

TAVUK ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *ARCOBACTER* TÜRLERİNDE SITOLETHAL
DISTENDING TOXIN (CDT) VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Ayşen KARAMAN

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Mayıs- 2019

TAVUK ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *ARCOBACTER* TÜRLERİNDE
SITOLETHAL DISTENDING TOXIN (CDT) VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Ayşen KARAMAN

Kütahya Dumlupınar Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği Uyarınca
Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Prof. Dr. Tuba İÇA

Mayıs-2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ayşen KARAMAN'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "TAVUK ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *ARCOBACTER* TÜRLERİNDE SİTOLETHAL DİSTENDING TOXİN (CDT) VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI" başlıklı bu çalışma, jürimizce Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

2.8/05/2019

Prof. Dr. Önder UYSAL
Enstitü Müdürü, Fen Bilimleri Enstitüsü

.....

Prof. Dr. Hayri DAYIOĞLU
Anabilim Dalı Başkanı, Biyoloji Bölümü

.....

Prof. Dr. Tuba İÇA
Danışman, Biyoloji Bölümü

.....

Sınav Komitesi Üyeleri

Prof. Dr. Tuba İÇA
Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü, Kütahya Dumlupınar Üniversitesi

.....

Prof.Dr. Duygu Perçin RENDERS
Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü
Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi

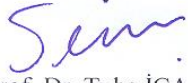
.....

Prof.Dr. Ferdağ ÇOLAK
Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü, Kütahya Dumlupınar Üniversitesi

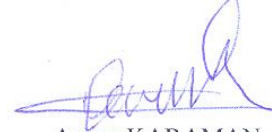
.....

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tezin hazırlanmasında Akademik kurallara riayet ettiğimizi, özgün bir çalışma olduğunu ve yapılan tez çalışmasının bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olduğunu, çalışma kapsamında teze ait olmayan veriler için kaynak gösterildiğini ve kaynaklar dizininde belirtildiğini, Yüksek Öğretim Kurulu tarafından kullanılmak üzere önerilen ve Kütahya Dumlupınar Üniversitesi tarafından kullanılan İntihal Programı ile tarandığını ve benzerlik oranının % 25 çıktığını beyan ederiz. Aykırı bir durum ortaya çıktığı takdirde tüm hukuki sonuçlara razı olduğumuzu taahhüt ederiz.



Prof. Dr. Tuba İÇA



Ayşen KARAMAN

TAVUK ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *ARCOBACTER* TÜRLERİNDE SİTOLETHAL DISTENDING TOXIN (CDT) VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Ayşen KARAMAN

Biyoloji, Yüksek Lisans Tezi, 2019

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Tuba İÇA

ÖZET

Bu çalışmada broyler karkaslarda *Arcobacter* türlerinin ve sitoletal distending toksin (CDT) geninin varlığı araştırıldı. Ticari olarak tüketime sunulan 34 adet broyler tavuk örneğinde, 22 adet (% 64.7) *Arcobacter* türü izole edilerek mPZR ile tür düzeyinde identifiye edildi. Bu etkenler tür bazında değerlendirildiğinde incelenen örneklerde % 55.9 oranında *A. butzleri*, % 8.8 oranında *A. cryoaerophilus* varlığı tespit edildi. *A. skirrowii* ise saptanamadı.

Aynı tavuk örneklerinin bir kısmında *Arcobacter* türlerine *Campylobacter* türlerinin de eşlik ettiği tespit edildi. *A. butzleri* izole edilen örneklerden % 20.6'sında *C. jejuni*, % 2.9'unda *C. coli* tespit edilirken örneklerin %32.4'ünde yalnızca *A. butzleri* saptandı. *A. cryoaerophilus* izole edilen örneklerden % 5.9'unda *C. jejuni*, %2.9'unda *C. coli* tespit edilirken örneklerden hiç birisinde yalnızca *A.cryoaerophilus* saptanamadı.

İzole edilen *Arcobacter* türlerinin % 32.3'ünde *Campylobacter* türlerinin de tespit edilmesi bu türlerin biyofilm şekillendirerek birlikte bir yaşam formu oluşturabilecekleri düşündürdü. Bu nedenle izole edilen suşlar arasından seçilen dokuz adet *Campylobacter* türü ve dokuz adet *Arcobacter* türünün biyofilm oluşum yeteneği iki farklı atmosferik koşulda (aerobik ve mikroaerofilik) incelendi. Orta derecede biyofilm oluşumu, mikroaerofilik ortamda sadece bir *Arcobacter* türünde tespit edildi. Suşların geri kalan kısmı zayıf biyofilm formasyonu şekillendirdi. *Campylobacter* ve *Arcobacter* türlerinin biyofilm oluşumunda birincil kolonizer mikroorganizmalar olmadığı, ancak ikincil kolonize ediciler olarak biyofilm ortamında varolabileceği sonucuna varıldı. Bu çalışmada, *Arcobacter* türlerinde *cdt* gen varlığı moleküler yöntemlerle araştırıldı ve ayrıca DDL-1 hücre hattı kullanılarak MTT testi ile olası diğer toksinler araştırıldı. *Arcobacter* türlerinde toksin varlığı tespit edilemedi.

Anahtar Kelimeler: *Arcobacter* spp., Biyofilm, Toksin, Tavuk Eti, Kütahya.

INVESTIGATION OF CYTOLETHAL DISTENDING TOXIN (CDT) PRESENTATION IN *ARCOBACTER* SPECIES ISOLATED FROM CHICKEN SAMPLES

Ayşen KARAMAN

Biology, M. S. Thesis, 2019

Thesis Supervisor: Prof. Dr. Tuba İÇA

SUMMARY

In this study, *Arcobacter* species and the presence of cytolethal distending toxin (CDT) gene in broiler carcasses were investigated. In 22 commercially available broiler chickens, 22 (64.7 %) *Arcobacter* species were isolated and identified at species level with mPZR. When these factors were evaluated in terms of species, *A. butzleri* presence was 55.9 % and *A. cryoaerophilus* was % 8.8 in the samples examined. However, *A. skirrowii* could not be detected.

It is detected that *Arcobacter* species were also accompanied by *Campylobacter* species in some of the same chicken samples, *C. jejuni* in 20.6 % and *C. coli* in 2.9 % of *A. butzleri* isolated samples were detected but only *A. butzleri* by itself is detected in 32.4 % of samples. *C. jejuni* in 5.9 % and *C. coli* in 2.9 % of *A. cryoaerophilus* isolated samples were detected but *A. cryoaerophilus* is always detected with other species in the samples.

The detection of *Campylobacter* species in 32.3 % of the isolated *Arcobacter* species suggested that these species could form a life form together to shape the biofilm. For this reason, nine *Campylobacter* species and nine *Arcobacter* species, selected from isolated strains, were examined for their biofilm forming capability in two different atmospheric conditions (aerobic and microaerophilic).

Moderate biofilm formation was detected in only one *Arcobacter* species in the microaerophilic medium. The rest of the strains developed a weak biofilm formation. It was concluded that *Campylobacter* and *Arcobacter* species are not primary colonizer microorganisms in biofilm formation, but may exist in biofilm environment as secondary colonizers. In this study, the presence of *cdt* gene in *Arcobacter* species was investigated by molecular methods and also other probable toxin was investigated on DDT-1 cell line by MTT test. The presence of toxin was not detected in *Arcobacter* species.

Keywords: *Arcobacter* spp., Biofilm, Toxin, Chicken Meat, Kütahya.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince verdiği desteklerden dolayı değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Tuba İÇA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bilgisi ve yardımseverliğiyle hep yanımda olan Sayın Arş. Gör. Dr. Ayhan YILMAZ'a teşekkür ederim. Bu zorlu süreçte desteğini ve bilgisini hiç esirgemeyen sevgili arkadaşım Mehtap TUNÇEL'e teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarımızı birlikte keyifle yaptığımız sevgili arkadaşım Eda BOZKURT'a teşekkür ederim. Zorlu sürecimde yanımdan hiç ayrılmayan üstün sabır ve ilgisiyle her daim elinden geleni yapan sevgili nişanlım Mert KARAYEL'e teşekkür ederim. Hayatımın her inişli çıkışlı yollarında yanımda oldukları gibi tez sürecim boyunca da her zaman arkamda olan ve desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen sevgili kardeşim Aylın KARAMAN'a, annem Hatice KARAMAN'a ve babam Mesut KARAMAN'a teşekkür ederim.

Ayşen KARAMAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
SUMMARY	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Tarihçe	2
1.2. <i>Arcobacter</i> Türlerinin Genel Özellikleri	3
1.3. Dezenfektanlara Duyarlılık	6
1.4. <i>Arcobacter</i> Cinsinin Sınıflandırılması.....	7
1.5. <i>Arcobacter</i> Türleri	10
1.5.1. <i>Arcobacter butzleri</i>	11
1.5.2. <i>Arcobacter cryaerophilus</i>	12
1.5.3. <i>Arcobacter skirrowii</i>	13
1.6. Epidemiyoloji.....	14
1.6.1. İnsanda <i>Arcobacter</i> türleri	16
1.6.2. Tavuklarda <i>Arcobacter</i> türleri.....	18
1.6.3. Sularda <i>Arcobacter</i> türleri	19
1.7. Bulaşma Yolları	20
1.8. <i>Arcobacter</i> Cinsinin Patojenitesi ve Virülens Faktörleri	21
1.9. CDT	22
1.9.1. <i>Campylobacter</i> türlerinin CDT'si	23
1.9.2. <i>Arcobacter</i> türlerinin CDT'si.....	24
1.9.3. CDT'nin yapısı ve enzimatik aktivitesi.....	25
1.9.4. Hücre içine alma.....	26
1.9.5. Hücresel Tepkiler	27
1.9.6. Kolit ve inflamasyon bağlantılı kanser oluşumunda CDT'nin rolü	29
1.10. Biyofilm.....	30
1.10.1. Biyofilm oluşumu ve yapısı.....	30
1.10.2. Biyofilm oluşum basamakları	30
2. TEŞHİS.....	32
2.1. İzolasyon.....	32
2.2. İdentifikasyon	34

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.2.1. Fenotipik Tanı	34
2.2.2. Moleküler Tanı	34
2.2.3. Genotiplendirme	36
3. MATERYAL	39
3.1. Numuneler	39
3.2. Besiyerleri	39
3.3. PCR Testi İçin Kullanılan Malzemeler	41
Multiplex PCR İçin Kullanılan Malzemeler	41
4. METOT	43
4.1. Örneklerin Hazırlanması	43
4.2. <i>Arcobacter</i> Türlerinin İzolasyonu	43
4.3. DNA Ekstraksiyonu	43
4.4. mPCR ile <i>Arcobacter</i> Türlerinin Saptanması	44
4.5. m-PZR ile CDT Gen Varlığının Saptanması	44
4.6. Termofilik <i>Campylobacter</i> ve <i>Arcobacter</i> Türlerinde Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi	45
4.7. Sitotoksite testi	45
5. BULGULAR	47
5.1. <i>Arcobacter</i> Türlerinin Tanımlanması ve Termofilik <i>Campylobacter</i> Türleri ile Birliktelikleri	47
5.2. Termofilik <i>Campylobacter</i> ve <i>Arcobacter</i> Türlerinde Biyofilm Oluşumu	49
5.3. Sitotoksite Testi	50
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	51
KAYNAKLAR DİZİNİ	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. <i>Arcobacter</i> cinsine ait taksonomi.	10
1.2. CDT'nin hücre içine alınması	27
1.3. Biyofilm oluşum basamakları.....	31
4.1. 25 – 26 numaralı <i>Arcobacter</i> 'lerin kanlı agar üzerindeki görüntüsü.	43
5.1. <i>Arcobacter</i> türlerinin m-PCR sonuçları.	47
5.2. Farklı atmosferik koşullarında (aerob ve mikroaerofilik) <i>Campylobacter</i> ve <i>Arcobacter</i> türlerinin biyofilm oluşumu sonuçları.	49
5.3. Bradford protein kalibrasyon eğrisi (BSA, Bovine Serum Albumin, Sarı Çerçeve) ve <i>Arcobacter</i> türlerinin filtre fraksiyonları içerisindeki protein miktarının belirlenmesi.	50
5.4. <i>Arcobacter</i> filtre fraksiyonlarının DLD-1 hücre hattı üzerine sitotoksik etkilerinin MTT test sonuçları.	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. <i>Epsilonbacteria</i> cinslerinin karakteristik ayırt edici özellikleri	5
1.2. <i>Arcobacter</i> türleri arasında görülen farklı koloni renkleri	5
1.3. <i>Arcobacter</i> türleri ve izole edildiği kaynaklar ile referansları	9
1.4. <i>Arcobacter</i> türleri.	11
1.5. <i>Arcobacter butzleri</i> , <i>Arcobacter cryaerophilus</i> (Alt Grup 1 ve Alt Grup 2) ve <i>Arcobacter skirrowii</i> 'nin karakteristik özelliklerinin karşılaştırılması	14
3.1. Çalışmada kullanılan primerlerin oligonükleotid dizileri hedef bölgeleri ve baz büyüklükleri.	41
5.1. İncelenen 34 adet tavuk etinde <i>Arcobacter</i> ve termofilik <i>Campylobacter</i> türlerinin izolasyonu ve bir arada bulunma oranları.	47
5.2. <i>Campylobacter</i> ve <i>Arcobacter</i> izolatlarının, türler, cdt toksini ve biyofilm oluşturma kabiliyetlerine göre moleküler tanı sonuçları.	48

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
bp	Baz Çifti
°C	Derece
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
AEB	Arcobacter Enrichment Broth Besiyeri
AFLP	Amplifiye Parça Uzunluk Polimorfizm Analizi
<i>Caco-2</i>	İnsan Epitel Kolorektal Adenokarsinom-2 Geni
CAT	Caphoperazone-Amphotericin-Teicoplanin Desteği
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EPS	Ekstrasellüler Polimerik Madde
ERIC-PCR	Tekrarlayan Enterobakteriyel İntergenik Konsensüs-PCR
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
HEp-2	İnsan Epitel Hücresi-2 Hattı
ICMSF	Gıda Mikrobiyolojik Şartları Uluslararası Komisyonu
mCCDA	Modifiye Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar
MHA	Mueller Hinton Agar Besiyeri
MHB	Mueller Hinton Broth Besiyeri
TSB	Tryptic Soy Broth Besiyeri

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
CDT _s	Sitolethal Distending Toksinleri
CLSI	The Institute of the Clinical and Laboratory Standarts
CRC	Kolorektal Karsinom
DLD-1	İnsan Kolon Epiteli-1 Hücre Hattı
FCS	Fetal Calf Serum
MLST	Multilokus Dizi Tiplendirme Tekniği
m-PCR	Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu
MTT	Metiltiazol Difenil Tetrazolyum
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Rastgele Amplifiye Edilen Polimorfik DNA Tekniği
RNA	Ribonükleik Asit
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
SCID	Kombine İmmün Yetmezlik

1.GİRİŞ

Arcobacter cinsi, insan ve hayvanların bağırsaklarına yerleşerek burada enteropatojen etki göstermesiyle ilgi çeken ve bu yönüyle de hastalık yapıcı ajan olarak tanımlanmıştır (Ho vd., 2006; Snelling vd., 2006). *Arcobacter* cinsi, konak çeşitliliği bakımından oldukça yaygındır. Bu yönüyle *Proteobacteria*'nın çok bilinmeyen bir alt grubu olarak tanımlanır (Debruyne vd., 2008; Wesley ve Miller, 2010).

Arcobacter'lerin taksonomisi ve patojenitesinin günümüzde oldukça ilerleme kaydettiğini söyleyebiliriz. (Kayman, 2012; Sasi Jyothsna, vd., 2013; Levican, vd., 2013). Son zamanlarda izole edilen *Arcobacter* türleri arasına, *Arcobacter pacifucus*, *Arcobacter faecis*, *Arcobacter canalis*, *Arcobacter lekithochrous* ve *Arcobacter haliotis* gibi yeni türler eklenmiştir. Güney Pasifik Gyre Deniz Suyundan izole edilen *Arcobacter pacifucus*, gram negatif, kapsülsüz, spor içermeyen ve hafif kavisli çubuklardır. Aerobik koşullar altında 37 °C'de 48 saat boyunca kuluçkaya yatırılan koloniler soluk sarı renktedir. Pigmentleri yoktur. *Arcobacter lekithochrous* yumuşakça kuluçkahanelerinden izole edilmiştir. Bu tür bakteriler küçük ve kahveremsi koloniler oluştururlar. *Arcobacter haliotis* türü ise *Haliotis gigantea* türlerinin deniz kulağından izole edilmiştir (Zhang ve Yu vd., 2016; Dieguez ve Balboa vd., 2017; Tanaka vd., 2017).

Bakterilerin neden olduğu bazı ateşli hastalıklar, kalp damarlarının endotel tabakasında mikrobik enfeksiyonların görülmesi ve karın zarı peritonunun iltihaplanması gibi bazı semptomların görüldüğü vakalardan alınan dışkı örneklerinde *Arcobacter* cinsi bakterilere rastlanmıştır (Woo vd., 2001; Lau vd., 2002; Ho vd., 2006; Abdelbaqi vd., 2007; Kownhar vd., 2007; Samie vd., 2007; Kopilovic vd., 2008; Jiang vd., 2010;). Ek olarak bazı düşük vakalarında, meme iltihaplarında ve sindirim sistemi rahatsızlığı görülen hayvanlarda da çeşitli *Arcobacter* türlerinin varlığı tespit edilmiştir (Vandamme vd., 1992; Van Driessche vd., 2003). Sığır ve domuzlarda yapılan bazı çalışmalar, bu canlılarda meydana gelen üreme bozukluklarının *Arcobacter* türlerinden kaynaklı olabileceği belirtilmiştir (De Oliveira vd., 1997; Ellis vd., 1978; On vd., 2002). Dünya çapında yapılan araştırmalara bakıldığında ise *Arcobacter* türlerinin tavuk ürünlerinden

alınan örneklerde dışkı örneklerinden alınan örneklerle kıyasla daha yaygın halde bulunduğu tespit edilmiştir (de Boer vd., 1996; Son vd., 2006).

Arcobacter türlerinin hayvansal kökenli kontamine gıdalara ve insan hastalıklarına neden olabileceği düşünüldüğünde gıda güvenliği konusunda ciddi bir potansiyel endişe oluşturduğu öne sürülmektedir.

1.1. Tarihçe

Arcobacter cinsi, *Campylobacter* ve *Sulfurospirillum* cinsleri ile birlikte *Campylobacteriaceae* familyasına ait bir bakteri cinsidir. *Arcobacter* cinsi ilk olarak 1977 yılında Ellis ve arkadaşları tarafından aborte sığır ve domuz fetuslarından izole edilmiştir. Başlangıçta *Campylobacter* cinsine dahil edilen *Arcobacter* cinsi, düşük sıcaklıklarda ve oksijen varlığında üreyebilme özelliği ile *Campylobacter* cinsinden ayrılmışlardır (Ellis vd., 1977; Ellis vd., 1978).

Vandamme ve arkadaşları tarafından, 1991 yılında iki aerotolerant *Campylobacter* türü *Arcobacter* cinsi olarak tanımlanmıştır. Bu türlerden *Campylobacter nitrofigilis*, *Arcobacter nitrofigilis* olarak *Campylobacter cryaerophilus* ise *Arcobacter cryaerophilus* şeklinde adlandırılmıştır (Vandamme vd., 1991). Daha sonra bu iki türe *A. butzleri* ve *A. skirrowii*'yi ekleyen Vandamme ve arkadaşları, 1992 yılındaki çalışmaları sonucunda tür sayısını 4 olarak tanımlamışlardır (Vandamme vd., 1992a). Ardından yapılan çalışmaların neticesinde birçok türün tanımlaması yapılmıştır. Houf ve arkadaşları 2005 yılında çürümüş ızgara etinden izole ettikleri *Arcobacter halophilus*'un tanımlamasını yapmıştır (Houf vd., 2005). Donachie ve arkadaşları'nın 2005 yılında yaptığı bir çalışmada ise zorunlu halofil olarak kabul edilen *Arcobacter halophilus*'un tanımlaması yapılmıştır (Donachie vd., 2005).

Ayrıca çeşitli ortamlarda birbirinden farklı 12 yeni *Arcobacter* türü tanımlanmıştır. Bunlardan;

- *Arcobacter mytili*, midye ve tuzlu sudan (Collado vd., 2009a),
- *Arcobacter thereius*, böbreklerden ve düşük olarak doğan domuzların böbrek ve karaciğerinden ve ördeklerin kloak içeriğinden (Houf vd., 2009),

- *Arcobacter marinus*, deniz suyundan (Kim vd., 2009),
- *Arcobacter trophiarum*, şişmanlaştırılmış domuzların dışkı örneklerinden (De Smet vd., 2011),
- *Arcobacter defluvii*, kanalizasyondan (Collado vd., 2011),
- *Arcobacter molluscorum* (Figueras vd., 2011a), *Arcobacter ellisii* (Figueras vd., 2011b), *Arcobacter bivalviorum* (Levican vd., 2012) ve *Arcobacter cloacae* (Levican vd., 2013a), midyelerden,
- *Arcobacter venerupis*, istiridyelerden (Levican vd., 2012),
- *Arcobacter suis*, domuz etinden (Levican vd., 2013a),
- *Arcobacter anaerophilus*'un akarsu tortusundan (SasiJyothsna vd., 2013) elde edildiği bildirilmiştir.

Tüm bu bilgilere ek olarak *Arcobacter* cinsinin taksonomisi, patojenitesi ve bulaşma yolları bakımından daha yeni bilgilere ihtiyaç olduğu göz ardı edilemez bir gerçektir (Collado vd., 2009).

1.2. *Arcobacter* Türlerinin Genel Özellikleri

Arcobacter cinsi bakterilerin ilk kez Ellis ve arkadaşları tarafından domuzlardan ve aborte sığır fetuslarından izole edildiği bildirilmiştir (Ellis ve Neill, 1978). *Campylobacteraceae* familyasına bağlı olan *Arcobacter* cinsi *Epsilonbacteria* grubunun üyelerinden olup *Campylobacter* ve *Helicobacter spp.* türleri ile birlikte bu grubu oluştururlar. *Arcobacter* cinsine ait *A. butzleri*, *A. skirrowi* ve *A. cryaerophilus* türleri patojen özellikleri ile bilinir.

Arcobacter cinsi türlerinin mikroskopik incelemesine bakıldığında, spiral biçiminde ya da helezon şeklinde olduğu gözlemlenmiştir. Genişliği 0.2-0.9 µm, uzunluğu 0.5-3 µm olan bu gram negatif bakterilerin tüm türlerinin düşük oksijen konsantrasyonunda büyüdüğü bildirilmiştir (Vandamme vd., 2005). *Arcobacter* türlerinin tamamında oksidaz enzimi tespit edilmiş ancak katalaz enziminin bazı türlerde bulunmadığı görülmüştür. Başlangıçta *Arcobacter* türleri 15 °C ile 30 °C aralığındaki sıcaklıklara uyumlu olarak tanımlanmış, ancak (Vandamme vd., 1992a) sonraları

tanımlanan yeni türler bu genel kanıyı değiştirmiştir. Spiral veya helezon şeklinde olan bu bakteriler, tek polarlı flagellaya sahip olup, hareketlerini bu kamçı ile sağlamaktadırlar (İrkin ve Korukluoğlu, 2009). Yapılan bir çalışmada *Arcobacter* türlerinin kurbağa larvalarına benzer şekilde veya tirbişon tarzı hareket ettikleri bildirilmiştir (Aydın ve Atabay, 2001; Son vd., 2007b).

A. butzleri için optimum pH değerinin 6-7 aralığında ve *A. cryaerophilus* için ise 7-7.5 aralığında olduğu bilinmektedir. Mikroaerofilik veya aerobik ortamlarda gelişebilmektedirler. Ortam sıcaklığının 55 °C ve daha yüksek olması *Arcobacter* cinsinin inaktive olmasına sebep olur (İrkin ve Korukluoğlu, 2009). *Arcobacter* türleri bazı yönleriyle *Campylobacter* türleri ile karıştırılsa da iki cinsi birbirinden ayıran en belirgin özellik *Arcobacter* cinsine ait türlerin aerobik olarak üreyebilmeleridir (Atabay ve Aydın, 2001). *A. cryaerophilus* mikroaerobik ortama ihtiyaç duymakla birlikte *Campylobacter* ve *Helicobacter* türlerine göre daha yüksek oksijen toleransları vardır. İlk izolasyonlarında normal atmosferde üreyebilen türleri de bulunmaktadır. Mikroaerobik ortamdaki optimum üreme ısı 37°C'dir. Bununla birlikte 15 °C, 25 °C, 30 °C ve 42 °C'de değişkenlik gösterecek şekilde üreyebildikleri görülmüştür (Vandamme ve ark., 1992; Atabay ve ark., 1998). Üreme ısı aerobik ortamda 30 °C ve anaerobik ortamda ise 35-37 °C arasındadır. En düşük gelişme sıcaklığı 5 °C olarak tanımlanmıştır (Vandamme ve ark. 1991; Corry ve Atabay, 1997)

Arcobacter, *Campylobacter* ve *Helicobacter* cinsinin oksijene olan toleransı, flagella tipi ve 15 °C'de gelişme durumları Çizelge 1.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. *Epsilonbacteria* cinslerinin karakteristik ayırt edici özellikleri (Wesley, 1996).

