barbut S, Griffiths MW. (2005). A Robotic DNA Purification Protocol and Real-Time PCR for the Detection of *Campylobacter jejuni* in Foods. J. Food Prot. 68:2131-2135.
- 149-On SLW. (1994). Confirmation of Human *Campylobacter concisus* Isolates Misidentified as *Campylobacter mucosalis* and Suggestions for Improved Differentiation between the Two Species. J. Clin. Microbiol. 32:2305-2306.
- 150-On SLW. (1996) Identification Methods for *Campylobacter*s, *Helicobacter*s, and Related Organisms. Clin. Microbiol. Rev. 9:405-422.
- 151-Ono K, Kurazono T, Niwa H, Itoh K. (2003). Comparison of Three Methods for Epidemiological Typing of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. Curr. Microbiol. 47:364-371.
- 152-Ono K, Yamamoto K. (1999) Contamination of Meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama, Japan. Int. J. Food Microbiol. 47:211-219.
- 153-Owen RJ, Fayos A, Hernandez J, Lastovica A. (1993). PCR-Based Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of DNA Sequence Diversity of Flagellin Genes of *Campylobacter jejuni* and Allied Species. Mol. Cell. Probes. 7:471-480.

- 154- Owen RJ, Fitzgerald C, Sutherland K, Borman P. (1994). Flagellin Gene Polymorphism Analysis of *Campylobacter jejuni* Infecting Man and Other Hosts and Comparison with Biotyping and Somatic Antigen Serotyping. *Epidemiol. Infect.* 113:221-234.
- 155- Owen RJ, Sutherland K, Fitzgerald C, Gibson J, Borman P, Stanley J. (1995). Molecular Subtyping Scheme for Serotypes HS1 and HS4 of *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 33:872-877.
- 156- Oyofa BA, Thornton SA, Burr DH, Trust TJ, Pavlovskis OR, Guerry P. (1992). Specific Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by Using Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30:2613-2619.
- 157- Patton CM, Barrett TJ, Morris GK. (1985). Comparison of the Penner and Lior Methods for Serotyping *Campylobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.* 22:558-565.
- 158- Pei Z, Burucoa C, Grignon B, Baqar S, Huang XZ, Kopecko DJ, Bourgeois AL, Fauchere JL, Blaser MJ. (1998). Mutation in the *peb1A* Locus of *Campylobacter jejuni* Reduces Interactions with Epithelial Cells and Intestinal Colonization of Mice. *Infect. Immun.* 66:938-943.
- 159- Pei Z, Ellison RT, Blaser MJ. (1991). Identification, Purification and Characterization of Major Antigenic Proteins of *Campylobacter jejuni*. *J. Biol. Chem.* 266:16363-16369.
- 160- Penner GA, Bush A, Wise R, Kim W, Domier L, Kahsa K, Laroche A, Scoles G, Molnar SJ, Fedak G. (1993). Reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis among Laboratories. *PCR Methods Applic.* 2:341-345.
- 161- Penner JL, Hennessy JN. (1980). Passive Hemagglutination Technique for Serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the Basis of Soluble Heat-Stable Antigens. *J. Clin. Microbiol.* 12:732-737.
- 162- Peres SY, Marches O, Daigle F, Nougayrede JP, Herault F, Tasco C, DeRycke J, Oswald E. (1997). A New Cytotoxic Distending Toxin (CDT) from *Escherichia coli* Producing CNF2 Blocks HeLa Cell Division in G2/M Phase. *Mol. Microbiol.* 24:1095-1107.
- 163- Persson S, Olsen KE. (2005). Multiplex PCR for Identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from Pure Cultures and Directly on Stool Samples. *J. Med. Microbiol.* 54:1043-1047.
- 164- Petersen L, Nielsen EM, Engberg J, On SL, Dietz HH. (2001). Comparison of Genotypes and Serotypes of *Campylobacter jejuni* Isolated from Danish Wild Mammals and Birds and from Broiler Flocks and Humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3115-3121.
- 165- Pigrau C, Bartolome R, Almirante B, Planes AM, Gavalda J, Pahissa A. (1997). Bacteremia due to *Campylobacter* Species: Clinical Findings and Antimicrobial Susceptibility Patterns. *J. Infect. Dis.* 25:1414-1420.
- 166- Pitt TL. (1994). Bacterial Typing Systems: The Way Ahead. *J. Med. Microbiol.* 4:1-2.
- 167- Priest F, Austin B. (1993). *Modern Bacterial Taxonomy*, 2nd ed. Chapman & Hall, London.