Cins isimleri	Gelişme Durumları (15 °C'de)	Oksijen İhtiyaçları	Flagella (Kamçı) Tipleri
<i>Arcobacter</i>	Gelişme var	Aerotolerant	Kılıfsız ve Tekli polar flagella
<i>Campylobacter</i>	Gelişme yok	Mikroaerofilik	Kılıfsız ve Tekli polar flagella
<i>Helicobacter</i>	Gelişme yok	Mikroaerofilik	Kılıflı ve Tekli polar flagella

Arcobacter'ler karbonhidratları, fermentasyon ve oksijenli solunumda kullanamaz. Bunların yerine C kaynağı olarak organik asitleri ve aminoasitleri kullanmayı tercih ederler (Vandamme vd., 1992a). Esculin molekülünü hidroliz edemezler ve DNA hidrolizleri değişkenlik göstermektedir. Jelatin testi *Arcobacter*'lerde negatif sonuç vermektedir (Vandamme ve ark., 1992b).

Arcobacter türlerinin koloni şekilleri ve renkleri arasında farklılıklar bulunmaktadır. Koloni renklerinin en iyi gözlemlenebildiği ortam kömürlü besiyeridir. Bazı *Arcobacter* türlerine ait koloni renkleri Çizelge 1.2 de verilmiştir.

Çizelge 1.2. *Arcobacter* türleri arasında görülen farklı koloni renkleri (Savaşan ve Çiftci, 2003).

<i>Arcobacter</i> Türleri	Koloni Renkleri
• <i>Arcobacter cryaerophilus</i>	• Sarı ve Bej
• <i>Arcobacter nitrofigilis</i>	• Beyaz
• <i>Arcobacter butzleri</i>	• Beyaz-Bej
• <i>Arcobacter skirrowii</i>	• Gri

Arcobacter türlerinin çoğunun nonhemolitik olduğu sadece *Arcobacter skirrowii* suşlarının çoğunun α -hemoliz olduğu bildirilmiştir (Savaşan ve Çiftci, 2003).

Sıcaklık

Arcobacter türleri için en uygun sıcaklığın 15 °C ile 37 °C arasındaki değerlerin olduğu bildirilmiştir. *Arcobacter* türleri ile *Campylobacter* türleri karşılaştırıldığında en belirgin ayırt edici özelliğin 30 °C'de atmosferik oksijen ortamında üreyebilmeleri ve 15 °C'de gelişebilmeleri olduğu gözlemlenmiştir. Diğer yandan *Arcobacter* türlerinin termofilik *Campylobacter*'lerden farklı olarak oksijen varlığında da üreyebildikleri bildirilmiştir (Doksanüçöğlü, 2006; Ertaş, 2009). *Arcobacter*'lerin 4 °C'de bakteri yoğunluğunun kademeli olarak 21 günde azaldığı da Vandamme ve arkadaşları (1992a) tarafından yapılan bir çalışmada tespit edilmiştir (Lehner, vd., 2005; Doksanüçöğlü, 2006).

Ph

Arcobacter türlerinin optimum 5.5-9.5 pH aralığında yaşamaya uyumlu oldukları bildirilmiştir. İnkübasyon sıcaklığının da *Arcobacter* türlerinin pH aralığının belirlenmesinde önem taşıdığı vurgulanmıştır. 30°C'de ve pH 5'de üreyebilmelerine rağmen aynı pH değerinde 37 °C'de üreyememektedirler (Ertaş, 2009).

Oksijen

Stampi ve ark. (1993), gerçekleştirdikleri bir çalışmada elde ettikleri işlem görmemiş atık su örneklerinin hepsinde, saf oksijen verilen suların ise % 67'sinde *Arcobacter cryaerophilus* türlerinin bulunduğu tespit edildi. Bu yüzden her ne kadar aerotolerant olsalar da, *A. cryaerophilus* türünün özellikle ilk izolasyon için mikroaerofilik bir ortam gerektirdiği bildirilmiştir (Stampi, vd., 1993; Doksanüçöğlü, 2006).

1.3. Dezenfektanlara Duyarlılık

Arcobacter cinsi türleri kemoorganotrof olarak bilinirler. Karbonhidratları fermante etmedikleri gibi okside de etmezler. Enerji kaynağı olarak aminoasitleri veya trikarboksilik asit döngüsü elemanlarını tercih ederler (Akıncıoğlu, 2011).

İçme sularına bulaşmış olan *Arcobacter* 'lerin dezenfeksiyonu hakkında fazlaca bilgi bulunmamaktadır. Rice ve ark. (1999) tarafından gerçekleştirilen inaktivasyon deneyleri sonucunda *Arcobacter butzleri*'nin klor karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. İçme sularına katılan klor miktarlarının *Campylobacter jejuni* ve *Helicobacter pylori* gibi organizmaların kontrolünde de yeterli olduğu bildirilmiştir (Rice, vd., 1999). Nitekim yapılan bir araştırmada ClO₂ ile dezenfeksiyon işlemi yapıldığında, atık su içerisinde bulunan *Arcobacter cryaerophilus*'un % 97-98 oranında inhibe edilebildiği tespit edilmiştir (Stampi, vd., 1993).

Arcobacter türlerinin mezbahalardan alınan numunelerde fazla bulunması dezenfeksiyon işleminde yapılan hatalardan kaynaklandığı bildirilmiştir. *A. butzleri*'nin paslanmaz çelik yüzeylerine yapıştığı ve % 5 etanol içeren kültür ortamında hayatta kalabildiği gözlemlenmiştir. Yapılan bir çalışmada ise *A. butzleri* izolatlarının sodyum hipoklorit konsantrasyonlarını tolere edebildiği bildirilmiştir. Kesimhanelerde, PCR ile tespit edilen % 20 oranında *Arcobacter* türlerinin, 200-500 ppm aktif chlorine içeren hipoklorid ile yapılan temizlik işlemi sonrasında % 2.5 oranına kadar düştüğü saptanmıştır. Bu oranlarda uygulanan hipokloridin *Arcobacter* türlerini tamamen temizleyemediği vurgulanmıştır (Rasmussen, vd., 2013).

1.4. *Arcobacter* Cinsinin Sınıflandırılması

Bilinen ilk *Arcobacter* türü izolasyonu, 1977'de sığır ve domuz fetuslarından elde edilen spirillum benzeri mikroorganizmaların tanımlanması sonucu ortaya çıkmıştır (Ellis, 1977; Ellis, 1978; Ferreira, vd., 2015). Bu organizmaların 15 °C'de ve mikroaerobik ortamda üreyebilme özelliklerine sahip oldukları bildirilmiştir. Bazı *Campylobacter* türleri ile de benzerlikler gösterdikleri ancak yüksek oksijen konsantrasyonu ve düşük sıcaklıklara dayanıklı olmalarıyla ayırt edildikleri tespit edilmiştir. Sonuç olarak tanımlamaları aerotolerant *Campylobacter*'ler şeklinde yapılmıştır. 1983 yılında ise *Spartina alterniflora* bitkisinin köklerinde aerotolerant *Campylobacter nitrofigilis* türünün tespit edildiği bildirilmiştir. (McClung, vd., 1983; Ferreira, vd., 2015). 1985 yılında Neill ve ark. (1985) *Campylobacter cryaerophila* adlı yeni bir tür tanımlamışlar ve 1988 yılında ise Kiehlbauch ve arkadaşları ilk olarak insan

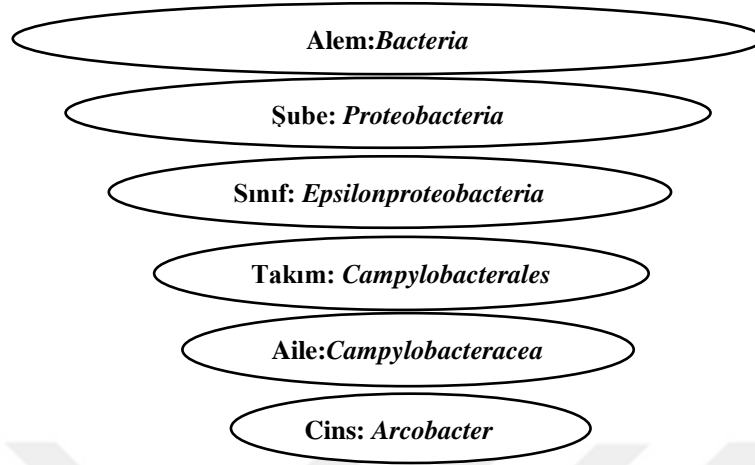
örneklerinde *Campylobacter cryaerophila* adlı yeni bir türün tanımlamasını yapmışlardır (Tee, vd., 1988). İnsan dışkılarından ve bazı hayvanlardan elde edilen suşlar için de *Campylobacter butzleri* adı önerilmiştir (Kiehlbauch, vd., 1991; Ferreira, vd., 2015). Cinsin büyümesi ise Vandamme ve ark. (1992a) tarafından *Arcobacter skirrowii*'nin tanımlanması ve *Campylobacter butzleri*'nin *Arcobacter butzleri* olarak yeniden isimlendirilmesi ile olmuştur (Collado ve Figueras, 2011).

Arcobacter cinsine ait yapılan yeni çalışmalar bu cinse ait yeni türlerin varlığını ortaya koymaktadır. Zhang ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan bir çalışmada Güney Pasifik deniz suyu yüzeyinden alınan SW028T suşunun *Arcobacter* cinsine ait olduğu tespit edilmiştir. SW028T suşunun *Arcobacter molluscorum* türü ile benzerlik gösterdiği ancak tanımlanamayan bir fosfolipid bulundurması ve suşun filogenetik pozisyonu temizlik genleri rpoB, gyrB ve atpA'nın analizi ile doğrulanması sonucunda bu suşun yeni bir tür olduğu rapor edilmiştir. Fenotipik, kemotaksonomik ve filogenetik analizler temelinde, SW028T suşu, *Arcobacter pacificus* isminin önerildiği *Arcobacter* cinsinin yeni bir türünü temsil eder (Zhang vd., 2016). Yine Japonya'da yapılan bir çalışmada *Haliotis gigantea* türünün deniz kulağı bağırsağından gram negatif, aerobik, çubuk şeklinde, hafif kavisli bir bakteri izole edilmiştir. MA5T olarak adlandırılan bu suş, 16S rRNA, gyrB, hsp60 ve rpoB gen sekanslarına dayanan filogenetik analizler neticesinde *Arcobacter* cinsi olduğu saptanmıştır. Bu suşun 16S rRNA gen dizisinin *Arcobacter* türlerinin tip suşları ile karşılaştırıldığında *A. nitrofigilis* türüne % 95.1 oranında benzerlik gösterdiği ortaya çıkmıştır. Suş MA5T, fenotipik olarak filogenetik en yakın *Arcobacter* türlerinden, % 0.05 safranin ve % 0.01 2,3,5-trifenil tetrazolyum klorür (TTC) üzerinde büyüebilme kabiliyeti ile ayırt edilebilir. MA5T'nin filogenetik, kemotaksonomik ve fenotipik ayırt edici özelliklerine dayanarak, bu türe *Arcobacter haliotis* ismi verilmiştir (Tanaka vd., 2017).

Günümüze kadar farklı ortamlardan birçok yeni tür tanımlaması yapılmıştır. *Arcobacter* türleri ve elde edildikleri kaynaklar Çizelge 1.3' de verilmiştir.

Çizelge 1.3. *Arcobacter* türleri ve izole edildiği kaynaklar ile referansları (Kayman, 2012; Figueras ve Gonzalez, 2013; Levican, vd., 2013; Sasi Jyothsna, vd., 2013).

Kaynaklar	Türler	Referanslar
Hypersaline lagününden	<i>Arcobacter halophilus</i>	(Donachie, vd., 2005)
Tavuk karkaslarından	<i>Arcobacter cibarius</i>	(Houf, vd., 2005),
Ördeklerin kloakından ve aborte domuz fetuslarının böbreklerinden	<i>Arcobacter thereius</i>	(Houf, vd., 2009),
Kabuklu deniz ürünlerinden	<i>Arcobacter molluscorum</i> ve <i>Arcobacter mytili</i>	(Figueras, vd.,2011a, Collado, vd., 2009)
Deniz yosunu, deniz yıldızları ve deniz suyundan oluşan bir karışımdan	<i>Arcobacter marinus</i>	(Kim,vd., 2010)
Midye ve yumuşakçalardan	<i>A. ellisii</i>	(Figueras, vd., 2011b)
Domuz dışkisından	<i>Arcobacter trophiarum</i>	(De Smet, vd., 2011)
Midye ve deniz tarağından	<i>A. bivalviorum</i> ve <i>A. venerupis</i>	(Levican, vd., 2012)
Kanalizasyondan	<i>Arcobacter defluvii</i> ve <i>Arcobacter cloacae</i>	(Collado, vd., 2011; Levican, vd.,2013)
Yaban domuzu ve domuzdan	<i>Arcobacter anaerophilus</i> ve <i>Arcobacter suis</i>	(Sasijyothsna, vd., 2013; Levican, vd., 2013)
Kabuklu deniz ürünlerinden ve deniz suyundan	<i>A. ebronensis</i> , <i>A. aquimarinus</i>	(Levican, vd., 2015)
Domuz ve süt sığır gübresinden	<i>A. lanthieri</i>	(Whiteduck-Léveillé, vd., 2015),
Tavuk kloak sürüntü numunelerinden	<i>A.valdiviensis</i>	(Collado ve ark.,2011)



Şekil 1.1. *Arcobacter* cinsine ait taksonomi.

Vandamme ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalar sonucunda *Campylobacter*'ler, *Eubacteria* grubu içinde yer alan *Protobacteria* sınıfındaki rRNA Süper familya VI'nın içine dahil edilmiştir. Bu familyanın üyeleri de aralarındaki filogenetik heterojeniteye göre üç farklı rRNA homoloji grubuna ayrılmıştır. İlk iki rRNA homoloji grubunu oluşturan *Campylobacter* ve *Arcobacter* cinsleri *Campylobacteriaceae* familyasına yerleştirilirken üçüncü grubu oluşturan *Helicobacter* bu familyaya dahil edilmemiştir (Vandamme, vd., 1991; Vandamme ve Goossens, 1992a; Ergüler, 2007).

1.5. *Arcobacter* Türleri

Arcobacter cinsine ait 22 tür tanımlaması yapılmış ancak yapılan yeni çalışmalar sonucunda *Arcobacter* cinsine 5 yeni tür daha eklenerek tür sayısının 27 olduğu bildirilmiştir. Bu türler Çizelge 1.4'de verildiği gibidir.

Çizelge 1.4. *Arcobacter* türleri.

Arcobacter Türleri		
<i>Arcobacter butzleri</i>	<i>Arcobacter molluscorum</i>	<i>Arcobacter defluvi</i>
<i>Arcobacter anaerophilus</i>	<i>Arcobacter bivalviorum</i>	<i>Arcobacter skirrowii</i>
<i>Arcobacter trophiarum</i>	<i>Arcobacter valdiviensis</i>	<i>Arcobacter ebronensis</i>
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	<i>Arcobacter cibarius</i>	<i>Arcobacter therius</i>
<i>Arcobacter nitrofigilis</i>	<i>Arcobacter venlerupis</i>	<i>Arcobacter suis</i>
<i>Arcobacter aqimarinus</i>	<i>Arcobacter clocae</i>	<i>Arcobacter lantieri</i>
<i>Arcobacter ellisi</i>	<i>Arcobacter marinus</i>	<i>Arcobacter mytili</i>
<i>Arcobacter halophilus</i>	<i>Arcobacter canalis</i>	<i>Arcobacter haliotis</i>
<i>Arcobacter pacificus</i>	<i>Arcobacter faecis</i>	<i>Arcobacter lekithochrous</i>

En yaygın görülen ve üzerinde en fazla çalışma yapılan türler arasında *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* ve *Arcobacter skirrowii* yer almaktadır.

1.5.1. *Arcobacter butzleri*

İlk olarak aerotolerant *Campylobacter* olarak tanımlanan *Campylobacter butzleri*, Vandamme ve ark. tarafından (1992a) *Arcobacter butzleri* olarak isimlendirilmiştir. *Arcobacter butzleri* ilk kez 1986 yılında ishal hastalığı olan iki aylık Rhesus cinsi maymunlardan izole edilmiştir. Bu çalışmada 8 izolat rapor edilmiştir (Vandamme, vd., 1992b; Doksanüçoğlu, 2006).

Arcobacter butzleri, insanlarda görülen enfeksiyonlarda en sık rastlanılan tür olarak tanımlanmıştır. *A. butzleri* türünün morfolojisine bakıldığında şeklinin biraz kavisli, helezon yapıda veya S biçiminde, spor oluşturmeyen, gram negatif, basil şeklinde olduğu belirtilmiştir. Uzunluğu 1-3.0 µm, genişliği ise 0.2-0.4 µm aralığındadır. Optimum üreme sıcaklığı 25-30 °C arasındadır. Kanlı agarda yarı şeffaf, beyaz ya da gri renkte koloniler meydana getirirler (Fernandez ve Jaramillo, 2016).

DNA baz kompozisyonu % 28-29 mol arasında değişmektedir. *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* ile % 40 oranında DNA benzerliği göstermektedir. 16s rRNA analizleri, *A. butzleri*'nin genetik olarak *A. skirrowii*'ye daha yakın olduğunu göstermiştir. Bu türe ait izolatların % 24'ünde 2, 3, 4 ve 8 kbp'lik dört farklı büyüklükte plazmid saptanmıştır (Mansfield ve Forsythe, 2000; Doksanüçoğlu, 2006). Yapılan çalışmalar *A. butzleri*'nin yaygın bir su

bakterisi olduğunu göstermektedir (Jacob, vd., 1993; Al Rashid, vd., 2000). *Arcobacter butzleri* domuz eti ve sağlıklı süt sığırlarından da izole edilebilir (Wesley ve Baetz, 1999).

Endüstrileşmiş ülkelerde insanların *A. butzleri*'ye maruz kalmalarındaki en önemli kaynak kontamine besinlerdir (Mauleon ve ark., 2006). Hastalığın insanların, diğer primatların ve bazı çiftlik hayvanlarının kontamine sulara maruz kalması sonucunda ortaya çıktığı, ayrıca *A. butzleri* ile kontamine olan iyi pişirilmemiş kanatlı ya da domuz ürünlerinin insanlarda hastalığa sebep olduğu tespit edilmiştir (Çelik, 2000; Mauleon ve ark., 2006; Hansen ve ark., 2007).

A. butzleri suşlarının antibiyotiklere karşı olan dirençliliği ile ilgili yapılan çalışmalar *A. butzleri* suşlarının, Cefuroximesodium ve Trimetophrim-sulphamethoxazol antibiyotiklerine karşı dirençli olduklarını göstermektedir (Abay vd., 2012).

A. butzleri türünün fenotipik tanımlamasında kullanılan testler kesin sonuçlar vermeyebilir. Bu nedenle cins ve tür belirlemek için PCR testleri tercih edilir. *A. butzleri* türünün izole edilmesi için mutlaka 24-48 saatlik bir ön zenginleştirme periyodunun gerektiği bildirilmiştir. İnkübasyon süresi 25-30 °C arasında 72 saate kadar aerobik ve mikroaerofilik ortamda uygulanabilir (Fernandez ve Jaramillo, 2016). *A. butzleri* türüne ait optimum pH değeri 6-7 arasındadır (İrkin ve Korukluoğlu, 2009).

Arcobacter butzleri, *Arcobacter skirrowii* ve *Arcobacter cryaerophilus* türlerinin hepatitenterit ve bakteriyemi ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (Lerner vd., 1994; On vd., 1995; Wybo vd., 2004). *A. butzleri*'nin domuz, at ve sığırlarda enterit ve ishal gibi hastalıklara sebep olabildiği, *A. skirrowii*'nin ise sığırlarda ve koyunlarda ishal ve hemorajikkolit'e neden olduğu belirtilmiştir (Vandamme ve ark., 1992b; Ho ve ark., 2006a).

1.5.2. *Arcobacter cryaerophilus*

Latince “soğuk havayı seven” anlamına gelir (Vandamme, vd., 1991). *Arcobacter cryaerophilus*, hayvan dışkılarından, mastitisli ineklerin sütleri ile insanlarda doku ve dışkılarından izole edilen bir türdür (Stampi, vd., 1993; Buller, 2014).

A. cryaerophilus ilk bulunan *Arcobacter* türü olduğundan, başlangıçta Aerotolerant *Campylobacter* olarak da adlandırılmıştır. Bu tür iki alt grup içermektedir: *A. cryaerophilus* alt grup 1 ve alt grup 2. Bu iki alt grup için DNA-DNA ve DNA-rRNA hibridizasyon çalışmaları yapılmış ve DNA baz kompozisyonlarının benzer olduğu belirlenmiştir. Bu iki alt grubun ayırt

edilmesinde protein yapıları ve yağ asitlerinin farklılıklarından faydalanılmaktadır (Savaşan ve Çiftci, 2003).

A. cryaerophilus 1995 de Güney Amerika'da sığır fetusundan izole edildi. Daha sonraları domuz fetusları ve üreme problemleri olan ineklerin uteri ve yumrularından izole edilmiştir (de Oliveria vd., 1999). Son yıllarda yapılan bir araştırmada ise, içme sularında görülen salgın hastalıklar sırasında Slovenya'da bazı hastaların dışkı örneklerinden de izole edildiği bildirilmiştir (Akıncioğlu, 2011). *A. cryaerophilus* 0.4-1.8 µm boyutlarında, sporsuz olduğu gözlemlenmiştir. S şekilli veya helikal şekildedirler. DNA baz kompozisyonlarının % 28-29 mol olduğu bildirilmiştir. Tek polar flagella ile aktif olarak yer değiştirme hareketi yapabilmektedirler. İlk izolasyonda mikroaerofilik ortama ihtiyaç duyarlar. Ancak aerobik, anaerobik ve mikroaerobik şartlar altında üreyebildikleri gözlemlenmiştir. Optimum üreme ısısı 30 °C'dir. Bazı suşlarda 5-40 °C arasında üreme saptanmıştır. Katı agarda 48-72 saat aralığında küçük, yaygın, sarı ya da bej renkte koloniler meydana getirirler.

1.5.3. *Arcobacter skirrowii*

Arcobacter cinsine ait patojenik özellikte olan türlerden birisidir (Aydın vd., 2007). Gram negatif, 1-3 x 0.2-0.4 µm boyutlarında helikal şekilli bakterilerdir. Kanlı agarda 36 saat inkubasyondan sonra gri, yassı, düzensiz şekilde, 2-3 mm çapında koloniler meydana getirirler. Kanlı agarda α-hemoliz gözlenir (Savaşan ve Çiftci, 2003). *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* ve *Arcobacter skirrowii*'nin karakteristik özelliklerinin karşılaştırıldığında DNase aktivitesi ve 37 °C'de üreme üç türdede gözlemlenirken, 42 °C'de üreme sadece *Arcobacter butzleri*'de gözlemlenmiştir. Sistinden H₂S üretimi *Arcobacter* türlerinin hiçbirinde gözlemlenmemiştir. Katalaz aktivitesi testi sadece *Arcobacter cryaerophilus* Alt grup 2'de negatif sonuç vermiştir.

Çizelge 1.5. *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* (Alt Grup 1 ve Alt Grup 2) ve *Arcobacter skirrowii*'nin karakteristik özelliklerinin karşılaştırılması (Savaşan ve Çiftci, 2003).

Karakteristik özellikler	<i>A. butzleri</i>	<i>A.cryaerophilus</i> Alt grup 1	<i>A.cryaerophilus</i> Alt grup 2	<i>A.skirrowii</i>
DNase aktivitesi	+	+	+	+
37 ° C'de üreme	+	+	+	+
42 ° C'de üreme	+	-	-	-
Mac ConkeyAgarda üreme	+	+	-	-
Sistinden H ₂ S üretimi	-	-	-	-
Katalaz aktivitesi	+	+	-	+
Nitrat redüksiyonu	+	-	-	+
% 1 glisinde üreme	+	-	-	-
% 1 oxgallda üreme	+	-	-	-
% 8 glukozda üreme	+	-	-	-
% 3.5 NaCl 'de üreme	+	-	-	-
% 0.04 TTC 'de üreme	+	-	+	-
% 1.5 NaCl 'de üreme	+	-	-	-
Duyarlılık				
Nalidiksikacid	S	S	S	S
Sefalotin	R	R	R	S

1.6. Epidemiyoloji

Arcobacterler, Gıda Mikrobiyolojik Şartlar Uluslararası Komisyonu tarafından gelişimini tamamlamaya devam eden patojenler olarak sınıflandırılmıştır. Bu güne kadar tespit edilen 27 *Arcobacter* türünden yalnızca 3 tanesinin insanları enfekte ettiği belirtilmiştir. Bu 3 türün ise; *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryarophilus* ve *Arcobacter skirrowii* olduğu bilinmektedir. İnsanlara, kontamine olmuş içme suları ve az pişmiş ya da çiğ olarak tüketilen yiyeceklerden bulaştıkları tespit edilmiştir. *Arcobacter* cinsi üyelerin, insanlardaki virülens özellikleri ve bağırsaklardaki kolonizasyonu hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır (Abeele vd., 2014).

Vandenberg ve ark. tarafından 2004 yılında yapılan çalışmanın sonucuna göre insanların dışkı numunelerinden izole edilen *Arcobacter spp.*'nin hastalığa eşlik eden en baskın türünün, *Arcobacter butzleri* olduğu bildirilmiştir. Houf ve Stephan, ise sağlıklı insanlara ait dışkılarıdaki *Arcobacter spp.*'nin varlığını ve özelliklerini incelemiş ve bu çalışmada örneklerin % 1.4'ünde *Arcobacter cryoaerophilus*'a rastlandığını bildirmiştir (Houf ve Stephan, 2007). *A. butzleri*, şiddetli ishal ve bakteremiye neden olabilen bir insan patojenidir. *A. butzleri*, insanlarda, mide bulantısı, kusma, karın ağrısı ve ateşin eşlik ettiği diyare hastalığına neden olur. *A. butzleri* 'nin karakteristik özellikleri ise, sulu ve kalıcı diyare atıklarıdır (Bucker vd., 2009).

Houf ve Stephan (2007), *A. cryoaerophilus* suşlarının HEp-2 hücrelerine ve insan kolon kanseri hücre hattı olan Caco-2 hücrelerine yapışma potansiyelini araştırmışlardır. Bu hücrelerin seçilmesindeki amaç bakteri ile insan hücreleri arasındaki etkileşimleri iyi tanınan ve sık kullanılan iki model olmasıdır. İzole edilen 7 suştan en az 4'ünün bir hücre hattına yapıştığı gözlemlenmiştir.

Arcobacter cinsi enfeksiyonların daha çok kümes hayvanları etlerinin çiğ tüketilmesinden ve iyi pişirilmeden yenilmesinden kaynaklanmaktadır. *Arcobacter* 'lerden kaynaklanan hastalıklarda, genellikle antibiyotik tedavisi olarak siproflaksin ve eritromisin gibi flurokinonlar kullanılmaktadır. Ancak bu ilaçlara karşı da direnç geliştirdikleri belirtilmektedir. *Arcobacter* enfeksiyonlarının genel olarak yaygın semptomları karın ağrısı, mide krampları ve kalıcı ishaldir. İnsan bağırsağında bulunan ayrıca endokardit, peritonit ve diyare türü rahatsızlık geçiren hastalardan da izole edilebilmiştir. Tayland ve İtalya'da ise okula giden bazı çocuklarda *Arcobacter* enfeksiyonlarına rastlandığı bildirilmiştir. Bazı *Arcobacter* türleri kirli sudan ve diyare görülen hastalardan izole edilmiştir (Rice vd., 1999; Fong vd., 2007; Kopilovic vd., 2008). *Arcobacter* kaynaklı çoğu enfeksiyonun *Campylobacter*'e bağlı zehirlenmeler ile benzer özellikler gösterdikleri de belirtilmektedir (İrkin ve Korukoğlu, 2009).

Arcobacter türleri diğer yandan insan ve hayvanlardaki epidemiyolojik rollerinden dolayı potansiyel zoonotik ajan olarak tanımlanmış (Ho vd., 2006; Cardoen vd., 2009;) ve *A. butzleri* en önemli gıda kaynaklı zoonoz olarak adlandırılmıştır.

Yapılan çalışmalar, *Arcobacter* suşlarının yüksek tuz (NaCl) konsantrasyonlarını tolere edebildiği, çok düşük buzdolabı sıcaklıklarında gelişim gösterdiği ve çeşitli tipteki yüzeylere bağlanabilme özelliğine sahip olduğu sonuçlarına ulaşılmıştır. İtalya'da bir okulda tekrarlayan karın kramp ağrıları salgınında *Arcobacter butzleri*'nin insandan insana bulaşabileceği

bildirilmiştir (Vandamme vd., 1992). Epidemiyolojik veriler *Arcobacter butzleri* ile enfekte olmuş 10 çocuk hastadan alınan gaita örneklerinden elde edilen bütün suşların aynı fenotip ve genotipe sahip olduklarını göstermiştir (Vandamme vd., 1993). Diğer bir insandan insana bulaşım ise *A. butzleri*'nin muhtemelen plasenta yolu ile enfekte olmuş yeni doğan bir bebekte görülmüştür (On vd., 1995).

Arcobacter'lerin hayvanlara ve insanlara bulaşma yollarından biri sudur (Ho vd., 2006). Ayrıca *Arcobacter*'ler, nehirler, göller, yer altı ve deniz suları ile aynı zamanda planktonlardan da elde edilmişlerdir (Collado, 2008). Dünya çapında yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* ve *A. skirrowii*'nin dışkı bulaşmış sularda, dışkı bulaşmamış sulara oranla daha yaygın olduğunu göstermektedir. *Arcobacter* türlerinin su ortamlarından izolasyonu sağlansa da bu bakteriler daha çok çiftlik hayvanlarının dışkılarında ve atıkların da gözlemlenmiştir.

Arcobacter türleri hayvan yetiştiriciliğinde kürtaj ve enteritten sağlanırken, insan enfeksiyonlarında ise enterit ve bakteremi ile ilişkilidir. İnsan ve hayvan hücre kültürlerinde yapılan in vitro deneyleri, birkaç *Arcobacter* türünün ökaryotik hücrelere yapışabileceği ve konakçı hücrelere zarar verecek toksinler üretebildiğini göstermiştir. Az sayıdaki in vivo çalışma ise, *Arcobacter* türlerinin patofizyolojisini ve patojenik potansiyelini aydınlatmak için gerçekleştirilmiştir (Wesley ve Miller, 2010).

Hayvanlarda *Arcobacter*'ler, bağırsak, plasenta ve fetüslerinden izole edilirken aynı zamanda sığırlarda mastitis salgınları sırasında çiğ süttten ve tavuk dışkısından da izole edilmiştir. *A. cryaerophilus*, Yeni Zelanda'da boğalarının sünet derilerinin yıkanmasıyla izole edilmiştir. *Arcobacter*, çok sayıda sağlıklı hayvandan da izole edilmiştir. *Arcobacter* türleri sığır, kuzu, domuz ve kümes hayvanı gibi hayvanların etlerinden elde edilen gıdalarda tespit edilmiştir (Lehner vd., 2005).

1.6.1. İnsanda *Arcobacter* türleri

Farklı ülkelerde yaşayan sağlıklı ve hasta insanlardan *Arcobacter* türlerinin izole edilebildiği bildirilmiştir (Vandamme vd., 1992; On vd., 1995; Wybo vd., 2004). *Arcobacter*'lerin insan enfeksiyonlarında düşük yaygınlık gösterdiği, bunun nedeninin ise uygun olmayan tiplleme ve tespit yöntemlerinden kaynaklandığı belirtilmektedir (Vandamme ve ark., 1993; Phillips, 2001a; Vandenberg ve ark., 2004).

Arcobacter butzleri, *Arcobacter skirrowii* ve *Arcobacter cryaerophilus* türlerinin hepatitenterit ve bakteriyemi ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (Lerner vd., 1994; On vd., 1995; Wybo vd., 2004; Lehner vd., 2005).

İnsan dışkılarından izole edilen en yaygın türlerden birinin *A. butzleri* olduğu belirtilmiştir. Aynı zamanda *A. butzleri*'nin bu yoldan elde edilen dördüncü *Campylobacter* benzeri tür olduğu da tespit edilmiştir (Vandenberg vd., 2004). *A. butzleri* kökenli enfeksiyonlar genellikle karın ağrısı, bulantı ve kusmanın yanı sıra daha şiddetli semptomların da ortaya çıkmasına neden olabilir (Vandamme vd., 1992; Vandenberg vd., 2004; Collado, 2010). Diğer bir tür olan *A. cryaerophilus* 'un ise diyare semptomlu insan dışkısından, yenidoğan bebek kanından ve bakteriyemi hastasından da izole edildiği bildirilmiştir (On vd., 1995; Lau vd., 2002). *A. skirrowii*'nin kaynağı tam olarak tanımlanamasa da yaşlı kronik ishali olan bir insandan ve Güney Afrika'da HIV virüsü bulaşmış insanlardan izole edilebilmiştir (Wybo vd., 2004).

Sağlıklı insanların dışkılarından farklı *Arcobacter* türlerinin izole edilebildiği bildirilmiştir. Örneğin, İsviçre'de yapılan bir çalışmada sağlıklı bireylerden izole edilen *A. cryaerophilus* (Houf ve Stephan, 2007) ve *A. butzleri*'nin sağlıklı insanlarda rastlanma sıklığının, *C. jejuni* türünden daha sık olduğu görülmüştür (Vandenberg vd., 2004). İnsanlarda görülen ilk vaka, Idaho'da bir kız izci kampında bulunan bireylerden % 81'ini etkileyen gastroenteritin oluşmasıdır. Burada görülen ana semptomlar kusma, bulantı, karın ağrıları ve ishaldir. Bu vakada *Arcobacterbutzleri* içme suyu kaynağı olan kuyu suyundan izole edilen tek mikrop olup, salgının kaynağı olarak düşünülmüştür. Bunun sebebi, kampın içme suyunun otomatik klorlama sisteminin bozuk olmasıdır. Bu yer altı kaynak sularından *Arcobacter butzleri*'nin belirlendiği ilk ABD raporudur (Rice vd., 1999). İkinci salgın ise Güney Bass Adası Ohio'da rapor edilmiştir ve çoklu orijin göstermesine karşın dışkılarından *Arcobacter* elde edilemeyip, dışkıyla kirlenmiş kuyu suyu örneklerinden izole edilmiştir. Son vakada ise *A. cryaerophilus* ve diğer farklı patojenler Slovenya'da içme suyu sisteminin yeni bir binaya bağlanmasından sonra oluşan kontaminasyonunun bir salgına yol açması sırasında hastalananların dışkı örneklerinden izole edildiği saptanmıştır (Fong vd., 2007; Kopilovic vd., 2008). Bununla

birlikte bu salgınların hiç birinde *Arcobacter*'in etiyolojik sorunlu bir ajan olduğu tam olarak ispatlanmış değildir.

A. butzleri en çok insan örneklerinden izole edilirken *A. cryaerophilus* nadiren insanlardan izole edilmiştir. İnsan bağırsağında bulunmazlar ancak bakteriyemi, endokardit, peritonit ve ishal gibi hastalıklarla karşılaşan hastaların bağırsaklarından izole edilebilmişlerdir. İnsanlar arasındaki bulaş yolu ağız-dışkı rotası şeklindedir.

Arcobacter türlerinin küresel açıdan insan sağlığı üzerine etkileri hakkında çok fazla bir bilgi elde edilebilmiş değildir. Bağışıklık ve yaş faktörlerinin, *Arcobacter* türlerinin yayılımı üzerine etkileri henüz ispat edilememiştir (Vandenberg vd., 2004; Kownhar vd., 2007). *Arcobacter* türlerine bağlı hastalıklar henüz önemli bir sorun olarak görülmemektedir. Bunun nedeni ise uygulanan tespit ve tanımlama yöntemlerinin yetersizliğidir. Bu konuda standart bir izolasyon yönteminin oluşturulması son derece önem arz etmektedir.

1.6.2. Tavuklarda *Arcobacter* türleri

Arcobacter türlerine en fazla kümes hayvanlarında rastlanmaktadır. Özellikle kümes hayvanları birden fazla türü barındırmakla kalmaz, aynı zamanda bazı türlerin çok yönlü genotiplerini de barındırır (Manke vd., 1998; Atabay vd., 2002; Houf vd., 2002). Kümes hayvanları ürünleri üzerine yapılan benzer çalışmalar, *Arcobacter*'lerin elde edilme oranları arasında farklı ülkelerde birbirinden farklı sonuçlara ulaşılmıştır. Kümes hayvanları karkaslarından % 90-97 oranlarında *A. butzleri* elde edilmiştir. Fransa'da incelenen kümes hayvanları karkaslarının % 81'inden *Arcobacter* türleri izole edilmiştir (Squinazi ve ark., 1995).

Atabay ve Corry (1998), süpermarketten alınan tavuk örneklerinde *A. butzleri* ve *A. cryaerophilus*, kesimhaneden alınan etlerden ise *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* ve *A. skirrowii* izole etmeyi başardıklarını belirtmişlerdir. Belçika'da yapılan bir çalışmada tavukların boyun derisinden ve broylerlerden alınan benzer örneklerde *Arcobacter* izole edilmiş, broyler göğüs eti örneklerinde ise *Arcobacter* ile kontamine olduğu belirlenmiştir (Houf, vd., 2001).

Atabay ve arkadaşları (2003) yaptıkları çalışmada, tavuk karkas örneklerini incelemişlerdir. İncelenen tavuk karkaslarından *A. butzleri* izole edilmiştir. Hollanda'da yapılan bir çalışmada (2008), tavukların gastrointestinal sistemlerinde *Arcobacter* prevalansı

araştırılmıştır. Yumurta tavuklarında ve broylerlerde değişen oranlarda *Arcobacter* tespit edilmiştir (Ho, vd., 2008). Rivas vd., (2004), 3 farklı bölgeden topladıkları kümes hayvanları örneklerinin % 73'ünden *A. butzleri* izole ettiklerini belirtmişlerdir. Anadut ve Gümüşsoy tarafından 2005 yılında yürütülen bir projede, Kayseri'deki 5 farklı satış noktalarından alınan 50 tavuk karkas örneklerinden *Arcobacter* izole edilmiştir. Yapılan bu çalışmanın amacı *Arcobacter*'lerin kontaminasyon oranını belirlemektir. Elde edilen veriler tavuk örneklerinin % 25'inden *Arcobacter* izole edildiği belirtilmiştir (Doksanüçoğlu, 2006).

Arcobacter'in hayvanlarda görülen en ciddi etkileri düşük, mastitis ve ishaldir. *Arcobacter* türleri genellikle hayvansal kaynaklı besinlerde tespit edilmiştir. Domuz, sığır ve kuzu etlerinde görülseler de genellikle en fazla tavuklarda buldukları tespit edilmiştir (Patyal vd., 2011). Çeşitli hayvanlardan elde edilen et örneklerinde en sık rastlanan *Arcobacter* türünün *A. butzleri* olduğu ve onu *A. cryaerophilus*'un izlediği tespit edilmiştir (Doksanüçoğlu, 2006). *A. skirrowii*'ye genellikle rastlanmamaktadır. Çünkü diğer türlere göre izole edilmesi daha zor olabilmektedir. *Arcobacter* türlerine tavuk etlerinde sıklıkla rastlanmakla beraber, bu hayvanların bağırsaklarında nadiren bulunurlar. Bunun nedeninin de etlere kesim esnasında diğer dış kaynaklardan bulaşmalar olduğu düşünülmektedir.

Tavuk etlerindeki *Campylobacter* türlerinin izolasyonu çalışmalarında sadece besiyeri ekimlerinin yeterli olamayacağı bildirilmiştir. Çünkü bu besiyerlerinde metabolik aktiviteleri çok daha hızlı ve üstün olan farklı tür bakterilerin de üreyebileceği dikkate alınmalıdır. Bu nedenle eğer besiyeri ekimi yapılacaksa, o zaman ortama istenmeyen türlerin üremesini engelleyecek antimikrobiyal maddelerin eklenmesi uygun olacaktır. Bu amaçla kullanılacak antimikrobik etkenlerin ise Kolistin, Basitrasin, Trimetoprim, Sefalotin, Sefazolin, Rifampisin, Novobiosin, Polimiksin ve Vankomisin gibi *Campylobacter*'lerin dirençli, diğer bağırsak bakterilerin ise duyarlı oldukları bilinen etkenler olabileceği vurgulanmıştır (Corry vd., 1995). Yapılan çalışmalar neticesinde, *Campylobacter* infeksiyonlarının en önemli kaynağının kontamine olmuş çiğ etler veya yetersiz pişirilmiş kanatlı etleri olduğu tespit edilmiştir (Jones vd., 1991; Hinton vd., 2004).

1.6.3. Sularda *Arcobacter* türleri

Arcobacter türleriyle ilişkili ishale neden olan faktörlerin en önemlisinin su olabileceği yapılan araştırmalar sonucunda belirlenmiştir. *Arcobacter* türlerinden *Arcobacter butzleri* içme su depoları (Jacob vd., 1993), nehir veya yüzey suları (Moreno vd., 2003; Diergaardt vd., 2004), yeraltı suları (Rice vd., 1999), kanalizasyon (Moreno

vd., 2003) ve kıyısal çevrelerdeki deniz suyundan izole edilmiştir. Yeni bir sülfid oksitleyici ototrofik bakteri olarak adlandırılan *Candidatus Arcobacter sulfidicus* türünün ipliksi kükürt ürettiği bildirilmiştir. Bu organizma, kültürü yapılmadan saptanmış olup, elde edilen örneklerin 16S rRNA gen dizileri ile analiz edilmiştir (Wirsen vd., 2002). Ayrıca istiridye, kanalizasyon, petrol sahası ve morina larva kültürü yetiştiriciliği ile ilişkili olarak birkaç yeni habitatın tespit edildiği de bildirilmiştir (Romero vd., 2002). *Arcobacter spp*'nin hayvanlara ve insanlara bulaşmasında su önemli bir rol oynar. İzmir'de yapılan bir çalışmanın amacı 115 farklı su örneğinden *Arcobacter spp.* izole ve karakterize etmektir. Toplanan 115 örnekten 24 adet kanalizasyon, 13 adet nehir ve 2 adet kaynak suyu olmak üzere 39 adet (% 33,9) *Arcobacter butzleri* varlığı tespit edildi. Bu çalışmanın sonucunda, çevresel su örneklerinde *Arcobacter spp.* saptanmıştır. Bu nedenle insan sağlığını korumak için önlemler alınmalıdır (Talay vd., 2016).

1.7. Bulaşma Yolları

Arcobacter cinsine ait türler daha çok kanatlı, sığır ve domuz eti gibi hayvansal orijinli besinlerden izole edilmektedir. *A. cryaephilus*, *A. skirrowi* ve *A. butzleri* çiğ ya da az pişmiş hayvansal orjinli besinlerin tüketilmesi sonucunda insanlara bulaşmaktadır. Genellikle tavuk etlerinde rastlanmaktadır ancak domuz eti ve sığır etinde de bulunur. *Arcobacter* türleri arasında kırmızı etten en çok *A. butzleri* ve *A. cryaerophilus* izole edilmiştir. *A. skirrowi* ise et örneklerinden düşük oranlarda izole edilmiştir. Bunun sebebi de *A. skirrowi*'nin etlerdeki prevalansının düşük olması ya da etkenin diğer iki türe göre etlerden izole edilmesinin daha zor olmasıdır (Ertaş, 2007).

İçme sularının önemli enfeksiyon kaynakları olması nedeni ile *Arcobacter*'ler bazı çalışmaların konusunu oluşturmaktadır. Klorlanmamış içme sularında *Arcobacter*'in 16 günden fazla canlılığını sürdürerek diyarelere yol açtığı, klorlama işlemi ile 5 dakika içerisinde yok olduğu belirtilmektedir. *A. butzleri* ve *A. cryarophilus* Almanya'da içme sularında, Tayland'da kanal sularında, İtalya'da ırmak sularında tespit edilmiştir (Akıncıoğlu, 2011). Zoonotik bir bakteri olarak kabul edilen bu bakteriler, hayvan veya hayvan dışkılarıyla doğrudan temasta bulunan insanlarda enfeksiyonlar için bir risk faktörü oluşturabileceği düşünülmektedir.

1.8. *Arcobacter* Cinsinin Patojenitesi ve Virülens Faktörleri

Arcobacter türlerinin patojenitesine bakıldığında yapışma, bakteri patojenitesinde önemli bir faktördür. Bu süreç enfeksiyonun oluşması için gerekli bir adımdır. Konakçı hücrelerin bakteriyel invazyonu ve bunu takiben hücre içi çoğalma ve diğer dokulara yayılımı sağlanır (Pizarro-Cerda ve Cossart, 2006). Konakçı hücre, yapışma sürecinde etkin bir role sahiptir (Lu ve Walker, 2001). Konakçı, bakteriyel invazyona yanıt olarak bağırsak epitel hücrelerinde hücre içi sinyallerin aktivasyonu için mukozal bir enflamatuvar cevaba yol açar. Bu durum, hastalık sürecinin gelişimini veya yokluğunu tanımlayan patojen/konakçı etkileşimidir (Lu ve Walker, 2001).

Arcobacter türlerinin konakçı hücrelere yapışması, invazyonu ve sitotoksik potansiyelini karakterize etmek için in vitro kültürleri kullanılarak çeşitli çalışmalar yapılmıştır. En sık gözlenen etkilerin sitotoksikite ve yapışma olduğu gözlemlenmiştir. Genel olarak, farklı çalışmalarda kullanılan suşların kaynağı ve hücre hatları ile bağlantısı önemli farklılıklar göstermektedir (Ho vd., 2007; Collado ve Figueras, 2011). Örneğin, sağlıklı insanlardan elde edilen 7 adet *A. cryaerophilus* suşları, Hep-2 ve Caco-2 hücrelerine yapışması bakımından test edildi. Yedi suşdan dördünün Hep-2 hücrelerine yapıştığı gösterilirken sadece ikisi Caco-2 hücrelerine yapışıyordu (Houf ve Stephan, 2007). Buna karşılık, diğer çalışmalarda, hayvanlar üzerinde test edilen tüm suşların Caco-2 ve IPI-2I hücrelerine yapıştıkları bildirilmiştir (Ho vd., 2007; Levican vd., 2013b). Ho ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan bu çalışma ile *A. cibarius*'un Caco-2 ve IPI-2I hücreleriyle *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* ve *A. skirrowii* suşlarına kıyasla önemli derecede güçlü bir hücre ilişkisi bulunduğu ve *A. cryaerophilus*'un her iki hücre hattını da istila edebilme yeteneğine sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Fallas-Padilla ve arkadaşlarının (2014) yaptığı bir çalışmada, Kosta Rika'nın perakende tavuk göğsü etinden izole edilen *Arcobacter* suşlarının farklı patojenik potansiyeli olduğunu gösterirken 32 farklı izolattan 24 (% 75)'ünün Hep-2 hücrelerine yapıştığı ancak sadece % 22'sinin yayılımcı olduğu ortaya çıkmıştır.

Levican ve arkadaşları (2013b) tarafından yapılan bir çalışmada bilinen 18 *Arcobacter* türünden elde edilen izolatların Caco-2 hücrelerine yapışma ve istila özelliği değerlendirilmiş, yalnızca *A. bivalviorum* ve *A. nitrofigilis* izolatu Caco-2 hücrelerine yapışma özelliği göstermemiştir. Her bir türün en az bir izolatu bu hücrelere yüksek oranda yapışmış olarak kabul edilmiştir (Levican vd., 2013b). Başarılı kolonizasyon ve enfeksiyon için konakçı hücrelere

yapışma ve istilanın gerekli olduğu göz önüne alındığında, birkaç *Arcobacter* türü potansiyel patojenler olarak düşünülmektedir.

A. butzleri için varsayılan virülens genlerinin yaygınlığı Levican ve arkadaşları (2013b) tarafından 15 farklı *Arcobacter* türlerinin virülens genotipinin değerlendirilmesi esnasında ortaya çıkmıştır. Araştırmacılar, *A. thereius*, *A. mytili* ve *A. cibarius*'un Caco-2 hücrelerini istila edememesi ve test edilen tüm virülens genlerinin olmaması (*ciaB*, *irgA*, *hecA*, *cj1349* ve *cadF*) arasında bir korelasyon oluşturdular (Levican vd., 2013b). Bu deneyden elde edilen veriler, istila ve virülens faktörlerle ilişkili genlerin varlığı arasında belirsiz bir ilişkinin olduğunu ve bu durumun istila sürecinde daha fazla genin rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Campylobacter ve *Arcobacter spp.*, insanlarda sık görülen gastroenterit nedenleridir. Bu enfeksiyonlar genellikle az pişmiş kümes hayvanlarından kaynaklanır. Ancak, virülans mekanizmaları hala tam olarak anlaşılammıştır. Jiribi ve arkadaşlarının (2017) yaptığı çalışmada *Campylobacter* ve *Arcobacter* türlerinde genotipik virülans belirteçlerinin varlığını PCR kullanarak değerlendirildi. Virülans ve sitoethalden farklı toksin (CDT) genlerinin prevalansı 71 adet *Campylobacter* izolatında incelendi. 37 adet *Campylobacter jejuni* ve 8 adet *Campylobacter coli* de dahil olmak üzere toplam 45 *Campylobacter* izolatı için spesifik primerleri kullanarak virülans genlerinin (*iam*, *cadF*, *virB1*, *flaA*, *cdtA*, *cdtB* ve *cdtC*) varlığını PCR ile saptandı. Tüm *Campylobacter* izolatları *cadF* geni için pozitif sonuç verirken *virB11* plazmid geni hiçbir suşta tespit edilememiştir. Yine aynı çalışmada dokuz *Arcobacter* virülans geninin (*cadF*, *ciaB*, *cj1349*, *mviN*, *pIdA*, *tlyA*, *irgA*, *hecA* ve *hecB*) varlığı, 22 adet *Arcobacter butzleri* ve 4 adet *Arcobacter cryaerophilus* izolatında kontrol edildi. *pIdA* ve *mviN* genlerinin baskın olduğu, ancak *TlyA*, *ciaB*, *cadF* ve *cj1349*, *IrgA* ve *hecA* ve *hecB* genlerinde düşük oranlarda olduğu tespit edildi. Bulgular, *Campylobacter* suşlarının çoğunun, insanlarda patojenik etkilere neden olabilecek bu olası virülans genlerine sahip olduğunu ortaya koydu (Jiribi vd., 2017).

Arcobacter, gıda ve su yoluyla bulaşan bir patojen olarak ortaya çıkmasına rağmen, diğer enterik patojenlerle karşılaştırıldığında *Arcobacter*'lerin patojenik mekanizmaları ve virülens potansiyeline ilişkin veriler halen eksiktir.

1.9. CDT

Sitoethal Distending Toksinleri (CDT), *Escherichia coli*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Haemophilus ducreyi*, *Shigella dysenteriae*, *Campylobacter* türleri, *Helicobacter* türleri ve *Salmonella enterica* gibi çeşitli gram negatif bakteriler tarafından üretilen

bir bakteri protein toksini familyasını oluşturmaktadır. CDT ve kommensal *E. coli* suşları tarafından üretilen bir hibrid peptid-poliketit genotoksini olan Colibactin, hedef hücrelerde DNA hasarına neden olan eşsiz karaktere sahip olduğu tanımlanan ilk bakteri genotoksinleridir (Nougayrede vd., 2006).