- 168- Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GB. (1994). Clinical Veterinary Microbiology, Moby-Year Europa Limited, Graphos-Spain.
- 169- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. (2002). Veterinary Microbiology and Microbial Diseases. Blackwell Science Ltd, Oxford.
- 170- Ribeiro CD, Price TH. (1984). The Use of Preston Enrichment Broth for the Isolation of Thermophilic Campylobacters from Water. J. Hyg. 92:45-51.
- 171- Ribeiro CD, Thomas MT, Kembrey D, Magee JT, North Z. (1996). Resistotyping of Campylobacters: Fulfilling a Need. Epidemiol. Infect. 116:169-175.
- 172- Robinson DA. (1981). Infective Dose of *Campylobacter jejuni* in Milk. Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.). 282:1584.
- 173- Robinson DA. (1982). *Campylobacter* Infection in Milking Herds. In: Epidemiology, Pathogenesis and Biochemistry. DG Newell (Editor). Lancaster: MTP Press. Sayfa:274.
- 174- Roop RM, Smibert RM, Johnson JL, Krieg NR. (1984). Differential Characteristics of Catalase-Positive Campylobacters Correlated with DNA Homology Groups. Can. J. Microbiol. 30:938-951.
- 175- Roop RM, Smibert RM, Johnson JL, Krieg NR. (1985). DNA Homology Studies of the Catalase-Negative Campylobacters and "*Campylobacter fecalis*," an Emended Description of *Campylobacter sputorum*, and Proposal of the Neotype Strain of *Campylobacter sputorum*. Can. J. Microbiol. 31:823-831.
- 176- Rosef D, Gondrosen B, Kapperud G, Underdal B. (1983). Isolation and Characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Domestic and Wild Mammals in Norway. Appl. Environ. Microbiol. 46:855-859.
- 177- Russell RG, Odonoghue M, Blake Jr DC, Zulty J, De Tolla LJ. (1993). Early Colonic Damage and Invasion of *Campylobacter jejuni* in Experimentally Challenged Infant *Macaca mulatta*. J. Infect. Dis. 168:210-215.
- 178- Sam WI, Lyons MM, Waghorn DJ. (1999). Increasing Rates of Ciprofloxacin Resistant *Campylobacter*. J. Clin. Pathol. 52:709.
- 179- Sato K, Bartlett PC, Kaneene JB, Downes FP. (2004). Comparison of Prevalence and Antimicrobial Susceptibilities of *Campylobacter* spp. Isolates from Organic and Conventional Dairy Herds in Wisconsin. Appl. Environ. Microbiol. 70:1442-1447.
- 180- Savaşan S, Çiftçi A, Diker KS. (2004). Emergence of Quinolone Resistance among Chicken Isolates of *Campylobacter* in Turkey. Turk J. Vet. Anim. Sci. 28:391-397.
- 181- Scates P, Moran L, Madden RH. (2003). Effect of Incubation Temperature on Isolation of *Campylobacter jejuni* Genotypes from Foodstuffs Enriched in Preston Broth. Appl. Environ. Microbiol. 69:4658-4661.
- 182- Sebald M, Veron M. (1963). Teneur en Bases de L'ADN et Classification de Vibrions. Ann de l'Inst Pasteur. 105:897-910.
- 183- Skirrow MB. (1977). *Campylobacter* Enteritis: a "New" Disease. BMJ. 2:9-11.