1.9.1. *Campylobacter* türlerinin CDT'si

Sitoletal distansiyon toksin aktivitesi, 72 saat süreyle CHO, HeLa, Vero ve HEP-2 hücreleri ile inkübe edilen *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. laridis* (Johnson ve Lior 1988a) ve *C. concisus* (Engberg vd., 2005) kültürlerde tespit edildi. Sitozol distansiyon toksini, *C. jejuni* suşlarında sık görülür. Bang ve ark. (2004) Danimarka'da yaptığı bir çalışmada hindilerden izole edilen 117 *C. jejuni* suşunu incelemiştir. Yapılan bu çalışmada CDT'nin aktivitesi, Vero hücreleri kullanıldığında suşların % 97.4'ünde pozitif, Colon 205 (allojenik insan kolon karsinoması) hücreleri kullanıldığında % 89.7'sinde pozitif ve tavuk embriyo hücre dizisi kullanıldığında ise suşların % 93.2'sinde pozitif sonuç verdiği gözlemlenmiştir.

Pickett ve ark. (1996), insanlardan izole edilen *C. jejuni* suşlarının insan *C. coli* suşlarına göre yüz kat daha fazla CDT ürettiğini bulmuşlardır. Benzer şekilde Eyigor ve ark. (1999), *C. coli*'nin tavuk suşlarının, *C. jejuni*'nin tavuk suşlarına kıyasla çok az toksin ürettiğini saptamışlardır. Buna karşılık, *C. coli*'nin domuz suşlarındaki CDT seviyesi, *C. Jejuni*'nin domuz suşlarındaki CDT seviyesine kıyasla daha yüksektir. İnsanlardan veya tavuklardan izole edilen *C. coli* suşlarının CDT seviyesinin, domuzdan izole edilen *C. coli* suşlarının CDT seviyesinden daha küçük olması, CDT üreten suşların özellikle domuza adapte olabileceğini düşündürmektedir (Bang ve diğerleri 2003).

Whitehouse ve ark. (1998), *C. jejuni*, CDT ile muamele edilen HeLa ve Caco-2 (insan kolon adenokarsinoması) hücrelerinin hücre döngüsünün G2 fazında bloke edildiğini ve M fazına girmediklerini göstermişlerdir. Hücrelerin % 90'dan fazlası muameleden 48 saat sonra hücre döngüsü tutuklamasını gösterdi. HeLa hücrelerinin, aktif olmayan tirozin fosforile Cdk1'i biriktirerek hücre döngüsünü durdurmaları döngünün M fazına ilerlemesi için gerekli olan siklin/Cdk1 kompleksinin defosforilasyonunun başarısızlığından kaynaklanmıştır (Whitehouse vd., 1998).

C. jejuni enfeksiyonlarının bağırsak mukozasının iltihaplanmasına bağlı olarak dışkıda, irin, mukus veya kan görülen akut enterik bir hastalık olan inflamatuvar ishal oluşturabileceği bildirilmiştir (Riley ve ark. 1995).

CdtB'nin öngörülen amino asit dizisi, proteinin DNase I proteinleriyle ilişkili olduğunu gösterdi. Safılaştırılmış CdtB proteininin kültürlenmiş hücelere mikroenjeksiyonu, CdtB proteininin çekirdeğin içinde lokalize edildiğini ve kromatin yapısında değişikliğe yol açtığını gösterdi. *C. jejuni* CdtB'sinin hücre çekirdeğinde lokalize olan ve DNA nükleer molekülünde çift sarmal kırılmalara yol açan bir DNaz I enzimi olarak davranan CDT holotoksininin toksik kısmı olduğu sonucuna varılabilir.

C. jejuni CDT'sinin, enfekte kişilerin diyare ve diğer gastrointestinal semptomların mikrobik indüksiyonunda rol oynayıp oynamadığı tam olarak bilinmemektedir (Purdy vd., 2000; Fox vd., 2004).

Hickey ve ark. (2000), bir inflamatuvar sitokini olan IL-8'in CDT ile işlemde geçirilmiş epitel hücreleri tarafından ortaya çıkarıldığını ve CDT zehirlenmesinin bu gastrointestinal sistemin iltihaplanmasının sebebi olduğunu belirtmektedirler. CDT'nin etkisinin villus epitel hücrelerini öldürmesi, dolayısıyla bağırsak epitelinin bariyer fonksiyonunu azaltması ve birlikte besin emilimini kaybetme olasılığı vardır (Whitehouse ve ark., 1998). Bu nedenle CDT, *C. jejuni* bağırsak enfeksiyonunun semptomlarının CDT üreten *E. coli*'ye benzer şekilde semptomlar göstermesinde rol oynamıştır.

1.9.2. *Arcobacter* türlerinin CDT'si

Arcobacter'lerin kümes hayvanları, su ve gastroenterit sergileyen insanlar da dahil olmak üzere çok sayıda farklı kaynaklarda bulunduğu bilinmektedir. *Campylobacter*, *Helicobacter* ve diğer türlerde Sitoletal Distending Toksin (CDT) üretimi, yapılan çalışmalarla belgelenmiştir. Kümes hayvanlarından, sığırlardan, sulama suyundan ve insan ishalinden elde edilen *Arcobacter* izolatlarında CDT genlerinin varlığını saptamak amacıyla Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) kullanılmıştır. Hücre filtratları ve sonik ekstraktlarından ve Çin Hamsteri Yumurtalığı, HeLa ve Intestinal 407 (INT407) hücrelerinden elde edilen izolatlarda CDT genlerinin varlığı incelenmiştir. HeLa ve INT407 hücrelerinde toksisite gözlenmiştir. *Arcobacter* sonik ekstraktları ile muamele edilmiş hücrelerin ve filtratların normal hücre döngüleri sergilediği saptanmıştır. Böylece, *Arcobacter*'lerin kültürdeki bazı hücrelerde toksik etki ürettiği gösterilmiş, ancak bu varlığın *Campylobacter* CDT'ninkinden farklı bir şekilde olduğu görülmüştür (Lee G. Johnson ve Elsa A. Murano, 2002).

Arcobacter butzleri ve *Vibrio spp.* suşlarının kültürün epitel hücrelerine yapışma ve sitotoksisiteyi indükleme kabiliyetini araştırmak amacıyla bir çalışma yapılmıştır. 17 adet

Arcobacter butzleri ve 10 adet *Vibrio spp.* olmak üzere toplamda 27 adet deniz izolatu, HEp-2 ve HeLa hattı hücrelerine yapışma kapasitesi açısından test edilmiştir. Daha sonra, bu suşların Vero hücrelerinde morfolojik değişiklikler üretebilen toksik faktörler salgılaması test edilmiştir. 17 adet *Arcobacter butzleri* suşlarından sadece altı tanesi her iki hücre hattına da yapışabilmiştir. *Vibrio alginolyticus* suşlarının % 57'si HEp-2 ve HeLa hücre hatlarına yapışabilmiştir. *Vibrio spp.* suşlarının hiçbiri toksik etki oluşturmamıştır. Bu çalışmada, *Arcobacter butzleri*'nin toksijenik ve yapışkan suşlarının su ortamlarından izole edilebildiği tespit edilmiştir (Carbone vd., 2003).

1.9.3. CDT'nin yapısı ve enzimatik aktivitesi

CDT, CdtA, CdtB ve CdtC' den oluşan üç proteini kodlayan bir operonun ürünüdür. Bu üç alt ünitenin tümü, holotoksinin tam aktivitesini sağlamak için gereklidir. Nesic ve arkadaşları tarafından *Helicobacter ducreyi* CDT' sinin (HdCDT) kristal yapısı çözülmüş ve holotoksinin üçlü bir kompleks yapıya sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. CdtA ve CdtC alt birimleri, bitki toksini risinin B-zinciri tekrarları ile yapısal homolojiyi paylaşan lektin tipi moleküllerdir. CdtB alt birimi, DNase I ailesinin dört katmanlı kabul ettiği katını benimser ve dış helisler ve sandwich için her iki tarafındaki ilmeklerin arasına yerleştirilmiş merkezi bir 12 telli sandwichtir. CdtB'nin kristal yapısı, memeli DNaz I'in aktif bölgesi ile korunmuş beş kalıntıyı paylaştığını, in vitro ve ökaryotik hücrelere ektopik olarak eksprese edildiğinde veya mikro enjekte edildiğinde, DNaz kapasitesine sahip olduğunu önceki veriler doğrular. Katalitik aktivite veya Mg₂⁺ bağlanması için korunan kalıntıda herhangi bir mutasyon, CdtB'nin DNA'yı in vitro olarak parçalama ve DNA hasar tepkilerini in vivo uyarma kabiliyetini ortadan kaldırır.

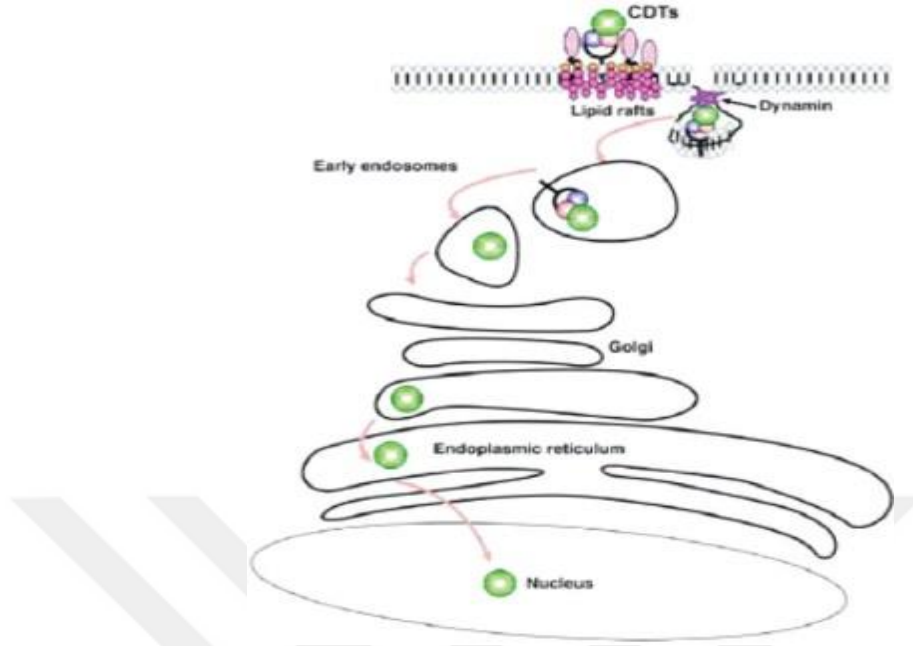
Üç alt birim, üç küresel protein-protein arayüzü (CdtA-CdtB, CdtA-CdtC ve CdtB-CdtC) içeren bir kompleks oluşturur. Ayrıca, CdtA ve CdtC alt birimleri, birbirleriyle ve CdtB alt birimi ile etkileşime giren amino ve karboksil terminalinde küresel olmayan amino asit uzantılarını sunar. CdtA ve CdtC alt birimlerinin oluşturduğu yüzeyde çok korunmuş iki yapı gözlemlenebilir. CdtA, sekiz iri yan zincirden oluşan büyük bir aromatik küme ve bu alt birimlerin yan yana yerleştirilmesinden oluşan derin bir oluk şeklindedir. Aromatik parçanın mutasyonları, üçlü kompleksin stabilitesini değiştirmez ancak toksinin, insan hücresi HeLa hattında hücre döngüsünü durmasına neden olma yeteneğini tamamen ortadan kaldırır. Bu durum reseptöre toksin bağlanmasının modüle edilmesinde önemli bir rol oynar. CDT, holotoksinin hedef hücrelerin plazma zarına bağlanması için CdtA ve CdtC'nin gerekli olduğu ve DNA lezyonlarını indükleyebilen aktif CdtB'nin girişine izin verdiği bir A-B2 toksini olarak kabul edilebilir.

Yapılan bir çalışmada, enzim bağlantılı immünolojik yapışma analizleri veya FACS analizi kullanılarak, *Campylobacter jejuni* (CjCDT), *E. coli* (EcCDT-II) ve AaCDT'den gelen CdtA ve CdtC altbiriminin, insan hücre hatları olan HeLa'nın veya U937 yüzeyine özgül bağlandığı gösterilirken CdtB' ye bağlanmadığı tespit edilmiştir. Bu durumun aksine, Di Rienzo ve arkadaşlarının yaptığı *A. actinomisetomcomitans* CdtA'sının, Çin hamster yumurtalık (CHO) hücrelerinin yüzeyine bağlandığı ama CdtC alt birimine bağlanmadığı saptanmıştır. Bu iki çalışmadaki tutarsızlık, kullanılan hücre tiplerinde yüzey moleküllerinin farklı profiliyle ilişkili olabileceğini düşündürdü (Lina Guerra vd., 2011). CDT holotoksininin biyogenezi hakkında çok az bilgi mevcuttur. CdtA ve CdtC'nin plazma membranındaki bağlanmaya nasıl katkıda bulunduğu hala net olmayıp, CDT reseptörünün doğası hala bilinmemektedir.

1.9.4. Hücre içine alma

CDT, hedef hücrenin çekirdeğinde etki ettiği bilinen ilk bakteriyel protein toksindir. Hücre içine almada, plazma zarına bağlanma, zehirlenme için bir ön koşuldur. Diğer birçok bakteri proteini toksinleri gibi, CDT 'de çekirdeğe ulaşmak için plazma zarını geçmelidir. İçselleştirme yolunda model olarak HdCDT, AaCDT ve EcCDT-II kullanılarak çalışılmıştır. HdCDT, HeLa hücrelerinde dinamine bağlı endositoz ile içselleştirilir, ancak bu proteinin RNA etkileşimi tarafından yok edilmesi, zehirlenmeyi önlemediğinden, klattrin gerektirmez.

CDT'nin bağlanması, yapı üzerindeki büyük miktarda lipit yığınlarının varlığına bağlıdır ve toksin, dinamine bağımlı endositoz yoluyla erken ve geç endozomlara içselleştirilir. CdtB alt birimi ayrıca Golgi kompleksine geçiş yapar ve daha sonra yavaş yavaş endoplazmik retikuluma (ER) taşınır. ER'den translokasyon, ER ile ilişkili bozulma (ERAD) yolağını ve protein açılmasını gerektirmez.



Şekil 1.2. CDT'nin hücre içine alınması (Lina Guerra, vd., 2011).

CDT'nin bağlanması bozulmamış lipid katlarının varlığına bağlıdır. Toksin, erken ve geç endozomlara dynamin-bağımlı endositoz yoluyla içselleştirilir. CdtB altbirimi, Golgi kompleksine de geçiş yapar ve daha sonra tersinir olarak endoplazmik retikuluma (ER) nakledilir. CdtB alt biriminin nükleer translokasyonun nasıl gerçekleştiği ise hala açık bir sorudur (Lina Guerra, vd., 2011).

1.9.5. Hücresel Tepkiler

DNA Hasarının Uyarılması

CDT'nin bir genotoksin olduğunu gösteren ilk çalışma, EcCDT-II ve CjCDT'deki CdtB alt birimi ile memeli DNaz I arasındaki homolojiye özgü ilişkiyi tanımlayan Elwell ve arkadaşlarının ve Lara-Tejero ve arkadaşlarının çalışmalarından kaynaklanmaktadır. 12 saatlik bir zaman diliminde hazırlanan EcCDT-II'nin, DNA plazmid substratını tamamen bozulduğu ve HeLa hücrelerinde belirgin bir kromatin bozulmasına neden olduğu, işlevsel bir homoloji ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Elwell, vd., 2000; Lara-Tejero, vd., 2000).

DNA Hasarı Tepkisinin Aktivasyonu

Genomu, endojen veya eksojen kaynaklardan oluşan DNA hasarına karşı korumak için, hücreler bir dizi karmaşık mekanizmayı aktive eder. Bu mekanizmalar, genomu onarmak ve

ölümcül veya kalıcı genetik hasar olasılığını en aza indirmek için harekete geçen DNA hasar yanıtları (DDR) olarak adlandırılır. DNA hasarına verilen hücresel tepki, hücre döngüsünün ilerlemesini geciktirebilen veya DNA replikasyonunu modüle edebilen ATM-Chk2 ve ATR-Chk1 olmak üzere iki farklı kinaz sinyal zinciriyle koordine edilen çok sayıda tamir mekanizması ve kontrol noktasını kapsar. DNA hasarına uzun süre maruz kalma, ATM-Chk2-p53 eksenini dahil olmak üzere DDR mekanizmasını kronik olarak aktive ederek hücre ölümüne veya hücre yaşlanma olarak bilinen uzun süreli bir hücre döngüsünün durma durumuna gelmesine yol açar (Smith vd., 2010). Bu yanıt, genomik istikrarsızlığın ve tümörün başlatılması ve ilerlemesine karşı uyarılabilir bir engel oluşturmaktadır. CDT'ye maruz kalan hücrelerin, hücre döngüsünün G1 veya G2 fazlarında durduğu ve hücre türüne bağlı olarak apoptozise uğradığı gösterilmiştir. Gelişmekte olan mayada yapılan genom analizlerinde homolog rekombinasyon (HR), DNA hasar kontrol noktasının aktivasyonu ve S-faz kontrol noktasının CdtB'ye verilen yanıt için gerekli mekanizmalar olduğu belirlenmiştir (Lina Guerra, vd., 2011).

Zehirlenmiş Hücrelerde Aktive Edilen Yaşam Sinyalleri

DNA'sı hasar gören hücrelerin yaşamları genomik instabiliteyi teşvik edebilir ve tümörün başlaması veya ilerlemesini destekleyebilir. CDT zehirlenmesi yanıtında hayatta kalma sinyallerinin karakterizasyonunu, CDT üreten bakteriler ile enfekte olmasının genomik instabiliteye ve dolayısıyla tümörün ilerlemesine katkıda bulunup bulunmayacağını anlamak için önemlidir.

DNA hasar kontrol noktası tepkilerinin sonucu olarak, hücreler hücre döngüsünün farklı evrelerinde tutuklanır ve DNA hasarını tamir etmede başarısız olması durumunda, apoptoz ile ölür veya yaşlanırlar (Lina Guerra, vd., 2011).

CDT ile Uyarılan Apoptoz

Epitelyal ve mezenşimal kökenli hücrelerin büyük çoğunluğu hücre döngüsünün farklı evrelerinde tutuklanırken, hücre ölümleri, zehirlenmeden 96 saat sonra görülen çok geç bir olaydır. HdCDT veya AaCDT'ye maruz kalan B ve T lenfositleri, apoptozu karşı daha hassastır (Cortes-Bratti vd., 2002).

CDT ile indüklenen hücre ölümü ile ilişkili moleküler mekanizmaların anlaşılmasını amaçlayan çalışmaların çoğu AaCDT'yi model olarak gerçekleştirilmiştir. Aktive edilmiş insan T lenfosit hücrelerinin AaCDT ile muamele edilmesi, kaspaz 8, 9 ve 3'ün aktivasyonuna neden olur ve DNA parçalanması 72-96 saat sonra tespit edilebilir (Shenker vd., 2001). Bu etkiler,

transmembran potansiyelinde azalma ve reaktif oksijen türlerinde artış gibi mitokondriyal değişikliklerle ilişkilidir (Lina Guerra vd., 2011).

1.9.6. Kolit ve inflamasyon bağlantılı kanser oluşumunda CDT'nin rolü

CDT üreten bakteriler, *C. jejuni* ve *Helicobacter hepaticus* da dahil olmak üzere gastroenterit ile ilişkilidir. Son on yılda, kronik inflamasyonun tümör gelişim riski ile ilişkili olduğu ve en iyi çalışılan modelin Kolorektal Karsinom (CRC) olduğu açıkça gösterilmiştir. Bakteriyel enfeksiyon durumunda, kalıcı inflamasyonun oluşturulması, konakçı genetik faktörlerle bağlantılı olarak hücre döngüsü ilerlemesinin ve apoptozun düzenlenmesine müdahale eden toksinlerin üretilmesi gibi çeşitli olayların genomik istikrarsızlığın kazanılması tümörün başlatılması veya ilerlemesine yol açar. Epidemiyolojik kanıtlar, artan tümör gelişim riski ile kronik bakteriyel enfeksiyonları arasında bir bağlantı olabileceğini saptamıştır.

Helicobacter pylori gastrik kanserler ile ilişkili olup Dünya Sağlık Örgütü tarafından tip I kanserojen olarak sınıflandırılmıştır. Diğer gastrik *Helicobacter* türlerinin, insanlardaki kronik hepatit, karaciğer karsinomu, kronik kolesistit ve kolanjiyokarsinoma gibi kronik karaciğer hastalıklarıyla ilişkili olabileceğine dair kanıtlar vardır. Kronik enfeksiyon ve inflamasyonda CDT'nin rolünü incelemek için birkaç hayvan modeli geliştirilmiştir.

Yetişkin şiddetli Kombine İmmün Yetmezlik (SCID) sahibi fareler *Campylobacter* türleri enfeksiyonlarına duyarlıdır. CdtB noksanlığı olan *C. jejuni* ile karşılaştırıldığında, orijinal tip CDT üreten suş ile enfekte edilmiş farelerde daha fazla bakteri pozitif numuneler tespit edilmiş ve bu da CDT'nin bakteri istilasını arttırdığını göstermektedir. Bununla birlikte, orijinal tip veya mutant suşlarla enfekte edilmiş farelerde enfeksiyon sonrası 7 günde bağırsak kolonizasyonu artmıştır. Ayrıca CDT, doğal olarak farelerin distal gastrointestinal yolunu enfekte eden enteropatojenik bir tür olan *H. hepaticus* tarafından da üretilir.

Bu veriler, CDT'nin enterik bakterilerin invazyonunu teşvik etmek ve kronik inflamasyon ile ilişkili olabilen proinflamatuvar yanıtları oluşturan virülens faktörü olduğunu kanıtlamaktadır (Lina Guerra vd., 2011).

1.10. Biyofilm

1.10.1. Biyofilm oluşumu ve yapısı

Biyofilm, bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polimerik yapıda jelsi bir tabaka içinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk olarak tanımlanır (Leone vd., 2006). Bakteriyel biyofilm kavramı 17. yüzyılda ilk olarak Antonie van Leeuwenhoek tarafından ifade edilmiştir. Antonie van Leeuwenhoek, kendi dışından kazıdığı plakları, kendi geliştirdiği ilkel mikroskobunda incelemiş ve bu gözlemlerindeki yapılara küçük hayvancıklar anlamına gelen "animalcules" adını vermiştir (Donlan ve Costerton, 2002). Herhangi bir yüzeye bağlı mikrobiyal yığılmaları tanımlamak için "Biyofilm" terimi ise ilk olarak Bill Costerton tarafından 1978 yılında kullanılmıştır. Biyofilmler, plastik, metal, toprak partikülleri, tıbbi implantlar, doku ve gıda ürünleri gibi her türlü yüzeyler üzerinde oluşabilmektedir (Kokare vd., 2009). Biyofilm oluşumu, insanlarda oluşan infeksiyonun devamlılığı ve tedavide karşılaşılan zorluklar açısından büyük bir öneme sahiptir. Biyofilm, planktonik yaşam tarzı ile karşılaştırıldığında yapısındaki bakteriler fizyolojik ve fenotipik özellikleri bakımından birbirinden farklılıklar gösterir. Biyofilm oluşturan bakteriler, olumsuz çevre şartlarına, konağın bağışıklık sistemine ve antibiyotiklere karşı oldukça dayanıklıdır (Hançer Aydemir, 2018).

Biyofilm oluşumu canlı hücrelerde veya cansız hücrelerin yüzeylerinde meydana gelebilir. Biyofilm oluşumunu etkileyen bazı faktörler vardır. Bunlar; nem miktarının fazlalığı ve besin maddelerinin ortamda bulunmasıdır. Bunun yanısıra biyofilmlerin oluşumuna ve gelişmesine, bakteri suşu, yüzey özellikleri, pH, besin miktarı, sıcaklık gibi çeşitli çevresel faktörler de etki etmektedir. Biyofilm hücreleri antimikrobiyal ajanlara karşı planktonik hücrelerden daha dirençli olup antimikrobiyal ajanlarla teması engelleyen ya da azaltan bariyere sahiptirler (O'Toole vd., 2000).

1.10.2. Biyofilm oluşum basamakları

Biyofilmin gelişim süresi taze besiyeri ortamı hazırlandığı süre boyunca devamlık gösterir. Ancak, ortamda bulunan besin maddelerin bitmesi ya da azalması durumunda yüzey bağlantıları zayıflar ve hücreler eski formlarına geri döner (Gün ve Ekinci, 2009).

Biyofilm oluşumu beş basamakta incelenebilir. İlk aşama hücrelerin yüzeye yakın mesafede dönüşümlü olarak tutunmasıyla başlar. Bu aşamada tutundukları yüzeyde yaşamlarını sürdürebilecekleri yeterli besinin olup olmadığını araştırırlar. Daha sonra hücre organelleri ile

yüzeve dipol-dipol etkileşimi, hidrofobik etkileşimler, iyon-dipol etkileşimi, iyonik ve kovalent bağlar ve hidrojen etkileşimleri sayesinde dönüşümsüz olarak tutunurlar. Yüzeve tutunan bakteri gelişir ve koloni oluşturmaya başlar. Zamanla bu mikrokolonilerin büyümesi ve yüksek yapılara dönüşmesi ile olgun biyofilm yapısı oluşur.



Şekil 1.3. Biyofilm oluşum basamakları (Temel ve Eraç, 2018).

Arcobacter türlerinin biyofilm şekillendirme yeteneği üzerine yapılmış sınırlı sayıda bilimsel yayın bulunmaktadır. Etkenin çeşitli çevresel faktörlere direnç göstermesinde biyofilm oluşumunun rolünün incelenmesi oldukça büyük bir öneme sahiptir.

Ferreira ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, farklı orjinli 43 *A. butzleri* izolatından 36'sında biyofilm oluşum testleri gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma ile atmosferin (mikroaerofilik veya aerobik) ve başlangıç OD'sinin *A. butzleri* üzerindeki biyofilm oluşumu değerlendirilmiştir. Mikroaerofilik koşullarda inkübe edilen, başlangıçta OD620 nm'de 0.2 konsantrasyon ile başlanılan 36 (% 72.2) *A. butzleri*'den 26'sı biyofilm oluşturmuştur. Yirmi bir (% 58.3) izolatın zayıf biyofilm oluşturduğu, diğer beş tanesinin (% 13.9) ise orta derecede biyofilm oluşturduğu bildirilmiştir (Ferreira vd., 2013).

2. TEŞHİS

2.1. İzolasyon

İzolasyon, izole etmek yani “ayırarak” anlamında kullanılır. Mikrobiyolojide izolasyon denilince genellikle koloni halinde bulunan mikroorganizmalardan sadece tek bir mikroorganizmanın saf halde elde edilmesi anlaşılır. Nitekim mikrobiyolojide izolasyona oldukça başvurulur. Sebebi ise mikroorganizmaların doğada saf halde bulunmaları oldukça güçtür. Bu yüzden çalışmalar da mikroorganizmalardan saf kültür elde edilme yoluna gidilir. Saf kültür ise tek bir mikroorganizma hücresinden diğer hücrelerin ayrılmasını sağlayıp sadece onun çoğaltılması anlamına gelir (Halkman, 2000).

Arcobacter’lerin ilk izolasyonu 1977 yılında domuz ve sığır fetuslarından spiroketler için kullanılan yarıkatı agarlarda yapılmıştır (Harmon ve Wesley, 1997). *Arcobacter*, mikroaerofilik ortamda 25 °C’de 5–7 gün inkübe edildikten sonra *Campylobacter*’lere benzeyen fakat hareket eden bakteriler olduğu karanlık saha mikroskopunda gözlenmiştir. Hareket halinde olmaları sebebiyle kültür membran filtre tekniğinden yararlanılmış ve bakterilerin 0,45 um çapındaki filtreden kanlı agar yüzeyine geçmesi sağlanmıştır. Daha sonra kanlı agar ise aerobik ortamda 25–30 °C’de 2–3 gün kadar inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonucunda oluşan *Campylobacter* benzeri kolonilerin aslında *Arcobacter* olduğu anlaşılmıştır.

Arcobacter’ler, *Campylobacter* türlerinin izolasyonu için kullanılan inhibitörlere karşı duyarlı olmaları sebebiyle *Arcobacter*’lerin izolasyonu için kullanılan besiyerlerinin bu inhibitörlerden arındırılmış olmaları gerekmektedir. Bu sebeple *Campylobacter*’lerin izolasyonunda kullanılan ortam ve metotların geliştirilmesi ile yeni formüller bulunarak *Arcobacter*’lerin izolasyonu kolaylaştırılmıştır (Aydın ve Atabay, 2001).

Arcobacter türlerinin izolasyonu için geliştirilmiş olan besiyerlerine örnek olarak *Arcobacter* Selektif Broth (ASB), *Arcobacter* Enrichment Broth (AEB), Cefoperazone Amfoterisin Teikoplanin (CAT) agar, Modified Charcoal Cefoperazone Desoxycholate Agar (mCCDA), Cefsulodin Irgasan Novonibosin (CIN) agar, Johnson ve Murano (JM) agar gibi besiyerleri verilebilir. Bu besiyerleri içerisinde tavuk karkaslarında *Arcobacter* ve *Helicobacter* türlerinin izolasyonu için en çok mCCDA ve CAT agarları tercih edilmektedir. Fakat CAT agarda *Arcobacter* türleri mCCDA’ya göre daha iyi ürettiği gözlemlenmiştir (Ertaş, 2007). *Arcobacter* türlerinin izolasyonu için kullanılan saplementler, kanatlı derisi ve göğüs etindeki mevcut

kontamine florayı tamamen inhibe etmesinden dolayı etkenin izolasyonunu kolaylaştırdığı için tercih edilmektedir (Houf vd., 2001a).

Gıdalardaki *Arcobacter*'lerin izolasyonu için kullanılan metotlar kanatlılardaki *Arcobacter* türlerinin sayısını belirlemek için kullanılmaktadır (Atabay ve Corry, 1998). *Arcobacter* türleri 30 °C'de aerobik ortamda inkübe edildikten sonra kanlı agarda oluşturdukları genel görünümüleri 2-4 mm boyutlarında gri-beyazımsı renkte koloniler şeklindedir. Yalnız koloniler birbirine kaynaşmış halde olabildikleri için koloni boyutları değişkenlik gösterebilmektedir. Günümüzde *Arcobacter*'lerin izolasyonu için kullanılmakta olan pek çok agar mevcuttur. Bunlardan CIN (Sefsulodin-Irgasannovobisin) agar, domuz etindeki ve diyare kişilerdeki *Arcobacter*'leri özellikle izole etmek için kullanılmaktadır (Rivas vd., 2004).

Son yıllarda izolasyon için zaman kaybını azaltmak amacıyla çok hızlı analiz yöntemlerine ihtiyaç duyulmuştur. Bu sebeple Johnson ve Murano tarafından geliştirilmiş olan ve JM formülasyonu olarak da bilinen yöntemde; katı besiyerine % 0.05 tiyoglikolik asit, % 0.05 sodyum piruvat, % 5 koyun kanı ve 32 mg/l sefoperazon ilave edilip besiyerinin pH değeri de 6.9'a sabitleyerek bu ortamda *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* ve *A. nitrofigilis* kolonileri baskın bir şekilde ortaya çıktığı görülmektedir. Böylelikle JM yöntemi ve Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) doğrulaması ile birlikte izolasyon sürecini 4 güne indirmenin mümkün olduğu bilinmektedir. Tavuk etlerinde ise *Arcobacter*'leri izole etmek amacıyla *Arcobacter* sıvı besiyeri ve ticari olarak temin edilebilen sefoperazon, amfoterisin B ve teikoplanin bileşimlerinden oluşan CAT supplementleri kullanılmaktadır. Geliştirilmiş multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyon (m-PCR) yönteminin *Arcobacter* türlerinin tanımlanmasında ki önemi ise yadsınamayacak düzeydedir (İrkin ve Korukluoğlu, 2009).

Arcobacter izolasyonunda bir başka yöntem membran filtrasyon tekniğidir. Membran filtrasyon tekniğinde *Arcobacter*'lerin hareket kabiliyetleri ön plana çıkmaktadır. Bu yöntem ile *Arcobacter*'ler hareket ederek membran filitreden geçerken ortamda bulunan diğer mikroorganizmaların geçişini engeller ve bu şekilde izolasyonu kolaylaşır (Collins vd., 1996; Tazegül, 2010).

İnsanlar için patojenik etki gösteren *Arcobacter* türlerinin insan dışkı örnekleri, *Campylobacter* türlerinin izolasyon tekniğine göre belirlenmiştir. Bir çok araştırma *Campylobacter* ve *Arcobacter*'lerin aynı ortam üzerinde farklı düzeylerde üremelerinin, etkenlerin selektif besiyerlerindeki antimikrobiyal ajanlara olan duyarlılıkları ile bağlantılı olduğu

sonucuna varmıştır (Atabay ve Corry, 1998; Houf vd., 2001a,b; Corry ve Atabay, 2001; Atabay vd., 2002; Long ve Phillips, 2003).

2.2. İdentifikasyon

İdentifikasyon, izole edilmiş bir mikroorganizmanın cins ve tür olarak tayininin yapılmasıdır. İdentifikasyon genel olarak üç aşamadan oluşmaktadır. Bunlar morfolojik ve fizyolojik özelliklerin belirlenmesi, biyokimyasal testlerin veya serolojik testlerin yapılmasıdır. Elde edilen bulgular "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" gibi temel kaynaklarda verilen sonuçlarla karşılaştırılarak bir sonuca ulaşılır. Bakteriler genel olarak morfolojik ve fizyolojik karakterlerine göre sınıflandırılırlar. Oksijene duydukları ihtiyaç, karbonhidratlar arasında özellikle glikozu kullanma durumları identifikasyon aşamasında önemli bir rol oynar (Halkman, 2000).

2.2.1. Fenotipik Tanı

Arcobacter türleri *Campylobacter* türlerinden düşük sıcaklıkta ve oksijenli ortamda üreyebilme özelliği ile ayrılır. Ancak *Campylobacter* türlerine benzer morfolojiye sahip olmaları ve fenotipik ve kimyasal testler sonucunda suşların değişkenlik göstermesi bu iki cinsin ayırt edilebilmesini zorlaştırmaktadır (Collado ve Figueras, 2011).

Oksidaz, katalaz, üreaz, nitrat redüksiyonu, indoksil gibi biyokimyasal test sonuçlarında görülen değişkenlikler tür tayini yapılmasının güvenilirliğini azaltmaktadır.

2.2.2. Moleküler Tanı

Fenotipik tanılamada net bir teşhisin yapılamaması *Arcobacter* türlerinin tanımlanmasında yeni yaklaşımların keşfine zemin hazırlamıştır. 16S RNA geni ve 23S rRNA genlerini hedef alan klasik PCR tabanlı teknikler, *Arcobacter* türlerinin tespiti ve tanımlanmasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Abdelbaqi vd., 2007).

PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PCR tekniği hedef DNA'nın kopyalanması ve çoğaltılmasıdır. Mekanizması yüksek sıcaklığa dayanıklı bir DNA polimeraz enzimi kullanılarak DNA replikasyonunun in vitro ortamda tekrarlanarak çoğaltılmasıdır. DNA polimeraz enzimi yüksek sıcaklığa dayanıklı olan *Thermus aquaticus* isimli bakteriden elde edilmiştir.

PCR oluşum mekanizması

1.Denatürasyon: Bu evre DNA molekülünün çift zincirli yapısı yüksek ısı ile muamele edilerek birbirinden ayrılır.

2.Annealing (Hibridizasyon): Düşük sıcaklıkta oligonükleotid primerlerinin kendi eşleniklerinin bulunduğu tek zincirli DNA üzerine bağlanmasıdır.

3.Extensiyon (Polimerizasyon): Bu evrede Taq polimeraz enziminin ideal çalışma sıcaklığı 72 °C'dir. Bu sıcaklıkta primerler uzar ve tamamlayıcı zincir sentezi olur.

Multiplex PCR (mPCR)

Multiplex PCR ile daha az zamanda daha çok hedef bölge amplikasyonuna ulaşıldığı için tür tayini için oldukça kullanışlı bir yöntemdir (Çaphan, 2007).

Arcobacter spp.'yi tür düzeyinde tanımlamak için geliştirilen DNA tabanlı testler, ribozomal RNA genlerinin küçük veya büyük alt birimlerini hedef alır. *Arcobacter* türlerinin sayısının gittikçe artış göstermesi ile Doudah ve ark. (2010) tarafından 16S ve 23S RNA genlerini incelemek amacıyla bir çalışma başlatılmış ve bu çalışma ile türlere özgü primerlerin belirlenmesi ve mPCR analizlerinin geliştirilmesi hedeflenmiştir (Doudah vd., 2010). Son yıllarda, *Arcobacter spp.*'nin hızlı ve spesifik tanımlanması için DNA tabanlı tahliller oluşturularak, 16S ve 23S rRNA genlerini hedefleyen multiplex PCR sistemleri ile eş zamanlı tanımlama sağlanmıştır. Atabay ve ark. SDS-PAGE yöntemini kullanarak *A. butzleri*'nin tür düzey tanımlamasını yapmıştır (Lehner vd., 2005).

Pentimalli ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma ile tavuk etinde *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, *Arcobacter skirrowii* ve *Arcobacter cibarius*'un varlığının tespiti için türe özgü primerler kullanılarak zenginleştirici bir PCR testi geliştirilmiştir. *Arcobacter cryaerophilus*, *Arcobacter skirrowii* ve *Arcobacter cibarius* için geliştirilen primerler, sırasıyla 212, 257 ve 145 bp'lik nükleik asit fragmanlarını büyütme için *gyrA* genine dayalı olarak tasarlanmıştır. *Arcobacter butzleri*'ye özgü primerler, 16S rRNA genindeki 203-bp DNA fragmanını çevreleyecek şekilde dizayn edildi. Dört primer çiftinin özgüllüğü, *Arcobacter* türü, ilgili *Campylobacter*, *Helicobacter* türleri ve diğer gıda bakterilerinin DNA'sı PCR analizi ile değerlendirildi. Geliştirilen yöntemin uygulanabilirliği, daha sonra 42 tavuk etinin PCR analizinde test edilmesiyle doğrulandı. Analiz edilen perakende tavuk numunelerinin % 85.7'sinde *Arcobacter spp.*'nin varlığını ortaya çıkardı. Numunelerin % 50'sinde *Arcobacter*

butzleri, numunelerin % 35.7'sinde hem *Arcobacter butzleri* hem de *Arcobacter cryaerophilus* saptandı. *Arcobacter skirrowii* ve *Arcobacter cibarius*, incelenen tavuk örneklerinin hiçbirinde tespit edilmedi. Geliştirilen PCR testi, tavuk etinde *Arcobacter* kontaminasyon araştırması için spesifik ve hızlı bir alternatiftir (Pentimalli, vd., 2008).

Real- Time PCR

Real Time PCR floresan boyalar yardımıyla elde edilen, gerçek zamanlı olarak DNA'nın belirlenmesi ve miktarının gösterilmesi tekniğidir. Floresan sinyali PCR ürün miktarıyla doğru orantılı olarak artmaktadır. Real-Time PCR'da elektroforez aşaması yoktur. Amplifikasyon ürünleri kullanılan probler sayesinde eş zamanlı olarak bilgisayar ekranında gözlemlenir.

2.2.3. Genotiplendirme

İdentifiye edilmiş suşların birbirinden ayrılması, bulaş yolları ve yol açtıkları enfeksiyonları incelemek amacıyla yapılmıştır. Genotiplendirme için çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Bu yöntemler; ERIC-PCR, AFLP, RAPD-PCR, PFGE, MLST'dir.

ERIC-PCR (Tekrarlayan Enterobakteriyel Intergenik Konsensüs)

Enterobakteriyel tekrarlanan interjenik palindromik konsensus (ERIC); 124-127 baz çiftlik, ve merkezi korunmuş palindromik yapıya sahip sekanslardır. ERIC dizilerinden kaynaklanan primerlerle yapılan PCR kolay uygulanabilmesi, çok sayıda izolat ile çalışılabilmesi, ayırt ediciliğinin yüksek olması nedeni ile en yaygın kullanılan moleküler tiplendirme yöntemlerinden biridir (Oral, 2010).

ERIC sekansları, ilk kez *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae* yanı sıra 28 *Enterobacteriaceae*'nin diğer üyeleri de tanımlanmıştır (Sharples ve Lloyd 1990; Hulton, Higgins ve Sharp 1991). ERIC sekansı 127 baz çiftlik bir palindrom olarak belirtilmiştir. Aynı zamanda hem internal delesyonlarından üretilen daha kısa sekansları hemde yaklaşık 70 baz çiftinden daha uzun sekanslara sahip olduğu bildirilmiştir. ERIC dizisinin kopya sayısı türler arasında değişkenlik göstermektedir. Örneğin; *E. coli* K-12 de yaklaşık 30 kopya bulunurken, *S. enterica typhimurium* LT2'de 150 kopya olabileceği tahmin edilmektedir (Altındal, 2015).

AFLP (Amplifiye Parça Uzunluk Polimorfizm Analizi)

İki enzim ile genomik DNA'nın sonuna özel bağdaştırıcılarla fragmentlerin bağlanması ve ardından bağlayıcı dizilerine tamamlayıcı primerlerle fragmentlerin çoğaltılması esasına

dayanır. Bant görüntülemesi konvansiyonel jel elektroforez ile gerçekleştirilebilir. Bu yöntemin en kısıtlayıcı tarafı hedef DNA'nın diğer DNA'lar tarafından kirlenmemesi gerektiğidir (Yıldırım vd., 2011).

RAPD-PCR (Rastgele Amplifiye Edilen Polimorfik DNA)

RAPD-PCR olarak da bilinen RAPD yöntemi, tek kısa primerleri kullanarak bilinmeyen genomik bölgelerin rastgele yükseltilmesine dayalıdır. Bu yöntemde Klasik PCR analizinin aksine, amplifiye edilecek genomik bölge bilinmiyor ve amplifikasyonlar primer sekansları tamamlayıcı pozisyonlara bağlıdır. Mutasyonların olması durumunda amplikasyon işlemi yapılmaz. RAPD-PCR ile çoklu lokasyonda üretilen farklı büyüklükteki ampiklonlar, agaroz jelinde farklı bant görüntülenebilir (Yıldırım vd., 2011).

PFGE (Pulsed-Field Jel Elektroforezi)

DNA molekülleri DNA'nın boyutuna bağlı olarak konvansiyonel sabit elektrik alanında ayrılabilir. 20 kb'den daha büyük DNA parçaları, bir jel boyunca aynı hareketliliği gösterir ve sabit elektrik akımı altında boyutu bağımsız bir şekilde birlikte hareket eder. Daha büyük DNA moleküllerini ayırmak için bu yöntem tercih edilir. Bu yöntemin amacı, RE'lerin kullanılması ile büyük DNA fragmentleri oluşturmaktır. Epidemiyolojik ve çevresel araştırmalarda yaygın olarak kullanılan PFGE'nin DNA yoğunluğu, jelde agaroz miktarı, uygulanan voltaj ve jel sıcaklığı gibi çeşitli sınırlamaları vardır (Yıldırım vd., 2011).

MLST (Multilokus Dizi Tiplendirme)

Bakteri kromozomu üzerinde bulunan dizilerin sayısına dayanan verileri sağlayan bir genotipleme yöntemidir (Yıldırım vd., 2011). Bakterilerin mutasyona uğramayan genlerinde görülen farklı yapıların listelenmesi yaklaşımı MLEE (Multi-Locus Enzyme Electrophoresis, Çoklu-Lokus Enzim Elektroforezi) yöntemiyle saptanmıştır. Her ne kadar MLEE küresel bakteriyel epidemiyolojide önemli bir rol üstlenmiş olsa da teknik olarak elverişsizdir. Farklı laboratuvarlarda elde edilmiş sonuçların karşılaştırılması da zordur. MLST yaklaşımı, korunan çoklu gen lokuslarındaki farklılıkları hedeflemede MLEE'nin gösterdiği başarıya dayanmaktadır. Bununla beraber bu farkın MLST ile kesin olarak tanımlanması, gen kesitlerindeki nükleotid dizilimlerinin saptanmasıyla mümkün kılınmıştır (Çetinkaya ve Ayhan, 2012).

Bu çalışmada Kütahya bölgesinde ticari olarak tüketime sunulan tavuk etlerinde *Arcobacter* türlerinin varlığı araştırılmıştır. İzole edilen *Arcobacter* türleri moleküler olarak tür

düzeyinde tiplendirilmiş ve Sitoletal Distending Toxin (CDT) varlığı ve biyofilm oluşturma özellikleri incelenmiştir. Çelenk, (2017) tarafından yapılan çalışma sonuçları ile bu çalışma sonuçları birleştirilmiş ve izole ve tanımlanmış bazı *Arcobacter* türlerinin *Campylobacter* türleri ile birlikte bulunma olasılıkları, biyofilm oluşturma kapasiteleri ve iki tür arasında CDT geni açısından horizontal gen transferi olasılıkları değerlendirilmiştir.



3. MATERİYAL

3.1. Numuneler

Arcobacter suşlarının izolasyonu ve *Arcobacter* suşlarında saptanacak olan Sitolethal Distending Toxin (CDT) varlığının araştırılması amacıyla 22-24 Haziran 2016 tarihleri arasında başlattığımız bu çalışmamız için Kütahya ilinde ki çeşitli gıda sektörlerinde perakende satışı yapılan noktalardan 34 adet tavuk örnekleri (bütün tavuk, göğüs, but, kanat) satın alındı. Tavuk örneklerinin toplanmasında farklı zamanlarda, farklı markalardan ve pazarlardan örnekleme yapılmasına özen gösterildi. Bu şekilde satın alınan tavuk örnekleri steril bir şekilde laboratuvara taşınıp deney sürecine başlandı.

3.2. Besiyerleri

***Arcobacter* Enrichment Broth (AEB)**

Arcobacter cinsi için ön zenginleştirme olarak tercih edilen *Arcobacter* Enrichment Broth (AEB) 'un dış görünümü sarı renkte, katı halde ve toz şeklindedir.

CAT Saplement Hazırlanışı

Steril olması açısından ateş başında açtığımız saplement içerisine mikropipet kullanarak 4 ml steril distile su ilave edip homojen görünüm elde edinceye kadar karışımı sağlandı. Daha sonra AEB besiyerinde kullanılmak üzere saplement hazır hale geldi.

***Arcobacter* Enrichment Broth (AEB) Hazırlanışı**

500 ml'lik bir erlen içerisinde *Arcobacter* Enrichment Broth (AEB) besiyerinden 6 gram tartılarak 250 ml distile su ile çözdürme işlemi yapıldı. Bunun üzerine 121 °C'de otoklav da sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Hazırladığımız besiyerini önce 50 °C'ye kadar soğuttuktan sonra içerisine ön zenginleştirme için hazırladığımız 4 ml'lik CAT saplementten ilave edildi. Daha sonra ise elde ettiğimiz besiyeri steril cam pipet kullanarak 4,5 ml'lik steril tüplere eşit şekilde pay edildi ve zenginleştirme için besiyeri kullanıma hazır hale geldi.

Blood Agar Base

Arcobacter cinsinin üreme ortamı olarak en uygun besiyeri için Blood Agar Base tercih edilir. *Arcobacter* bu besiyeri üzerinde çoğunlukla beyaz, bej veya renksiz koloni oluştururlar. Blood Agar Base dıştan bakıldığında bej renkte, katı ve toz halindedir.

Blood Agar Base Hazırlanışı

1000 ml'lik bir erlen içerisinde Blood agar besiyerinden 20 gram tartılıp 500 ml distile su ile çözdürme işlemi yapıldı. Bunun üzerine otoklav yardımıyla 121 °C'de sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra hazırlanmış olduğumuz karışım 50 °C'ye kadar soğutma işleminden geçtikten sonra içerisine % 5 defibrine koyun kanı eklendi. Ve karışımın homojenize olması sağlandı. Son olarak da steril petri kaplarına 25'er ml olacak şekilde pay edildi. Bu haldeyken petrilere dokunmayıp olduğu şekilde donması sağlandıktan sonra petrilere ters çevrilerek 1 gece oda sıcaklığında beklemeye alındı. Bu şekilde yapılmasının sebebi ise ısı dolayısıyla oluşan buharın petri tavanına damlacık yapması sonucu bu damlacıkların tekrar besiyeri içerisine karışma ihtimalini önlemektir. 1 gece oda sıcaklığında bekletmiş olduğumuz besiyerleri artık kullanıma hazır hale gelmiş olup deney sürecinde işleme alınmaya kadar +4 °C'de muhafazası sağlanır.

Mueller Hinton Broth (MHB)

Arcobacter cinsinin bu besiyeri üzerinde üreme durumunu göstermesi bulanıklık oluşturmaktadır.

Mueller Hinton Broth (MHB)'un dıştan görünümü açık sarı renkte katı ve toz şeklindedir.

Mueller Hinton Broth (MHB) Hazırlanışı

500 ml'lik erlen içerisinde Mueller Hinton Broth besiyerinden 4,5 gram tartarak 200 ml distile su yardımıyla çözdürme işlemi yapıldı. Bunun üzerine sterilizasyonu için 121 °C'de otoklavlandı. Daha sonra hazırlanmış olduğumuz besiyeri 5'er ml olacak şekilde steril tüplere pay edildi. Bu şekilde elde ettiğimiz besiyeri deney sürecinde kullanılmak üzere +4 °C'de muhafazası sağlandı.

% 15 Gliserinli TSB (Tryptic Soy Broth)

Tryptic Soy Broth'un dıştan görünümü koyu sarı renkte katı halde ve toz şeklindedir.

% 15 Gliserinli TSB (Tryptic Soy Broth) Hazırlanışı

200 ml'lik bir erlende Tryptic Soy Broth'tan 3 gram tartarak 85 ml distile su yardımıyla çözdürme işlemi yapıldı. Bu işlemden sonra besiyerinin 100 ml'ye tamamlanması için üzerine 15 ml de gliserin ilave edildi. 100 ml'ye tamamladığımız bu karışımın homojen olması için mikrodalga fırından faydalandı. Elde ettiğimiz homojen karışım yani % 15 Gliserinli Tryptic

Soy Broth 1 ml'lik olan ependorflara pay edildi. Hazırlanmış olduğumuz besiyerinin sterilizasyonu için 121 °C'de otoklavlanma işlemi gerçekleştirildi. Bu şekilde elde ettiğimiz % 15 Gliserinli Triptic Soy Broth deney sürecinde kullanılmak üzere -20 °C'de muhafazası sağlandı.

Moleküler tanı primerleri

Arcobacter türlerinin moleküler tespiti için kullanılan primerlerin ve CDT genlerinin varlığının moleküler tespiti amacı ile kullanılan primerlerin oligonükleotid dizileri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan primerlerin oligonükleotid dizileri hedef bölgeleri ve baz büyüklükleri (Houf, 2000; Asakura, 2008).