- 184- Skirrow MB. (1994). Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Bacteria. J. Comp. Pathol. 111:113-149.
- 185- Skirrow MB, Benjamin J. (1980). Differentiation of Enteropathogenic *Campylobacter*. J. Clin. Pathol. 33:1122.
- 186- Skirrow MB, Jones DM, Sutcliffe E, Benjamin J. (1993). *Campylobacter* Bacteraemia in England and Wales, 1981-1991. Epidemiol. Infect. 110:567-573.
- 187- Sorvillo FJ, Lieb LE, Waterman SH. (1991). Incidence of Campylobacteriosis among Patients with AIDS in Los Angeles County. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 4:598-602.
- 188- Spangler BD. (1992). Structure and Function of Cholera Toxin and the Related *E. coli* Heat-Labile Enterotoxin. Microbiol. Rev. 56:622-647.
- 189- Stanley J, Linton D, Sutherland K, Jones C, Owen RJ. (1995). High-Resolution Genotyping of *Campylobacter coli* Identifies Clones of Epidemiologic and Evolutionary Significance. J. Infect. Dis. 172:1130-1134.
- 190- Stanley K, Jones K. (2003). Cattle and Sheep Farms as Reservoirs of *Campylobacter*. J. Appl. Microbiol. 94:104-113.
- 191- Stanley KN, Wallace JS, Currie JE, Diggle PJ, Jones K. (1998). Seasonal Variation of Thermophilic *Campylobacter*s in Lambs at Slaughter. J. Appl. Microbiol. 84:1111-1116.
- 192- Stanley KN, Wallace JS, Currie JE, Diggle PJ, Jones K. (1998). The Seasonal Variation of Thermophilic *Campylobacter*s in Beef Cattle, Dairy Cattle and Calves. J. Appl. Microbiol. 85:472-480.
- 193- Sullivan CB, Diggle MA, Clarke SC. (2005). Multilocus Sequence Typing: Data Analysis in Clinical Microbiology and Public Health. Mol. Biotechnol. 29:245-254.
- 194- Takata T, Fujimoto S, Amako K. (1992). Isolation of Nonchemotactic Mutants of *Campylobacter jejuni* and Their Colonization of the Mouse Intestinal Tract. Infect. Immun. 60:3596-3600.
- 195- Tauxe RV. (1992). Epidemiology of *Campylobacter jejuni* Infections in the United States and Other Industrialized Nations. In: *Campylobacter jejuni*: Current Status and Future Trends. I Nachamkin, MJ Blaser ve LS Tompkins (Editörler). ASM Press, Washington, D.C. Sayfa:9-16.
- 196- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Muruay BE, Persing DH, Swaminathan B. (1995). Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. J. Clin. Microbiol. 33:2233-2239.
- 197- Tolcin R, LaSalvia MM, Kirkley BA, Vetter EA, Cockerill FR, Procop GW. (2000). Evaluation of the Alexon-Trend ProSpecT *Campylobacter* Microplate Assay. J. Clin. Microbiol. 38:3853-3855.
- 198- Trachoo N. (2003). *Campylobacter jejuni*: An Emerging Pathogen. Songklanakarin J. Sci. Technol. 25:141-157.

- 199-Urwin R, Maiden MC. (2003). Multilocus Sequence Typing: A Tool for Global Epidemiology. *Trends Microbiol.* 11:479-487.
- 200-Van Belkum A, Struelens M, De Visser A, Verbrugh H, Tibayrenc M. (2001). Role of Genomic Typing in Taxonomy, Evolutionary Genetics and Microbial Epidemiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:547-560.
- 201-Vandamme P. (2000). Taxonomy of the Family *Campylobacteriaceae* In: *Campylobacter*. I Nachamkin ve MJ Blaser (Editörler). ASM Press, Washington, D. C. Sayfa:3-27.
- 202-Vogt RL, Sours HE, Barrett T. (1982). *Campylobacter* Enteritis Associated with Contaminated Water. *Ann. Intern. Med.* 96:292-296.
- 203-Vuckovic D, Abram M, Bubonja M, Wraber B, Doric M. (2006). Host Resistance to Primary and Secondary *Campylobacter jejuni* Infections in C57Bl/6 Mice. *Microb. Pathog.* 40:35-39.
- 204-Walker RI, Caldwell MB, Lee EC, Guerry P, Trust TJ, Ruiz-Palacios GM. (1986). Pathophysiology of *Campylobacter* Enteritis. *Microbiol. Rev.* 50:81-94.
- 205-Wareing DR, Bolton FJ, Fox AJ, Wright PA, Greenway DL. (2002). Phenotypic Diversity of *Campylobacter* Isolates from Sporadic Cases of Human Enteritis in the UK. *J. Appl. Microbiol.* 92:502-509.
- 206-Wassenaar TM. (1997). Toxin Production by *Campylobacter* spp. *Rev. Clin. Microbiol.* 10:466-476.
- 207-Wassenaar TM, Blaser MJ. (1999). Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* Infections of Humans. *Microbes Infect.* 1:1023-1033.
- 208-Wassenaar TM, Bleumink-Pluym NM, Van Der Zeijst BA. (1991). Inactivation of *Campylobacter jejuni* Flagellin Genes by Homologous Recombination Demonstrates That *FlaA* but not *FlaB* is Required for Invasion. *EMBO J.* 10:2055-2061.
- 209-Wassenaar TM, Fry BN, Van Der Zeijst BAM. (1995). Variation of the Flagellin Gene Locus of *Campylobacter jejuni* by Recombination and Horizontal Gene Transfer. *Microbiol.* 141:95-101.
- 210-Wassenaar TM, Newell DG. (2000). Genotyping of *Campylobacter* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1-9.
- 211-Wassenaar TM, On SLW, Meinersmann RJ. (2000). Genotyping and the Consequences of Genetic Instability. In: *Campylobacter*, 2nd edn. I Nachamkin ve MJ Blaser (Editörler). ASM Press, Washington, D.C. Sayfa:369-380.
- 212-Welsh J, McClelland M. (1990). Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers. *Nucleic Acids Res.* 18:7213-7218.
- 213-Wesley IV, Muraoka WT, Trampel DW, Hurd HS. (2005). Effect of Preslaughter Events on Prevalence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Market-Weight Turkeys. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2824-2831.