Primer	Oligonükleotid Dizileri (5'-3')	Tespit edilen tür ve hedef genler	Bant büyüklükleri (bp)
ARCO	CGTATTCACCGTAGCATAGC		
BUTZ	CCTGGACTTGACATAGTAAGAATGA	<i>A. butzleri</i>	401
CRY1	TGCTGGAGCGGATAGAAGTA	<i>A. cryoaerophilus</i>	257
CRY2	AACAACCTACGTCCTTCGAC		
SKIR	GGCGATTTACTGGAACACA	<i>A. skirrowii</i>	641
CjspAU2	AGGACTTGAACCTACTTTTC	<i>C. jejuni cdtA</i>	631
CjspAR2	AGGTGGAGTAGTTAAAAACC		
CespAU1	ATTGCCAAGGCTAAAATCTC	<i>C. coli cdtA</i>	329
CespAR1	GATAAAGTCTCCAAAACCTGC		
CjSPBU5	ATCTTTTAACTTGCTTTTGC	<i>C. jejuni cdtB</i>	714
CjSPBR6	GCAAGCATTTAAAATCGCAGC		
CeSPBU5	TTTAATGTATTATTGCCGC	<i>C. coli cdtB</i>	413
CeSPBR5	TCATTGCCTATGCGTATG		
CjspCU1	TTTAGCCTTTGCAACTCCTA	<i>C. jejuni cdtC</i>	524
CjspCR2	AAGGGGTAGCAGCTGTAA		
CespCU1	TAGGGATATGCACGCAAAG	<i>C. coli cdtC</i>	313
CespCR1	GCTTAATACAGTTACGATAG		

3.3. PCR Testi İçin Kullanılan Malzemeler

Multiplex PCR İçin Kullanılan Malzemeler

Taq DNA Polimeraz Seti (Arktik™ Thermal Cycler - Thermo Scientific)

1.5 U Taq polimeraz

5 ul 10X PCR tamponu

0.2 mM dNTP karışımı

1.25 mM MgCl₂

dH₂O

50 pmol ARCO, BUTZ, CRY1, CRY2 primerleri ve 25 pmol SKIR primeri (Çizelge 3.1'de verilmiştir).

2 µl hedef DNA

m-PZR ile CDT Gen Varlığının Saptanması İçin Kullanılan Malzemeler

1.0 U Taq DNA polimeraz

1.5 mM MgCl₂

200 mM dNTP

20 pmol (CjspAU2, CjspAR2, CjspBU5, CjspBR6, CjspCU1 ve CjspCR2)

10X PCR tamponu (500 mM KC1, 15 mM MgCl₂, 100 mM TRIS-HC1)

3 µl hedef DNA

Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Malzemeler

Agaroz Jel

10X TAE / 1X TBE

10X DNA Loading

1 kb Ladder

Etidyum Bromür (EtBr) (5 mg/mlt)

%1,5 Agaroz Jel Hazırlanışı

1,5 gram agaroz jel hassas tartım cihazında tartılarak erlene koyulduktan sonra üzerine 100 ml TAE solüsyonu ilave edildi. Karışımın homojenize olabilmesi için mikrodalga fırınında karışması sağlandı. Daha sonra çeker ocağında, homojen hale getirdiğimiz karışım içerisine 5 µl Etidyum Bromür (EtBr) ilavesi yapılarak agaroz jel elde edilmiş oldu. En son da büyük boy tank içine kuyucuk oluşturması için tarakları yerleştirip üzerine elde ettiğimiz agaroz jel döküldü. Bir süre beklenip agaroz jelin tank içerisinde donması sağlandıktan sonra taraklar çıkartıldı. Ve artık Thermo Cycler cihazından çıkan amplikonların yüklenebilmesi için gerekli işlemler tamamlanmış oldu.

4. METOT

4.1. Örneklerin Hazırlanması

34 adet perakende tavuk eti laboratuara aseptik koşullar altında getirildi. Her bir örnekten 10 g alındı ve 100 ml steril fizyolojik tuzlu suda homojenize edildi (Stomacher, Interscience-BagMixer 400W).

4.2. *Arcobacter* Türlerinin İzolasyonu

1 ml tavuk yıkantı sıvısı, 9 ml çift güçlü *Arcobacter* Enrichment Broth (AEB) içine aktarıldı ve 32 °C'de mikroaerobik koşullar altında 48 saat inkübe edildi. Inkübasyon periyodundan sonra süspansiyon % 5-7 koyun kanlı agarına 0.65 µm selüloz membran filtreden süzüldü. Filtreleme işlemi bittikten sonra membran aseptik olarak petriden uzaklaştırıldı ve filitrat kanlı agar üzerine çizme ekim şeklinde yayıldı. Petriler 48-72 saat boyunca 32 °C'de inkübe edildi. Üreyen şeffaf küçük koloniler saflaştırılarak çoğaltıldı ve moleküler tanıda kullanıldı.



Şekil 4.1. 25 – 26 numaralı *Arcobacter*'lerin kanlı agar üzerindeki görüntüsü.

4.3. DNA Ekstraksiyonu

Arcobacter' ler ön zenginleştirme besiyerinden sonra üremeye bırakılan kanlı agardaki şüpheli görünümlüleri öze yardımıyla itinayla ayıklanarak alındı. Steril haldeki endorfların

içerisine 50 µl steril distile su konuldu. Daha sonra kanlı agardan öze yardımıyla ayıkladığımız *Arcobacter*'ler ependorfların içerisine süspanse edildi. 110 °C ye kadar ısıtılmış olan ısı bloğuna, hazırlanmış olduğumuz içerisnde *Arcobacter* bulunan eperdorflar konulup 15 dakika beklemeye alındı. Numuneler 15 dakika boyunca 10.000 rpm de santrifüj edildi. İçerisinde DNA bulunan supernatantlar steril ependorflara konularak mPCR tayini için -20 °C'de saklandı.

4.4. mPCR ile *Arcobacter* Türlerinin Saptanması

Arcobacter türlerinin tanımlanması için mPCR kullanılmıştır. m-PCR prosedürü toplam 50 µl hacimde gerçekleştirildi. Bu amaçla 2 µl hedef DNA, 5 µl 10X PCR tamponu, 1.5 U Taq polimeraz, 0.2 mM dNTP karışımı, 1.25 mM MgCl₂, 50 pmol ARCO, BUTZ, CRY1, CRY2 primerleri ve 25 pmol SKIR primeri kullanıldı. DNA amplifikasyonu için, 94 ° C'da 2 dakika ilk denatürasyon, 94 ° C'de 45 saniye, 45 ° C'de 45 saniye ve 72 ° C'de 30 saniye boyunca 32 siklus ve 10 dakika süreyle 72 ° C'de son uzatma uygulanmıştır. Tüm ürünler, % 1.5 agaroz jeli üzerinde 90 volta 40 dakika tabi tutularak baz büyüklükleri değerlendirildi.

4.5. m-PZR ile CDT Gen Varlığının Saptanması

Arcobacter DNA'sında *C. jejuni* türüne spesifik cdt genlerinin taranması için m-PZR, toplam 25 µl total hacimde gerçekleştirildi. 10X PCR tamponu (500 mM KC1, 15 mM MgCl₂, 100 mM TRIS-HCl); 1.5 mM MgCl₂; 200 mM dNTP; *C. jejuni* için her bir primerden 20 pmol (CjspAU2, CjspAR2, CjspBU5, CjspBR6, CjspCU1 ve CjspCR2) (Çizelge 3.1); 1.0 U Taq DNA polimeraz PZR karışımı hazırlamak için kullanıldı. Her bir örnek için ve 3 µL hedef DNA kullanıldı. 94 ° C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonunu ardından 94 ° C'de 30 saniye 55 ° C'de 30 saniye ve 72 ° C'de 30 saniye 32 döngü olacak şekilde ısı ve son olarak 72 ° C'de 10 dakika son uzatma işlemleri uygulanmıştır.

Arcobacter DNA'sında *C. coli* türüne spesifik cdt genlerinin taranmasında sadece primerler değiştirilmiş onun dışında aynı protokol uygulanmıştır. Testte kullanılan primerler; CcspAU, CcspAR1, CcspBU5, CcspBR5, CcspBU5, CcspBR5, CcspCU1 ve CcspCR1 olup Çizelge 3.1'de verilmiştir (Asakura vd., 2008). Tüm amplifikasyon ürünleri, % 1.5 agaroz jeli üzerinde, 60 dakika 120 volta tabi tutuldu.

4.6. Termofilik *Campylobacter* ve *Arcobacter* Türlerinde Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi

Campylobacter ve *Arcobacter* suşlarının biyofilm oluşturma kabiliyeti, üzerinde hafif değişiklikler yapılan daha önce tarif edilen bir yöntem kullanılarak analiz edildi (Ferreira ve ark. 2013). *Campylobacter* suşları aynı tavuk örneklerinde tez çalışmasını yürüten Çelenk (2017) tezinden temin edildi. Kısaca, hücreler gece boyunca 37 °C'de MH sıvı besiyerinde inkübe edildi. 600 nm'de 0.2'lik (~10⁹ CFU/mL) optik yoğunluğa (OD) seyreltildi. 100 µL, 96 kuyucuklu mikrotitrasyon polistiren plakalarına inoküle edildi ve mikroaerofilik ve aerobik koşullar altında 37 °C'de 48 saat inkübe edildi. MH sıvı besiyeri, negatif kontrol olarak kullanıldı. İnkübasyondan sonra, kuyucuklar distile su ile üç kez yıkandı. % 100 etanol içinde, % 1 kristal viyole (CV) çözeltisinden 200 µL, kuyucuklara ilave edildi ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Kuyucuklar distile su ile beş kez iyice yıkandı. Biyofilm düzeyi, kalan CV'yi, % 30 metanol ve % 10 asetik asitten oluşan bir çözelti ile çözerek belirlendi ve absorbans 570 nm'de ölçüldü. *Campylobacter* ve *Arcobacter* tarafından biyofilm oluşumu, Stepanovic ve ark. (2000) tarafından tanımlanan sınıflandırma sistemine göre kategorize edildi.

4.7. Sitotoksite testi

Bu çalışmada izole edilen *Arcobacter* türlerinde olası toksinlerin varlığı ve bunların insan barsak epitelleri üzerine sitotoksik etkisi araştırıldı. Bu amaçla *Arcobacter* türleri Mueller Hinton sıvı besiyerinde 37 °C'de 48 saat mikroaerofilik olarak üretildi. 8000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı üzerine PBS (Phosphate Buffer Saline) konularak işlem tekrarlandı. 3 yıkama işleminin ardından örnekler OD₅₉₀ 1 olacak şekilde ayarlandı ve hücreler 35 °C'de 4 saat inkübe edildi. Süpernatant 0.2 µm'lik steril filtreden süzülerek "filtre fraksiyon" elde edildi.

Filtre fraksiyon içerisindeki olası ekzotoksinlerin varlığı araştırıldı. Bu tür ekzotoksinler, protein karakterinde, genellikle, ısıya duyarlı ve eriyebilir substratlar olduklarından öncelikle örneklerle ait süpernatantların protein miktarı Bradford testi ile ortaya konuldu. 40 µl/ml ve üzeri protein ihtiva eden süpernatantlar sitotoksite deneyine tabii tutuldu.

Sitotoksite değerlendirmesi amacı ile hücre kültür hatlarında metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı bir test olan Metiltiazol Difenil Tetrazolyum (MTT) testi kullanıldı. MTT testinde *Arcobacter* filtre fraksiyonlarının farklı dilüsyonları DLD-1 (İnsan Kolon Epiteli) hücre hattı üzerine uygulanarak etkileri değerlendirildi.

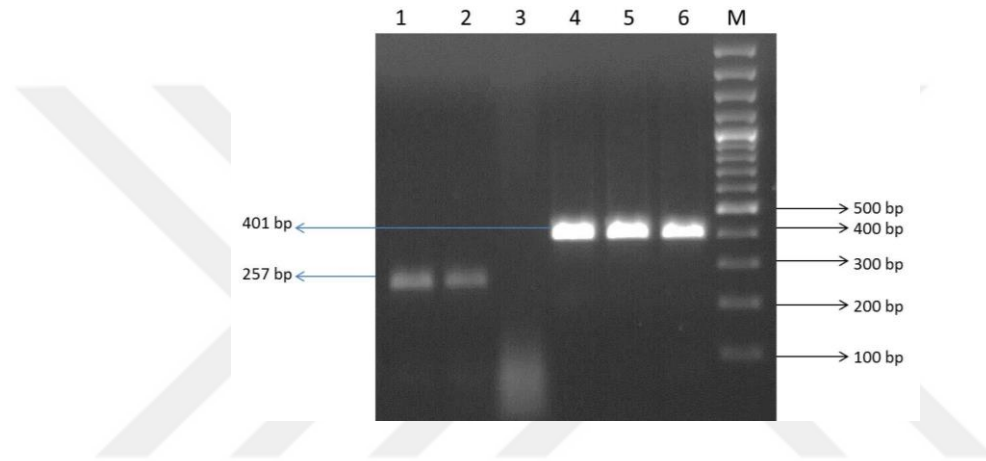
Öncelikle DLD-1 hücreleri %10 FCS (Fetal Calf Serum) içeren RPMI-1640 besi yerinde, 37 °C'de, % 5 karbondioksitli inkübatörde inkübe edildi. 10.000 hücre/ml konsantrasyonda 96 kuyucuklu plaklara ekildi. Bir gece inkübe edildi. Kuyucuklardaki vasat eklendi. A1, A9, A19, A27, A30 numunleri ayrı ayrı 10 µg/ml konsantrasyonda olacak şekilde hücre kültürü için hazırlanan taze besi yeri ile dilue edilerek 200 µl hacimde hücrelerin üzerine pipetlendi. 24 saat plak inkübe edildi. Plaktaki vasat atıldı. Kuyucuklara 100 µl hacimde 1:10 (v/v) MTT çözeltisi (5mg/ml) içeren taze besiyeri pipetlendi. Plak 4 saat inkübe edildi. Vasat atıldı. Kuyucuklara 100 µl 0.08M HCl içeren izopropanol pipetlendi. Çözünen formazan kristallerinin absorbansı 570 nm'de belirlendi.



5. BULGULAR

5.1. *Arcobacter* Türlerinin Tanımlanması ve Termofilik *Campylobacter* Türleri ile Birliktelikleri

34 adet tavuk eti örneğinde, yirmi iki adet (% 64.7) *Arcobacter* türü izole edilerek mPZR ile tür düzeyinde tanımlanmıştır. Tür bazında değerlendirildiğinde, incelenen örneklerde % 55.9 oranında *A. butzleri*, % 8.8 oranında *A. cryoaerophilus* varlığı tespit edildi (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. *Arcobacter* türlerinin m-PCR sonuçları.

Otuz dört adet tavuk eti numunesi test edilmiş ve on iki numunede, incelenen bakteri türü bulunamadı. Geri kalan tavuk eti örneklerinde *Arcobacter* türleri tek başına veya *Campylobacter* türleri ile birlikte bulundu (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1. İncelenen 34 adet tavuk etinde *Arcobacter* ve termofilik *Campylobacter* türlerinin izolasyonu ve bir arada bulunma oranları.

<i>Arcobacter</i> (<i>A. butzleri</i> ve <i>A. cryoaerophilus</i>) ve termofilik <i>Campylobacter</i> (<i>C. jejuni</i> ve <i>C. coli</i>) türlerinin izolasyonu oranları		
	AB (%)	AC (%)
CJ	7 (20.6)	2 (5.9)
CC	1 (2.9)	1 (2.9)
AB	11 (32.4)	0 (0)
AC	0 (0)	0 (0)
Toplam	19 (55.9)	3 (8.8)

Çizelge 5.2. *Campylobacter* ve *Arcobacter* izolatlarının, türler, cdt toksini ve biyofilm oluşturma kabiliyetlerine göre moleküler tanı sonuçları. (Aynı örnekte iki bakteri suşunun izole edildiği örnekler gri alanlarla işaretlenmiştir). **Campylobacter* izolasyonu ve toksinlerinin yer aldığı bu verilerin bir kısmı aynı tavuk örneklerinde tez çalışmasını yürüten Çelenk (2017) tezinden karşılaştırma yapılmak üzere alınmıştır.

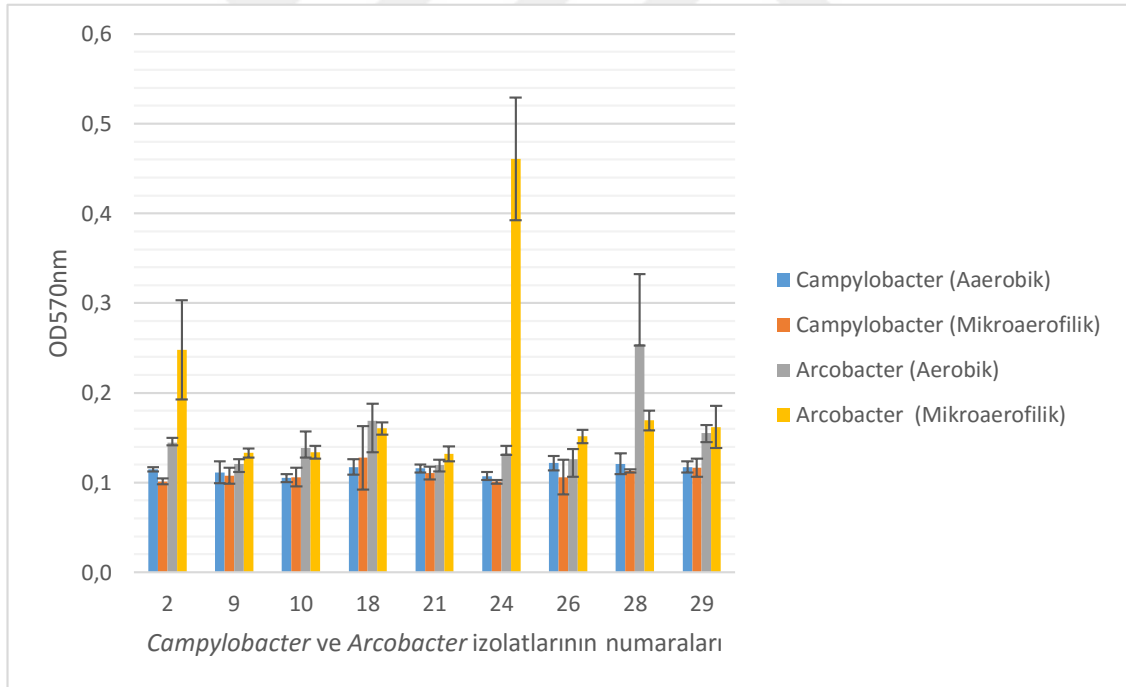
<i>Campylobacter</i> *							<i>Arcobacter</i>						
Örnek No	PCR Sonuçları				Biyofilm		Örnek No	PCR Sonuçları				Biyofilm	
	Tür	Cdt geni						Tür	Cdt geni				
	<i>Campylobacter</i>	cdtA	cdtB	cdtC	Aerobik	M.aerofilik		<i>Arcobacter</i>	cdtA	cdtB	cdtC	Aerobik	M.aerofilik
							A1	<i>A. butzleri</i>	-	-	-	0.145±0.087	0.141±0.008
C2	<i>C. jejuni</i>	+	+	+	0.115±0.002	0.101±0.003	A2	<i>A. cryaerophilus</i>	-	-	-	0.183±0.005	0.248±0.055
							A3	<i>A. butzleri</i>	-	-	-	0.123±0.101	0.146±0.009
							A5	<i>A. butzleri</i>	-	-	-	0.128±0.003	0.144±0.008
							A6	<i>A. butzleri</i>	-	-	-	0.121±0.004	0.135±0.008
C9	<i>C. coli</i>	+	+	+	0.111±0.012	0.108±0.009	A9	<i>A. butzleri</i>	-	-	-	0.139±0.005	0.133±0.005
C10	<i>C. jejuni</i>	+	+	+	0.105±0.004	0.106±0.011	A10	<i>A. butzleri</i>	-	-	-	0.124±0.018	0.134±0.007
							A13	<i>A. butzleri</i>	-	-	-	0.169±0.006	0.140±0.002
C18	<i>C. jejuni</i>	-	-	-	0.117±0.009	0.128±0.035	A18	<i>A. butzleri</i>	-	-	-	0.133±0.019	0.160±0.007
							A19	<i>A. butzleri</i>	-	-	-	0.119±0.006	0.208±0.081
C21	<i>C. jejuni</i>	+	-	+	0.116±0.005	0.111±0.007	A21	<i>A. butzleri</i>	-	-	-	0.136±0.006	0.132±0.009
							A22	<i>A. butzleri</i>	-	-	-	0.133±0.006	0.136±0.009
C24	<i>C. jejuni</i>	+	+	+	0.107±0.005	0.101±0.002	A24	<i>A. butzleri</i>	-	-	-	0.125±0.008	0.461±0.068
							A25	<i>A. butzleri</i>	-	-	-	0.126±0.010	0.204±0.101
C26	<i>C. jejuni</i>	+	+	+	0.122±0.008	0.106±0.019	A26	<i>A. butzleri</i>	-	-	-	0.128±0.012	0.151±0.008
							A27	<i>A. butzleri</i>	-	-	-	0.255±0.002	0.170±0.018
C28	<i>C. jejuni</i>	-	-	+	0.121±0.011	0.113±0.002	A28	<i>A. cryaerophilus</i>	-	-	-	0.155±0.078	0.169±0.011
C29	<i>C. jejuni</i>	-	-	-	0.117±0.006	0.116±0.010	A29	<i>A. butzleri</i>	-	-	-	0.125±0.009	0.162±0.023
							A30	<i>A. butzleri</i>	-	-	-	NT	NT
C31	<i>C. jejuni</i>	+	+	+	NT	NT	A31	<i>A. butzleri</i>	-	-	-	NT	NT
C32	<i>C. coli</i>	+	+	+	NT	NT	A32	<i>A. cryaerophilus</i>	-	-	-	NT	NT
							A33	<i>A. butzleri</i>	-	-	-	NT	NT

5.2. Termofilik *Campylobacter* ve *Arcobacter* Türlerinde Biyofilm Oluşumu

Aynı örneklerden izole edilen dokuz adet *Campylobacter* türü ve dokuz adet *Arcobacter* türünün biyofilm oluşum yeteneği iki farklı atmosferik koşullarda (aerobik ve mikroaerofilik) incelendi. (Şekil 5.2).

Biyofilm sonuçları, Ferreira S., (2013) tarafından yapılan çalışmada olduğu gibi, *Arcobacter* türlerinin biyofilm oluşum sonuçları olarak değerlendirildi. Zayıf yapışık izolatların aralığı 0.174-0.287 (ortalama 0.226 ± 0.029) olarak kabul edildi ve ılımlı yapışık izolatlar 570 nm'de 0.422-0.634 (ortalama 0.552 ± 0.083) OD birim olarak kabul edildi.

Orta derecede biyofilm oluşumu, mikroaerofilik ortamda sadece bir *Arcobacter* türünde tespit edildi. Suşların geri kalan kısmı zayıf biyofilm formasyonu şekillendirdi. *Campylobacter* ve *Arcobacter* türlerinin biyofilm oluşumunda birincil kolonizer mikroorganizmalar olmadığı, ancak ikincil kolonize ediciler olarak biyofilm ortamında varolabileceği sonucuna varıldı.

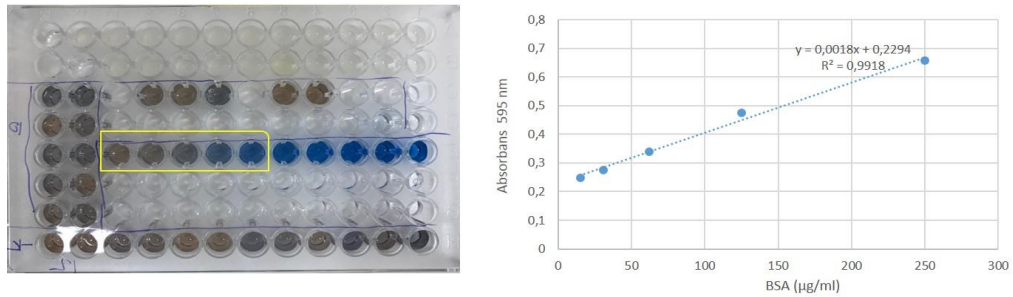


Şekil 5.2. Farklı atmosferik koşullarında (aerob ve mikroaerofilik) *Campylobacter* ve *Arcobacter* türlerinin biyofilm oluşumu sonuçları.

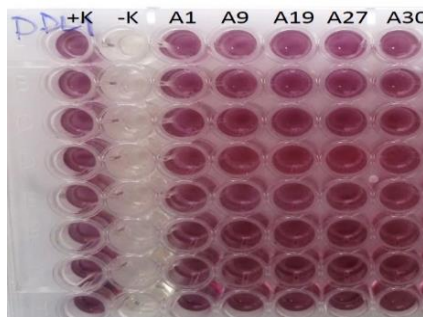
5.3. Sitotoksite Testi

Yirmi iki *Arcobacter* türüne ait filtre fraksiyonlarındaki protein miktarı Bradford testi değerlendirildi. Flitratlardan 5 tanesinde protein miktarı $40 \mu\text{g/ml}$ üzerinde bulundu. Suş bazında değerlendirildiğinde protein miktarı A1 için $58 \mu\text{g/ml}$, A9 için $61 \mu\text{g/ml}$, A19 için $61 \mu\text{g/ml}$, A27 için $76 \mu\text{g/ml}$, A30 için $41 \mu\text{g/ml}$ şeklinde tespit edildi. Bu beş adet örnek sitotoksite testinde kullanıldı.

ISO10993-5 standartlarına göre sitotoksite testinde canlılık oranı % 70'in altında olan örnekler sitotoksik olarak değerlendirilmektedir. Yapılan incelemede ($10 \mu\text{g/ml}$ olacak şekilde seyreltilmiş) filtre fraksiyonların uygulandığı DLD-1 hücrelerinde canlılık oranları A1 için % 98.0 ± 4.2 , A9 için 89.6 ± 6.4 , A19 için % 88.4 ± 3.7 , A27 için % 93.3 ± 5.1 , A30 için % 90.6 ± 6.6 olarak saptanmıştır. İncelenen beş *Arcobacter* türünün filtre fraksiyonlarının DLD-1 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisine rastlanmamıştır.