- 214- Wesley IV, Wells SJ, Harmon KM, Green A, Schroeder-Tucker L, Glover M, Siddique I. (2000). Fecal Shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in Dairy Cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1994-2000.
- 215- Whitehouse A, Balbo PB, Pesci EC, Cottle DL, Mirabito PM, Pickett CL. (1998). *Campylobacter jejuni* Cytolethal Distending Toxin Causes a G2-Phase Cell Cycle Block. *Infect. Immun.* 66:1934-1940.
- 216- Winters DK, O'Leary AE, Slavik MF. (1997). Rapid PCR with Nested Primers for Direct Detection of *Campylobacter jejuni* in Chicken Washes. *Mol. Cell Probes.* 11:267-271.
- 217- Wooldridge KG, Ketley JM. (1997). *Campylobacter*-Host Cell Interactions. *Trends Microbiol.* 5:96-102.
- 218- Yan W, Chang N, Taylor DE. (1991). Pulsed-Field Gel Electrophoresis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Genomic DNA and its Epidemiologic Application. *J. Infect. Dis.* 163:1068-1072.
- 219- Yao R, Burr DH, Doig P, Trust TJ, Nlu H, Guerry P. (1994). Isolation of Motile and Non-Motile Insertional Mutants of *Campylobacter jejuni*: the Role of Motility in Adherence and Invasion of Eukaryotic Cells. *Mol. Microbiol.* 14:883-893.
- 220- Yao R, Burr DH, Guerry P. (1997). *CheY*-Mediated Modulation of *Campylobacter jejuni* Virulence. *Mol. Microbiol.* 23:1021-1031.
- 221- Zweifel C, Zychowska MA, Stephan R. (2004). Prevalence and Characteristics of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. Isolated from Slaughtered Sheep in Switzerland. *Int. J. Food Microbiol.* 92:45-53.

8. ÖZGEÇMİŞ

I- Kişisel Bilgiler:

Adı-Soyadı: Mehmet Nuri AÇIK

Doğum Yeri: Palu

Doğum Tarihi: 02.05.1978

Medeni Durumu: Evli

Yabancı Dil: İngilizce

E-mail: mnacik@firat.edu.tr

Yazışma Adresi: Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji AD. 23119

ELAZIĞ

II- Eğitim:

1995-2000 Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, ELAZIĞ.

1992-1995 Mehmet Akif Ersoy Lisesi, ELAZIĞ

1985-1992 Atatürk İlköğretim Okulu, PALU/ELAZIĞ

III- Akademik Deneyim:

2002- Araştırma Görevlisi, Fırat Üniv. Veteriner Fak.
Mikrobiyoloji AD., ELAZIĞ

IV- Üye Olduğu Kuruluşlar:

2002- Veteriner Mikrobiyoloji Derneği

2000- Elazığ Bölgesi Veteriner Hekimleri Odası

V- Yayınlar:

- 1- **Acik MN**, Cetinkaya B. (2006). Heterogeneity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from healthy sheep. *Vet. Microbiol.* **115**: 370-375.
- 2- **Acik MN**, Cetinkaya B. (2006). Random amplified polymorphic DNA analysis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from healthy cattle and sheep. *J. Med. Microbiol.* **55**: 331-334.
- 3- **Acik MN**, Cetinkaya B. (2005). The heterogeneity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from healthy cattle. *Lett. Appl. Microbiol.* **41**: 397-403.
- 4- **Acik MN**, Yurdakul NE, Cakici L, Onat N, Dogan Ö, Cetinkaya B. (2004). *Trat* and *CNF2* genes of *Escherichia coli* isolated from milk of healthy cows and sheep. *Res Vet. Sci.* **77**(1): 17-21.
- 5- Öngör H, Cetinkaya B, Karahan M, **Acik MN**, Bulut H, Muz A. (2004). Detection of *Coxiella burnetii* by IMS-PCR in milk of sheep in Turkey. *Vet. Rec.* **154**(18): 570-572.
- 6- Öngör H, Cetinkaya B, **Acik MN**, Atabay HI. (2004). Investigation of arcobacters in meat and faecal samples of clinically healthy cattle in Turkey. *Lett. Appl. Microbiol.* **38**(4): 339-344.
- 7- Öngör H, Cetinkaya B, **Acik MN**, Karahan M, Bulut H. (2004). Investigation of *Chlamydophila abortus* in ovine milk by immunomagnetic separation-polymerase chain reaction (IMS-PCR). *J. Vet. Med. B.* **51**(1): 43-45.