Şekil 5.3. Bradford protein kalibrasyon eğrisi (BSA, Bovine Serum Albumin, Sarı Çerçeve) ve *Arcobacter* türlerinin filtre fraksiyonları içerisindeki protein miktarının belirlenmesi.



Şekil 5.4. *Arcobacter* filtre fraksiyonlarının DLD-1 hücre hattı üzerine sitotoksik etkilerinin MTT test sonuçları.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Arcobacter cinsi bakterilerin dünyanın birçok ülkesinde görüldüğü yapılan çeşitli çalışmalarla rapor edilmiştir. Bu türler, Avustralya, Belçika, Çek Cumhuriyeti, Güney Kore, İngiltere, Kosta Rika, Malezya ve Türkiye’de işlenmiş ve işlenmemiş gıdalardan izole edilirken, Güney Afrika ve Finlandiya’ da çeşitli su kaynaklarından izole edilmiştir. Almanya, Amerika, İspanya, İran ve İtalya’da ise hem gıdalardan hem de su kaynaklarından izole edildiği bildirilmiştir (Hsu ve Lee, 2015).

Tavuk etinden elde edilen *Arcobacter* türlerinin izolasyon yöntemleri dünya çapında gün geçtikçe artmaktadır. Daha önceden *Campylobacter* cinsi için kullanılan laboratuvar yöntemlerinin geliştirilerek *Arcobacter* cinsi için kullanılması, *Arcobacter spp.*'nin insan hastalıklarındaki rolünü ve önemini artırmıştır. *Arcobacter*'lerin hayvansal kaynaklı gıdalarda varlığının görülmesi, bu etkene karşı kullanılacak yöntem ve kontrol metotlarının geliştirilmesi gerektiğini doğrulamaktadır. İzolasyon yöntemlerinin gelişmesiyle *Arcobacter* türlerinin insanlarda görülebilen önemli patojenler arasında olduğu anlaşılmıştır (Houf ve ark. 2005).

Arcobacter türlerinin en fazla tavuk etlerinde bulunduğu tespit edilmiştir (Ho vd., 2006a; Mauleon vd., 2006; Hansen vd., 2007). Yapılan bir çalışmada market ve mezbahalardan tedarik edilen tavuk karkaslarında yüksek oranda *A. butzleri* ve *A. cryaerophilus* saptanmıştır (Houf vd., 2002a; Atabay vd., 2003; Kabeya vd., 2004). İran’da yapılan bir çalışmada 5 bölgeden toplam 400 adet tavuk karkas örneği toplanmış, bu örneklerden 185’i *Arcobacter spp.* yönünden pozitif olduğu tespit edilmiştir. Pozitif sonuç veren örnekler % 82,7 oranında *A. butzleri*, % 12,4 oranında *A. cryaerophilus* ve % 4,9 oranında *A. skirrowii* olarak tanımlanmıştır (Rahimi vd., 2012). Kayseri ilinde yapılan bir çalışmada ise farklı satış noktalarından alınan tavuk, hindi ve bıldırcın karkaslarında *Arcobacter spp.* varlığı araştırılmış ve sonuç olarak Kayseri ilinde bulunan marketlerde satışı sunulan taze kanatlı karkaslarının genellikle *Arcobacter spp.*'lerle kontamine olduğu saptanmıştır. Etkenin halk sağlığı açısından önemli bir risk faktörü oluşturabileceği bildirilmiştir (Adanut ve Gümüşsoy 2005). *Campylobacter* türlerinin izolasyonu ile ilgili yapılan araştırmalarda ise, çiğ kanatlı eti ve ürünlerinin *Campylobacter* türleri ile kontaminasyon düzeylerinin % 3,7 ile % 92,6 arasında değişiklik gösterdiği ve *C. jejuni* infeksiyonlarının en önemli kaynağının kontamine çiğ veya yetersiz pişirilmiş kanatlı eti olduğu bildirilmiştir (Jones vd., 1991; Nachamkin, 2007). Kütahya ilinde gerçekleştirdiğimiz çalışma ile tavuk etinden yirmi iki adet (% 64.7) *Arcobacter* türü izole edildi. Tür bazında değerlendirildiğinde, incelenen örneklerde % 55.9 oranında *A. butzleri*, % 8.8 oranında *A. cryaerophilus* varlığı tespit edildi.

İzole edilen *Arcobacter* türleri ile aynı ortamı paylaşan 11 adet *Campylobacter* türüne rastlandı. Tüm bu çalışmalar ışığında yaptığımız incelemeler İran ve Kayseri ilinde yapılan çalışmaların verileri ile kıyaslandığında *Arcobacter butzleri* ve *Arcobacter cryaerophilus* türlerinin diğer türlere oranla daha fazla yaygınlık gösterdiği saptandı. Elde edilen veriler ülkemizde ve dünya çapında yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında *Arcobacter* türlerinin prevalansı en fazla tavuk etinden elde edilen izolatlarda görülmektedir. Bu durum *Arcobacter* türlerinin halk sağlığı açısından risk faktörü oluşturduğunu göstermektedir.

Arcobacter'lerin izolasyonu için çeşitli besiyerleri ve farklı prosedürler kullanılmaktadır. *Arcobacter*'lerin dışkı örneklerinin izolasyonunda, bugüne kadar *Campylobacter* ve *Leptospira* izolasyon tekniklerinin modifiye edildiği tekniklerden, *Arcobacter*'e özgü besiyerine kadar çeşitli metotlar uygulanmıştır. Bunlardan *Arcobacter*'lerin izolasyonunda kullanıldığı bildirilen ilk besiyeri, 5-florourasil eklenmiş *Leptospira* Ellinghausen McCullough-Johnson-Harris (EMJH) besiyeridir (Ellis vd., 1977). Atabay ve Corry (1998) çalışmalarında sefoperazon, amfoterisin ve teikoplanin (CAT) saplementi eklenmiş *Arcobacter* sıvı besiyerini kullanmışlardır. Johnson ve Murano (1999) yaptıkları çalışmada JM sıvı ve katı besiyerlerini geliştirmişlerdir. Houf ve arkadaşları 2001 yılında sefoperazon, trimetoprim, amfoterisin, novobiosin ve 5-florourasili antibiyotiklerini *Arcobacter* besiyerine ekleyerek *Arcobacter*-spesifik izolasyon metodunu geliştirmişlerdir. Bu yöntem *Arcobacter* spp.'nin prevalansı üzerine yapılan çok sayıdaki çalışmada kullanılmıştır (Houf vd., 2001a; Houf vd., 2005; 2008; 2009).

Yaptığımız çalışmada, 34 adet şüpheli *Arcobacter* suşlarının izolasyonu Atabay ve Corry'nin (1998) çalışmalarında kullandığı sefoperazon, amfoterisin ve teikoplanin (CAT) saplementi eklenmiş olan *Arcobacter* sıvı besiyerine inoküle edilerek gerçekleştirildi. %5 defibrine kanlı agara ekimi yapılan şüpheli *Arcobacter* suşları inkübasyon sonrasında 22 adet örnekte *Arcobacter* spp.'nin morfolojisine benzediği tespit edildi. Elde edilen bu sonuç *Arcobacter*'lerin izolasyonunda kullanılan bu tekniğin güvenilirliğini artırmaktadır.

Arcobacter türlerinin biyofilm oluşturma kapasitelerini içeren az sayıda literatür bulunmaktadır. Danimarka'da Kjeldgaard ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (2009), *A. butzleri* ATCC 49616'nin ve kesimhaneden izole edilen 6 adet saha izolatı kullanılmıştır. Suşların tamamının mikroplyetlerde biyofilm oluşturduğu ve oluşan biyofilm tabakasının miktarının, inkübasyon süresi ve sıcaklık ile orantılı olarak artış gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca kullanılan besiyerinin de biyofilm oluşumunu olumlu yönde etkilediği bildirilmektedir. Portekiz'de yapılan bir araştırmada ise, 36 adet *Arcobacter* izolatının 21'inin zayıf, 5'inin orta düzeyde

biyofilm oluşturdıklarını ve biyofilm oluşumunda atmosfer ortamının ve başlangıç konsantrasyonunun (0.2 ve 0.02) etkili olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada 10 adet izolatuın ise biyofilm şekillendirmediği saptanmıştır (Ferreira, vd., 2015). Kütahya ilinde *Arcobacter* türlerinin identifikasyonu ve biyofilm oluşturma yeteneklerinin saptanması amacıyla yapılan bir çalışmada kullanılan 6 adet *A. butzleri* ve 1 adet *A. cryaerophilus* suşu OD590'da 0.07 başlangıç konsantrasyonunda aerobik ve mikroaerofilik ortamda incelenmiştir. Suşların çoğunda zayıf biyofilm şekillendirmiştir. Konsantrasyonun arttırılması (0.15) aerobik koşullarda biyofilm oluşumu üzerine sadece bir adet suşta olumlu etki gösterirken, mikroaerofilik koşullarda 3 adet suşta orta biyofilm ve 2 adet suşta güçlü biyofilm şekillendirmiştir (Dizdaroğlu İnce, 2016). Kütahya ili ve çevresinde yapılan başka bir çalışmada ise su örneklerinden izole edilen *Arcobacter* türlerinin biyofilm oluşturma kapasitesi incelendiğinde 1 (% 14.2) adet *Arcobacter* suşu güçlü biyofilm gösterirken diğer 6 (% 85.7) adet *Arcobacter* suşu ve 7 adet refakatçi mikroorganizma suşları zayıf biyofilm göstermiştir. Bu çalışma ile *Arcobacter* türlerinin biyofilim oluşturma yetenekleri ve aynı ortamı paylaştıkları tek tip koloni olarak seçilen refakatçi mikroorganizmaların primer kolonizatör olarak biyofilm oluşturma yeteneği incelenmiştir. Elde edilen veriler sonucunda refakatçi mikroorganizmaların *Arcobacter* türleri ile aynı habitatı paylaştığı ancak primer kolonizatör bakteri olarak biyofilm yeteneklerinin olmadığı saptanmıştır (Tunçel, 2017). *Arcobacter* türleri, kendileri ile aynı ailede yer alan *C. jejuni* (Reeser, vd., 2007) suşları ile biyofilm şekillendirme özellikleri açısından benzerlik göstermektedir. Saha koşullarında ve kesimhanelerde *C.jejuni* ikincil kolonizatör bakteri olarak koşumımıza çıkmaktadır. Bu ortamlardaki birincil kolonizatör bakteriler biyofilmin zeminini hazırlamaktadır. Ardından bu hazır ortama *C.jejuni* de dahil olmaktadır (Hanning, vd., 2008).

Yaptığımız bu çalışma, dünyada ve ülkemizde yapılan diğer koşılmaların verileri ile mukayese edildiğinde *Arcobacter* türlerinin genellikle zayıf ve orta derecede biyofilm şekillendirdiği sonucuna varılmıştır. Aynı zamanda, aynı örneklerden izole edilen dokuz adet *Campylobacter* türü ve dokuz adet *Arcobacter* türünün biyofilm oluşum yeteneği iki farklı atmosferik koşullarda (aerobik ve mikroaerofilik) incelendiğinde mikroaerofilik ortamda sadece bir *Arcobacter* türünde orta derecede biyofilm oluşumu tespit edildi. Suşların geri kalan kısmında ise zayıf biyofilm formasyonu şekillendirdi. *Campylobacter* ve *Arcobacter* türlerinin biyofilm oluşumunda birincil kolonizer mikroorganizmalar olmadığı, ancak ikincil kolonize ediciler olarak biyofilm ortamında varolabileceği ve biyofilm oluşturma kapasitesinin ortamın atmosferine ve sıcaklığına bağlı olarak şekillenebileceği sonucuna varıldı.

Meksika'nın Guadalajara kentinde 12 aylık bir süre zarfında kasaplardan toplanan 135 örnekte *Arcobacter spp.* varlığı incelenmiştir. *Arcobacter* olduğu kabul edilen tüm izolatlar Vero hücrelerine karşı sitotoksitelerini belirlemek amacıyla Eagle'ın minimum esansiyel ortamına aşılansarak gerçekleştirildi. Çalışmalar neticesinde *Arcobacter* izolatlarının % 95'i Vero hücrelerine karşı bir virulans mekanizması üretirken, 38 tanesi enterotoksin üretimini gösteren hücre uzamasını uyardı. On sekiz izolatta vakuol oluşumu, 39 izolatta ise hem vakuolizasyonu hem de uzamayı ürettiği gözlemlendi. Elde edilen veriler ışığında *Arcobacter spp.* tarafından vakumlayıcı bir toksinin üretildiği bildirilmemiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, *Arcobacter spp.*'nin tanınmış enterotoksin üretimi dışında sitotoksik etki gösterebileceğini göstermektedir (Villarruel-lopez vd., 2003). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, tavuk etlerinden izole edilen *Campylobacter* türlerinin Cdt varlığı incelenmiştir. İncelenen suşların % 90.9'unda Cdt A ve Cdt C genleri saptanırken, % 81.8'inde Cdt B geni tespit edilmiştir. Cdt genlerinin bakteri türlerine göre dağılımları incelendiğinde *C. jejuni*'de Cdt A ve Cdt C genlerinin bulunma oranları % 85.7 Cdt B geninin ise %71.4 olduğu görülmüştür. *C. coli*'de ise bu üç toksin geninin tüm suşlarda var olduğu (% 100) tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar, bazı *C. jejuni* türlerinde Cdt genlerinin nükleotid delesyonu, insersiyon, yer değiştirme gibi mutasyonlara maruz kalarak, toksin genlerini ve toksin aktivitelerini kaybettiğini göstermektedir (Çelenk, 2017).

Arcobacter türlerinde olası toksinlerin varlığı ve bunların insan barsak epitelleri üzerine sitotoksik etkisini araştırıldığımız bu çalışma dünyada ve ülke genelinde gerçekleştirilen diğer araştırmalar ile kıyaslandığında, suş bazında değerlendirilen *Arcobacter* türlerinin protein miktarı A1 için 58 µg/ml, A9 için 61 µg/ml, A19 için 61 µg/ml, A27 için 76 µg/ml, A30 için 41 µg/ml şeklinde olduğu tespit edildi. Bu beş adet örnek sitotoksite testinde değerlendirildiğinde filtre fraksiyonların uygulandığı DLD-1 hücrelerinde canlılık oranları A1 için % 98.0±4.2, A9 için 89.6±6.4, A19 için % 88.4±3.7, A27 için % 93.3±5.1, A30 için % 90.6±6.6 olarak saptanmıştır. İncelenen beş *Arcobacter* türünün filitre fraksiyonlarının DLD-1 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisine rastlanmamıştır. Elde edilen veriler ISO10993-5 standardlarına göre değerlendirildiğinde 5 adet örneğin canlılık oranı % 70'in altında olmadığından herhangi bir sitotoksik etki göstermediği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada aynı ortamı paylaşan farklı tür bakterileri arasında yatay gen aktarımlarının gerçekleşebileceği olasılığına dayanarak, *Arcobacter* türleri, *Campylobacter* türleri arasında toksin gen varlığı yönünden bir etkileşim olup olmadığı *Campylobacter* türlerine özgü cdt spesifik primerler ile tarandı. *Arcobacter* türlerinden *cdt* genine rastlanmadı.

Arcobacter türleri cdt dışında başka bir toksine sahip olup olmadıkları yönünde değerlendirildi. *Arcobacter* türlerine ait içerikleri 40 µg/ml üzerinde protein barındıran süpernatantlar, sitotoksiteleri değerlendirilmek üzere DDL-1 hücre kültürleri üzerine inokule edildi. *Arcobacter* türlerinin hücreler üzerine toksik etkisi olmadığı MTT testi ile ortaya konuldu.

Bu veriler ışığında Kütahya ilinde ticari olarak tüketime sunulan tavuk etleri üzerinde var olan *Arcobacter* türlerinin halk sağlığı açısından büyük bir risk oluşturmadığı kanısına varıldı.



KAYNAKLAR DİZİNİ

Abay, S., Kayman, T., Hizlisoy, H. ve Aydın, F. (2012). In vitro antibacterial susceptibility of *Arcobacter butzleri* isolated from different sources. *J Vet Med Sci* 74(5): 613-616.

Abdelbaqi, K., Buissonnière, A., Prouzet-Mauleon, V., Gresser, J., Wesley, I., Me'graud, F., Me'nard, A. (2007). Development of a real-time fluorescence resonance energy transfer PCR to detect *Arcobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* 45:3015–3021.

Abeebe, A. M., Vogelaers, D., Hende, J. ve Houf, K. (2014). Prevalence of *Arcobacter* Species among Humans, Belgium. 2008–2013. *Emerging Infectious Diseases* Cilt: 20; No: 10; Sf: 1731-1734.

Akıncıoğlu, F. (2011). Isolation of *Arcobacter* Species From Different Water Sources and Characterization of Isolated Species by Molecular Techniques. Yüksek Lisans Tezi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü.

Al Rashid, S. T., Dakuna, I., Louie, H., Ng, D., Vandamme, P., Johnson, W. ve Chan, V. L., (2000). Identification of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *Arcobacter butzleri* and *A. butzleri*-Like Species Based on the *glyA* Gene. *J. Clin. Microbiol.* S. 1488–1494.

Altındal, N. (2011). Sinop İli Topraklarından İzole Edilen *Pseudomonas* Türlerinin Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi.

Anonymous, (2006). Türkiye 1. Ulusal Devekuşu Yetiştiriciliği Kongresi. 2-4 Haziran. Kongre Kitabı, Bursa. 45 s.

Anonymous, (2008a). Isolation of *Campylobacter* Species from Food and Water, *Bacteriological Analytical Manual Online*, Chapter 7, Food and Drug Administration. Erişim: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-7.html>.; Erişim Tarihi: 28.08.2008.

Asakura, M., Samosornsuk, W., Hinenoya, A., Misawa, N., Nishimura, K., Matsuhisa, A., Yamasaki, S. (2008). Development of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter*, Fetus. *FEMS Immunology and amp; Medical Microbiology*, Cilt 52, Sayı 2.

Atabay, H. I. ve Corry, J. E. (1997). The prevalence of *Campylobacters* and *Arcobacters* in broiler chickens. *J Appl Microbiol* 83(5): 619-626.

Atabay, H. I. ve Corry, J. E. (1998). Evaluation of a new *Arcobacter* enrichment medium and comparison with two media developed for enrichment of *Campylobacter* spp. *International journal of food microbiology* 41(1): 53-58.

Atabay, H. I. ve Aydın, F. (2001). Mast Antimikrobik Rezistotiplendirme Metodunun Broylelerden İzole Edilen *Arcobacter butzleri* Suşlarına Uygulanması. 17(1): 149-152.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Atabay, H. I., Bang, D. D., Aydın, F., Erdoğan, H. M., Madsen, M. (2002). Discrimination of *Arcobacter butzleri* isolates by polymerase chain reaction mediated DNA fingerprinting. *Lett Appl Microbiol*, 35, 141-145.
- Atabay, H. I., Aydın, F., Houf, K., Sahin, M., Vandamme, P. (2003). The prevalence of *Arcobacter* spp. on chicken carcasses sold in retail markets in Turkey, and identification of the isolates using SDS-PAGE. *Int J Food Microbiol*, 81, 21-28.
- Atabay, H. I., Wainø, M. ve Madsen, M. (2006). Detection and diversity of various *Arcobacter* species in Danish poultry. *International Journal of Food Microbiology* 109(1–2): 139-145.
- Aydemir, D. H. (2018). The Biological Significance of Bacterial Biofilms and Effective Control Strategies. Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Doğu Kampüsü, *Türk J Life Sci Türk Yaşam Bilimleri Dergisi* (2018)3/1:218-230 <http://dergipark.gov.tr/tjls> e-ISSN: 2536-4472.
- Aydın, F., ve Atabay, H. (2001). *Arcobacter* türleri: Sınıflandırma, genel özellikler, izolasyon ve identifikasyon metotları. *Veteriner Hekim Mikrobiol Dergi*, 2(1) 71-76.
- Aydın, N., (2005). Bazı Bakteriyel Patojenlerin Yumurta Kabuğundan Penetrasyonu. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Kesin Raporu.
- Aydın, F., Gumussoy, K. S., Atabay, H. I., Ica, T., ve Abay, S. (2007). Prevalence and distribution of *Arcobacter* species in various sources in Turkey and molecular analysis of isolated strains by ERIC-PCR. *J Appl Microbiol* 103(1): 27-35.
- Bucker, R., Troeger, H., Kleer, J., Fromm, M., ve Schulzke, J. D. (2009). *Arcobacter butzleri* induces barrier dysfunction in intestinal HT-29/B6 cells. *J Infect Dis* 200(5): 756-764.
- Buller, N. B., (2014). Bacteria and Fungi from fish and other Aquatic Animals, and Edition *Campylobacter jejuni*. *J. Gen. Microbiol.*, 137(10): 2477-2482.
- Cardoen, S., Huffel, X. V., Berkvens, D., Quoilin, S., Ducoffre, G., Saegerman, C., Speybroeck, N., Imberechts, H., Herman, L., Ducatelle, R., Dierick, K. (2009). Evidence-based semiquantitative methodology for prioritization of foodborne zoonoses. *Foodborne Pathog. Dis.* 6:1083–1096.
- Cary, S.G., ve Blair, E. B., (1964). New Transport Medium For Shipment of Clinical Specimens. *Journal of Bacteriology* 88, 96-98.
- Chinivasagam, H. N., B. G. Corney, L. L. Wright, I. S. Diallo, and P. J. Blackall. (2007). Detection of *Arcobacter* spp. in piggery effluent and effluent irrigated soils in southeast Queensland. *J. Appl. Microbiol.* 103:418–426.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Collado, L., Inza, I., Guarro, J., ve Figueras, M. J. (2008). Presence of *Arcobacter* spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution. *Environmental Microbiology*. 10:1635–1640.
- Collado, L., I. Cleenwerck, S., Van Trappen, P., De, Vos., ve Figueras, M. J. (2009). *Arcobacter mytili* sp. nov., an indoxyl acetate-hydrolysis-negative bacterium isolated from mussels. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59:1391–1396.
- Collado, L. (2010). Taxonomy and epidemiology of the genus *Arcobacter*. RoviraiVirgili University.
- Collado, L., Levican, A., Perez J, Figueras, M. J. (2011). *Arcobacter defluvii* sp. nov., isolated from sewage samples. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:2155–61.
- Collado, L., ve Figueras, M. J., (2011). Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clin Microbiol Rev*, 24, 174-92.
- Corry, J. E. L., Post, D. E., Colin, P., ve Laisney, M. J., (1995). Culture Media for The Isolation of *Campylobacters*. *Int J Food Microbiol.* 26(1):43-76.
- Corry, J. E. L., Atabay, H. I. (2001). Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. *J Appl Microbiol*, 90, 96-114.
- Cortes-Bratti, X., Karlsson, C., Lagergard, T., Thelestam, M.,ve Frisan, T. (2001). The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin induces cell cycle arrest and apoptosis via the DNA damage checkpoint pathways. *J. Biol. Chem.*, 276, 5296–5302.
- Çelenk, M. (2017). Termofilik *Campylobacter* Türlerinin Çeşitli Virülens Özelliklerinin Saptanması. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Çelik, S. (2000). *Arcobacter*, Seminer, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ABD, Ankara, 1-19.
- D'Sa, E. M., ve Harrison, M. A. (2005). Effect of pH, NaCl content, and temperature on growth and survival of *Arcobacter* spp. *J. Food Prot.* 68:18–25.
- De Boer, E., Tilburg, J. J., Woodward, D. L., Lior, H., ve Johnson, W. M. (1969). A selective medium for the isolation of *Arcobacter* from meats. *Lett Appl Microbiol* 23: 64-6
- De Oliveira, S. J., Baetz, A. L., Wesley, I. V., ve Harmon, K. M. (1997). Classification of *Arcobacter* species isolated from aborted pig fetuses and sows with reproductive problems in Brazil. *Vet. Microbiol.* 57: 347-354
- De Oliveria, S. J., Wesley, I. V., Baetz, A. L., Harmon, K. M., Kader, I. I. T. A., ve De Uzeda, M. (1999). *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter butzleri* isolated from preputial fluid of boars and fattening pigs in Brazil. *J Vet Diagn Invest* 11(5): 462-464.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- De Smet, S., Vandamme, P., De Zutter, L., On, S. L. W., Doudah, L., Houf, K. (2011). *Arcobacter trophiarum* sp. nov., isolated from fattening pigs. *Int J Syst Evol Microbiol* 61: 356–61.
- Debruyne, L., Gevers, D., ve Vandamme, P. (2008). Taxonomy of the family *Campylobacteriaceae*. p. 3–25.
- Dieguez, A. L., Balboa, S., Magnesen, T., ve Romalde, J. L. (2017). *Arcobacter lekithochrous* sp. nov., isolated from a molluscan hatchery. *Int J Syst Evol Microbiol* 67(5): 1327-1332.
- Diergaardt, S. M., Venter, S. N., Spreeth, A., Theron, J., Ve Brozel, V. S. (2004). The occurrence of *Campylobacter* in water sources in South Africa. *Water Res* 38(10): 2589-2595.
- Dizdaroğlu İnce, E. (2016). Kütahya İlinde Ticari Olarak Tüketime Sunulan Çeşitli Gıda Ürünlerinde *Arcobacter* Türlerinin m-PCR İle Saptanması ve Biyofilm Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Doksanüçoğlu, Ç. (2006). Ankara’da Satışa Sunulan Tavuk Eti Örneklerinden *Arcobacter* Türlerinin İzolasyonu ve Bu İzolatların Değişik Antibiyotiklere Karşı Duyarlılıkları. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Donachie, S. P., Bowman, J. P., On, S.L., ve Alam, M. (2005). *Arcobacter halophilus* sp nov., the first obligate halophile in the genus *Arcobacter*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 1271–7.
- Donlan, R. M., ve Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 15/2: 167–193.
- Doyle, M. P. (1984). Association of *Campylobacter jejuni* With Laying Hens and Eggs. *Applied Environmental Microbiology*, 47 (3) : 533-536.
- Ellis, W. A., Neill, S. D., O’Brien, J. J., Ferguson, H. V., Hanna, J. (1977). Isolation of *Spirillum/Vibrio*-like organisms from bovine fetuses. *Vet Rec* 100:451–2.
- Ellis, W. A., Neill, S. D., O’Brien, J. J., Hanna, J. (1978). Isolation of spirillumlike organisms from pig fetuses. *Vet Rec* 102:106.
- Elwell, C.A., Dreyfus, L.A. (2000). DNAase I homologous residues in CdtB are critical for cytolethal distending toxin-mediated cell cycle arrest. *Mol. Microbiol.* 37, 952963.
- Ergüler, Ö. (2007). Ankara Yöresinde Tüketime Sunulan Tavuklardan *Campylobacter* Türlerinin İzolasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Ertaş, H. B., Çetinkaya, B., Muz, A., Öngör, H. (2002). Tavuk Orijinli *Campylobacter coli* ve *Campylobacter jejuni*’nin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile İdentifikasyonu. *Turk Journal of Veterinary Animal Science*, 26: 1447-1452.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ertuş, N. (2009). Kanatlı Etlerinde *Arcobacter* spp. Varlığı ve Önemi. e-Journal of New World Sciences Academy, Cilt: 4, No: 4.
- Fanelli, F., Di Pinto, A., Mottola, A., Mule, G., Chieffi, D., Baruzzi, F., Tantillo, G., ve Fusco, V. (2019). Genomic Characterization of *Arcobacter* butzleri Isolated From Shellfish: Novel Insight Into Antibiotic Resistance and Virulence Determinants. *Front Microbiol*10: 670.
- Fera, M. T., Maugeri, T. L., Gugliandolo, C., Beninati, C., Giannone, M., La Camera, E., Carbone, M. (2004). Detection of *Arcobacter* spp. in the coastal environment of the Mediterranean Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1271–1276.
- Fernandez, H. ve Jaramillo, A. (2016). *Arcobacter* butzleri. *Rev Chilena Infectol* 33(6): 663-664.
- Ferreira, S., Queiroz, J. A., Oleastro, M. ve Domingues, F. C. (2015). Insights in the pathogenesis and resistance of *Arcobacter*: A review. *Crit Rev Microbiol*, 1-20.
- Figueras, M. J., Collado, L., Levican, A., Perez, J., Solsona, M. J., Yustes, C. (2011a). *Arcobacter molluscorum* sp. nov., a new species isolated from shellfish. *Syst Appl Microbiol* 34: 105–9.
- Figueras, M. J., Levican, A., Collado, L., Inza, M. I., Yustes, C. (2011b). *Arcobacter ellisii* sp nov., isolated from mussels. *Syst Applied Microbiol* 34: 414–8
- Figueras, M. J. ve Gonzalez, L. C. (2013). Sanitary Importance of *Arcobacter*. Doktora Tezi, Rovira I Virgili Üniversitesi.
- Fong, T. T., Mansfield, L. S., Wilson, D. L., Schwab, D. J., Molloy, S. L., Rose, J. B. (2007). Massive microbiological groundwater contamination associated with a waterborne outbreak in Lake Erie, South Bass Island, Ohio. *Environ. Health Perspect.* 115:856–864.
- Frisan, T., Cortes-Bratti, X., Chaves-Olarte, E., Stenerlöw, B., Thelestam, M. (2003). The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin induces DNA double strand breaks and promotes ATM-dependent activation of RhoA. *Cell. Microbiol.* 5, 695–707.
- Guerra, L., Cortes-Bratti, X., Guidi, R., ve Frisan, T. (2011). The Biology of the Cytolethal Distending Toxins.
- Halkman, T. (2000). İzolasyon ve İdentifikasyon Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü.
- Hansen, F., Olsen, K. E. P. (2007). *Arcobacter*—an emerging food borne pathogen?. NMKL Technical Report, 1-10.
- Harmon, K. M., Wesley, I. (1997). Multiplex PCR for the identification of *Arcobacter* and differentiation of *Arcobacter* butzleri from other *Arcobacters*, *Vet Microbiol*, 58,215-227.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hassane, D. C., Lee, R. B., Mendenhall, M. D., Pickett, C. L. (2001). Cytolethal distending toxin demonstrates genotoxic activity in a yeast model. *Infect. Immun.* 69, 5752-5759.
- Hinton, A., Cason, J. A., Hume, M. E., Ingram, K. D. (2004). Spread of *Campylobacter* spp. during poultry processing in different seasons. *Int. J. Poultry Sci.*, 3(7): 432-437.
- Ho, H. T., Lipman, L. J., ve Gaastra, W. (2006). *Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent! *Vet. Microbiol.* 115:1-13
- Ho, H. T., Lipman, L. J., Hendriks, H. G., Tooten, P. C., Ultee, T., ve Gaastra, W. (2007). Interaction of *Arcobacter* spp. with human and porcine intestinal epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 50(1): 51-58.
- Ho, H. T., Lipman, L. J., ve Gaastra, W. (2008). The introduction of *Arcobacter* spp. in poultry slaughterhouses. *Int J Food Microbiol*, 125, 223-9.
- Houf, K., Tutenel, A., 'de Zutter, L., Hoof, J. V., ve Vandamme, P. (2000). Development of a multiplex PCR assay for simultaneous detection and identification of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii*. *FEMS Microbiol Lett*, 193, 89-94.
- Houf, K., Devriese, L. A., de Zutter, L., Hoof, J. V., ve Vandamme, P. (2001a). Development of a new protocol for the isolation and quantification of *Arcobacter* species from poultry products, *Int J Food Microbiol*, 71, 189-196.)
- Houf, K., Devriese, L. A., de Zutter, L., Hoof, J. V., ve Vandamme, P. (2001b). Susceptibility of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii* to antimicrobial agents used in selective media, *J Clin Microbiol*, 39 (4), 1654-1656.
- Houf, K., De Zutter, L., Van Hoof, J., ve Vandamme, P. (2002). Occurrence and distribution of *Arcobacter* species in poultry processing. *J. Food Prot.* 65: 1233-1239.
- Houf, K., On, S. L. W., Coenye, T., Mast, J, Hoof, J. V., Vandamme, P. (2005). *Arcobacter cibarius* sp nov. , isolated from broiler carcasses. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 713-7.
- Houf, K., ve Stephan, R. (2007). Isolation and characterization of the emerging foodborn pathogen *Arcobacter* from human stool. *Journal of Microbiological Methods* 68(2): 408-413.
- Houf, K., On, S. L. W., Coenye, T., Debruyne, L., De Smet, S., Vandamme, P. (2009). *Arcobacter thereius* sp nov. , isolated from pigs and ducks. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 2599-604.
- ICMSF. (2002). Microorganisms in foods. 7. Microbiological testing in food safety management. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Kluwer Academic/Plenum, New York, NY.
- İnal, T. (1992). Besin Hijyeni, Hayvansal Gıdaların Sağlık Kontrolü, Final Ofset A.S., 1-30.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- İrkin, R. ve Korukluoğlu, M. (2009). Gıda Kaynaklı Bir Patojen: *Arcobacter*. *Gıda* 34(5): 331-335.
- Jacob, J., Lior, H., ve Feuerpfeil, I. (1993). Isolation of *Arcobacter butzleri* from a drinking water reservoir in eastern Germany. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 193(6): 557-562.
- Jiang, Z. D., DuPont, H. L., Brown, E. L., Nandy, R. K., Ramamurthy, T., Sinha, A., Ghosh, S., Guin, S., Gurleen, K., Rodrigues, S., Chen, J. J., McKenzie, R., Steffen, R. (2010). Microbial etiology of travelers' diarrhea in Mexico, Guatemala and India importance of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* and *Arcobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* 48:1417-1419.
- Jones, D. M., Sutcliffe, E. M., ve Curry, A. (1991). Recovery of viable but non-culturable.
- Jribi, H., Sellami, H., Ben Hassena, A., ve Gdoura, R. (2017). Prevalence of Putative Virulence Genes in *Campylobacter* and *Arcobacter* Species Isolated from Poultry and Poultry By-Products in Tunisia. *Journal of Food Protection*: October 2017, Vol. 80, No. 10, pp. 1705-1710.
- Kayman, T., (2012). *Arcobacter* Cinsi: Genel Özellikleri, Epidemiyoloji ve Laboratuvar Tanısı. *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg.* 42(2):43-50.
- Kiehlbauch, J. A., Brenner, D. J., Nicholson, M. A., Baker, C. N., Patton, C. M., Steigerwalt, A. G. ve Wachsmuth, I. K. (1991). *Campylobacter butzleri* sp. nov. Isolated from Humans and Animals with Diarrheal Illness. *Journal Of Clinical Microbiology*, S. 376-385.
- Kim, H. M., Hwang, C. Y., ve Cho, B. C. (2009). *Arcobacter marinus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 531-6.
- Kokare, C. R., Chakraborty, S., Khobade, A. N., ve Mahadik, K. R. (2009). Biofilms: Importance and Applications. *Indian J Biotechnol*, 8: 159-168.
- Kopilovic, B., Ucakar, V., Koren, N., Krek, M., ve Kraigher, A. (2008). Waterborne outbreak of acute gastroenteritis in a coastal area in Slovenia in June and July 2008. *Eurosurveillance* 13:1-3.
- Kownhar, H., Shankar, E. M., Rajan, R., Vengatesan, A., ve Rao, U.A. (2007). Prevalence of *Campylobacter jejuni* and enteric bacterial pathogens among hospitalized HIV infected versus non-HIV infected patients with diarrhoea in southern India. *Scand J Infect Dis* 39, 862-866.
- Lara-Tejero, M., ve Galan, J. E. (2000). A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. *Science* 290, 354357.
- Lau, S.K., Woo, P. C., Teng, J. L., Leung, K. W., ve Yuen, K. Y. (2002). Identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of *Arcobacter butzleri* bacteraemia in a patient with acute gangrenous appendicitis. *Mol Pathol* 55, 182-185.
- Lee, G., ve Murano, A. (2002). Lack of a Cytolethal Distending Toxin among *Arcobacter* Isolates from Various Sources Department of Animal Science, Texas A&M University, 310 Kleberg,

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

College Station, Texas, 77843-2471, USA MS 01-328: Received 28 August 2001/Accepted 23 May 2002.

Lehner, A., Tasara, T. ve Stephan, R. (2005). Review: Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential foodborne pathogen. *International Journal of Food Microbiology* 102:127-135.

Lerner, J., Brumberger, V., ve Preac-Mursic, V. (1994). Severe diarrhea associated with *Arcobacter butzleri*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13, 660-662.

Levican, A., Collado, L., Aguilar, C., Yustes, C., Diéguez, A. L., Romalde, J. L., Figueras, M. J. (2012). *Arcobacter bivalviorum* sp. nov. and *Arcobacter venerupis* sp. nov., new species isolated from shellfish. *Syst Appl Microbiol* 35: 133–8.

Levican, A., Collado, L., Figueras, M. J. (2013). *Arcobacter cloacae* sp. nov. and *Arcobacter suis* sp. nov., two new species isolated from food and sewage. *Syst Appl Microbiol* 36: 22–7.

Li, L., Sharipo, A., Chaves-Olarte, E., Masucci, M. G., Levitsky, V., Thelestam, M., Frisan, T. (2002). The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin activates sensors of DNA damage and repair complexes in proliferating and non-proliferating cells. *Cell. Microbiol.* 4, 87–99.

Long, C., ve Phillips, C. A. (2003). The effect of sodium citrate, sodium lactate and nisin on the survival of *Arcobacter butzleri* NCTC 12481 on chicken, *Food Microbiol*, 20, 495-502.

Luechtefeld, N. W., Wang, W-L. L., Blaser, M. J., Reller, L. B. (1981). Evaluation of Transport and Storage Techniques for Isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* From Turkey Cecal Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 13, 438-443.

Manke, T. R., Wesley, I. V., Dickson, J. S., Harmon, K. M. (1998). Prevalence and genetic variability of *Arcobacter* species in mechanically separated turkey. *J. Food Prot.*, 61 (12):1623-1628.

Mansfield, L. P. ve Forsythe, S. J. (2000). *Arcobacter butzleri*, *A. skirrowii* and *A. cryaerophilus* Potential emerging human pathogens. *Reviews in Medical Microbiology* 11(3).

Mauléon, V. P., Labadi, L., Bouges, N., Ménard, A., ve Mégraud, F. (2006). *Arcobacter butzleri*: underestimated enteropathogen, *Emerg Infect Dis*, 12 (2), 307-309.

McClung, C. R., Patriquin, D. G. ve Davis, R. E. (1983). *Campylobacter nitrofigilis* sp. nov., a Nitrogen-Fixing Bacterium Associated with Roots of *Spartina alterniflora* Loisel. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, Cilt 33, No 3, S 605-612.

Miller, W. G., Parker, C. T., Rubenfield, M., Mendz, G. L., Wösten, M. M. S. M., Ussery, D. W., Stolz, J. F., Binnewies, T. T., Hallin, P. F., Wang, G., Malek, J. A., Rogosin, A., Stanker, L. H., Mandrell, R. E. (2007). The complete genome sequence and analysis of the epsilonproteobacterium *Arcobacter butzleri*. *Plos One* 2:e1358.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Moreno, Y., Botella, S., Alonso, J. L., Ferrus, M. A., Hernandez, M. ve Hernandez, J. (2003). Specific detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* strains in water and sewage by PCR and fluorescent in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 69(2): 1181-1186.
- Neill, S. D., Campbell, J. N., O'Brien, J. J., Weatherup, S. T. C. ve Ellis, W. A. (1985). Taxonomic Position of *Campylobacter cyvaevophila* sp. nov. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, Cilt 35, No 3, S 342-56.
- Nougayrede, J. P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Buchrieser, C., Hacker, J., Dobrindt, U., Oswald, E. (2006). *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* 2006, 313, 848–851.
- On, S. L. W., Stacey, A., Smyth, J. (1995). Isolation of *Arcobacter butzleri* from a neonate.
- On, S. L. W., Jensen, T. K., Bille-Hansen, V., Jorsal, S. E., ve Vandamme, P. (2002). Prevalence and diversity of *Arcobacter* spp. isolated from the internal organs of spontaneous porcine abortions in Denmark. *Vet. Microbiol.* 85: 159-167.
- Öngen, B., Nazik, H., ve Kaya, I., (2007). Rutin Dışkı Kültürlerinde Üretilen *Campylobacter* Türleri ve Antibiyotik Duyarlılıkları: 5 Yıllık Sonuçları ANKEM Dergisi, 21 (1): 37-41.
- Patyal, A., Rathore, R. S., Mohan, H. V., Dhama, K., ve Kumar, A. (2011). Prevalence of *Arcobacter* spp. in humans, animals and foods of animal origin including sea food from India. *Transboundary and emerging diseases*, 58(5), 402- 410.
- Pentimalli, D., Pegels, N., Garcia, T., Marti'n, R., ve Gonzalez, I. (2008). Specific PCR Detection of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, *Arcobacter skirrowii*, and *Arcobacter cibarius* in Chicken Meat MS 08-536: Received 23 October 2008/Accepted 28 December 2008.
- Perez-Cataluna, A., Salas-Masso, N., ve Figueras, M. J. (2018). *Arcobacter canalis* sp. nov., isolated from a water canal contaminated with urban sewage. *Int J Syst Evol Microbiol* 68(4): 1258-1264.
- Phillips, C. A. (2001). *Arcobacter* spp in food: isolation, identification and control. *Trends in Food Science & Technology* 12, 263-275.
- Rice, E. W., Rodgers, M. R., Wesley, I. V., Johnson, C. H., ve Tanner, S. A. (1999). Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water. *Lett. Appl. Microbiol.* 28:31–35.
- Rivas, L., Fegan, N., ve Vanderlinde, P. (2004). Isolation and characterisation of *Arcobacter butzleri* from meat, *Int. J. Food Microbiol.*, 91:31-41.
- Romero, J., Varela, M. G., Laclette, J. P., ve Espejo, R. T. (2002). Bacterial 16S rRNA gene analysis revealed that bacteria related to *Arcobacter* spp. constitute an abundant and common component of the Oyster Microbiota (*Tiostrea chilensis*), *Microb Ecol*, 44,365–371.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Samie, A., Obi, C. L., Barrett, L. J., Powell, S. M., ve Guerrant, R. L. (2007). Prevalence of *Campylobacter* species, *Helicobacter pylori* and *Arcobacter* species in stool samples from the Venda region, Limpopo, South Africa: studies using molecular diagnostic methods. *J. Infect.* 54:558–566 .
- Sasi Jyothsna, T. S., Rahul, K., Ramaprasad, E. V. V., Sasikala, C., ve Ramana, C. V. (2013). *Arcobacter anaerophilus* sp. nov., isolated from an estuarine sediment and emended description of the genus *Arcobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 4619–4625.
- Savaşan, S. ve Çiftci, A., (2003). *Arcobacter* Türleri: Genel Özellikler ve Sınıflandırma. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi* Cilt: 1, Sayı: 2, Sayfa: 37-48.
- Shenker, B. J., Hoffmaster, R. H., Zekavat, A., Yamaguchi, N., Lally, E. T., Demuth, D.R. (2001). Induction of apoptosis in human T cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin is a consequence of G2 arrest of the cell cycle. *J. Immun.* 2001, 167, 435–441.
- Smith, J., Tho, L. M., Xu, N., Gillespie, D. A. (2010). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv. Cancer Res.* 108, 73–112.
- Snelling, W., Matsuda, J., Moore, M. J. E., ve Dooley, J. S. (2006). Under the microscope: *Arcobacter*. *Lett. Appl. Microbiol.* 42:7–14.
- Son, I., Englen, M. D., Berrang, M. E., Fedorka-Cray, P. J., ve Harrison, M. A. (2006). Genetic diversity of *Arcobacter* and *Campylobacter* on broiler carcasses during processing. *J. Food Prot.* 69:1028-1033.
- Son, I., Englen, M. D., Berrang, M. E., Fedorka-Cray, P. J. Ve Harrison, M. A. (2007). Prevalence of *Arcobacter* and *Campylobacter* on broiler carcasses during processing. *International journal of food microbiology* 113(1): 16-22.
- Squinazi, F., Marin, M., Derimay, R., Woodward, D. L., Lior, H. (1995). Biotypes and serogroups of poultry strains of *Arcobacter* spp. isolated in France. 8th International Workshop on *Campylobacter*,
- Stampi, S., Varoli, O., Zanetti, F. ve De Luca, G., (1993). *Arcobacter cryaerophilus* and thermophilic *campylobacters* in a sewage treatment plant in Italy: two secondary treatments compared. *Epidemiol. Infect.*, 110, 633-639.
- Talay, F., Molva, C. ve Atabay, H. I. (2016). Isolation and identification of *Arcobacter* species from environmental and drinking water samples. *Folia Microbiol (Praha)*61(6): 479-484.
- Tanaka, R., Cleenwerck, I., Mizutani, Y., Lehata, S., Bossier, P., ve Vandamme, P. (2017). *Arcobacter haliotis* sp. nov., isolated from abalone species *Haliotis gigantea*. *Int J Syst Evol Microbiol* 67(8): 3050-3056.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Taylor, D. N., Kiehlbauch, J. A., Tee, W., Pitarangsi, ve C., Echeverria, P. (1991). Isolation of group 2 aerotolerant *Campylobacter* species from Thai children with diarrhea. *Journal of Infectious Diseases*, 163, 1062-1067.
- Tazegül, E., (2010). Kars Bölgesindeki Su Kaynaklarından *Arcobacter* spp. İzolasyonu ve Multipleks PCR ile İdentifikasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Tee, W., Baird, R., Dyll-Smith, M., ve Dwyer, B. (1988). *Campylobacter cryaerophila* Isolated from a Human. *Journal Of Clinical Microbiology*, Cilt: 26, No: 12, S 2469-2473.
- Temel, A., ve Eraç, B. (2018). Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir Bakteriyel Biyofilmler: Saptama Yöntemleri ve Antibiyotik Direncindeki Rolü. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2018;48(1):1-13 doi:10.5222/TMCD.2018.001.
- Tunçel, M. (2017). Kütahya İlinden Toplanan Su Örneklerinde *Arcobacter* Türlerinin İzolasyonu Ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Turantaş, F. (2000). Tavuk İşletmelerinde Haşlama ve Soğutma Suları ile Karkasların Mikrobiyal Yükünün ATP Biyoluminesans Yöntemiyle Kısa Sürede Saptanması. *Dünya Gıda Dergisi*, Şubat. s87.
- Utzler, J. P., ve Vandamme, P. (2004). *Arcobacter* species in humans. *Emerg Infect Dis* 10, 1863-1867.
- Van Driessche, E., ve Houf, K. (2007). Discrepancy between the occurrence of *Arcobacter* in chickens and broiler carcass contamination. *Poult. Sci.* 86: 744-751.
- Van Driessche, E., Houf, K., Van Hoof, J., De Zutter, L., ve Vandamme, P. (2003). Isolation of *Arcobacter* species from animal feces. *FEMS Microbiol. Lett.* 229:243–248.
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R., De Ley, J. (1991a). Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* Taxonomy – emendation of Generic Descriptions and Proposal of *Arcobacter* Gen. Nov. *Int JSyst Bacteriol* 41:88–103.
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R. ve De Ley, J., (1991b). Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* Taxonomy: Emendation of Generic Descriptions and Proposal of *Arcobacter*. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, Cilt: 41, No: 1, S 88-103.
- Vandamme, P., ve Goossens, H. (1992a). Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter*: a review. *Zentralbl Bakteriologie* 276, 447-472.
- Vandamme, P., Pugina, P., Benzi, G., Van Etterijck, R., Vlaes, L., Kersters, K., Butzler, J. P., Lior, H., Lauwers, S. (1992b). Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian school. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2335–2337.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vandamme, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Mels, L., Hoste, B., Dewettinck, D., Vlaes, L., Van Den Borre, C., Higgins, R., Hommez, J., Kersters, K., Butzler, J. P., Goossens, H. (1992c). Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:344–356.
- Vandamme, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Mels, L., Hoste, B., Dewettinck, D., Vlaes, L., Van Den Borre, C., Higgins, R., Hommez, J., Kersters, K., Butzler, J. P., Goossens, H. (1992d). Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* Comb-Nov and *Arcobacter skirrowii* Sp-Nov, an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. *Int J Syst Bacteriol* 42: 344–56.
- Vandamme, P., Pugina, P., Benzi, G., Etterijck, R. V., Vlaes, L., Kersters, K., Butzler, J.-P., Lior, H. ve Lauwers, S. (1992e). Outbreak of Recurrent Abdominal Cramps Associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian School. *Journal Of Clinical Microbiology*, Cilt: 30, No: 9, S: 2335-2337.
- Vandamme, P., Giesendorf, B. A., Van Belkum, A., Pierard, D., Lauwers, S., Kersters, K., Butzler, J. P., Goossens, H., ve Quint, W. G. (1993). Discrimination of epidemic and sporadic isolates of *Arcobacter butzleri* by polymerase chain reaction-mediated DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol* 31, 3317-3319.
- Villarruel-lopez, A. M., Marquezgonzalez, L. E., Garaymartinez, H., Zepeda, A., Castillo, L., Mota de la garza, E. A., ve TorresVitela, R. (2003). Isolation of *Arcobacter* spp. from Retail Meats and Cytotoxic Effects of Isolates against Vero Cells. MS 02-126.
- Wang, W. L., ve Blaser, M. J., (1986). Detection of Pathogenic *Campylobacter* Species in Blood Culture Systems. *J Clin Microbiol.* 23(4):709–714. SMIBERT, R.M., 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriolog.* 2th Ed. USA: Springer, 145–1165.
- Wesley, I. V., ve Baetz, A. L. (1999). Natural and experimental infections of *Arcobacter* in poultry. *Poult Sci* 78 (4):536-45.
- Wesley, I., ve Miller, W. G. (2010). *Arcobacter*: an opportunistic human foodborne pathogen. In: Scheld WM, Grayson ML and Hughes JM eds. *Emerging Infections* 9. Washington: ASM Press, 185–211.
- Wirsen, C. O., Sievert, S. M., Cavanaugh, C. M., Molyneaux, S. J., Ahmad, A., Taylor, L. T., DeLong, E. F., ve Taylor, C. D. (2002). Characterization of an autotrophic sulfideoxidizingmarine *Arcobacter* spp. that produces filamentous sulfur, *Appl Environ. Microbiol*, 68(1), 316-325.
- Woo, P. C., Chong, K. T., Leung, K., Que, T., ve Yuen, K. (2001). Identification of *Arcobacter cryaerophilus* isolated from a traffic accident victim with bacteremia by 16S ribosomal RNA gene sequencing. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 40:125–127.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Wybo, I., Breynaert, J., Lauwers, S., Lindenburg, F., ve Houf, K. (2004). Isolation of *Arcobacter skirrowii* from a patient with chronic diarrhea. *J Clin Microbiol* 42, 1851-1852.

Zhang, Z., Yu, C., Wang, X., Yu, S., ve Zhang, X. H. (2016). *Arcobacter pacificus* sp. nov., isolated from seawater of the South Pacific Gyre. *Int J Syst Evol Microbiol* 66(2): 542-547.

