

**T.C.  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARS YÖRESİNDEKİ SIĞIR, KOYUN ve İNSANLARDAN  
TERMOFİLİK CAMPYLOBACTERLERİN İZOLASYONU,  
İDENTİFİKASYONU ve MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ**

**Sinan KARAKUŞ**

**DOKTORA TEZİ**

**Danışman  
Doç. Dr. Ahmet ÜNVER**

**KARS-2011**

**T.C.  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARS YÖRESİNDEKİ SIĞIR, KOYUN ve İNSANLARDAN  
TERMOFİLİK CAMPYLOBACTERLERİN İZOLASYONU,  
İDENTİFİKASYONU ve MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ**

**Sinan KARAKUŞ**

**DOKTORA TEZİ**

**Danışman  
Doç. Dr. Ahmet ÜNVER**

**Bu çalışma KAÜ Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Fonu tarafından  
desteklenmiştir. Proje No: 2009-VF-08**

**KARS-2011**

## **Onay Sayfası**

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>Sayfa No</b>
BAŞLIK SAYFASI	I
İÇ BAŞLIK SAYFASI	II
ONAY SAYFASI	III
İÇİNDEKİLER	IV
TEŞEKKÜR	VII
SİMGELER KISALTMALAR	VIII
TABLO LİSTESİ	X
ŞEKİL LİSTESİ	XII
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgi	1
1.1.1. Etiyoloji	1
1.1.2. Taksonomi	6
1.1.3. Epidemiyoloji	7
1.1.3.1. Bulaşma ve Taşınma Yolları	7
1.1.3.2. Prevalans	9
1.1.4. Patogenez ve Virulens	12
1.1.5. Antimikrobiyal Dirençlilik	17
1.1.6. Bağışıklık	18
1.1.7. Klinik Belirtiler	18
1.1.8. İnsanlarda <i>Campylobacter</i> İnfeksiyonları	19
1.1.9. Tanı	21
1.2. <i>Campylobacter jejuni</i> ve <i>C. coli</i> 'nin Moleküler Tiplendirilmesi	26
1.2.1. Fenotiplendirme	26
1.2.1.1. Serotiplendirme	26
1.2.1.2. Biyotiplendirme	27
1.2.2. Genotiplendirme	28
1.2.2.1. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)	30
1.2.2.2. Macrorestriction Profile-Pulsed-Field Gel Electrophoresis (mrp-PFGE)	32
1.2.2.3. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)	32
1.2.2.4. Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)	34

1.2.2.5. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)	34
1.2.2.6. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)	35
1.2.2.7. Multilocus Sequence Typing (MLST)	36
1.2.2.8. Flagellin ( <i>FlaA</i> ) Typing	36
1.2.2.9. Hip O Typing	38
1.2.2.10. Ribotiplendirme	38
1.2.3. Tedavi ve Koruma	39
1.3. Amaç	41
2. GEREÇ VE YÖNTEM	42
2.1. Örneklerin Toplanması	42
2.1.1. Sığırlardan Örnek Toplanması	42
2.1.2. Koyunlardan Örnek Toplanması	42
2.1.3. İnsanlardan Örnek Toplanması	42
2.2. <i>Campylobacter</i> spp. İzolasyonu ve İdentifikasyonu	43
2.2.1. <i>Campylobacter</i> spp. İzolasyonu	43
2.2.2. Multipleks Zincirleme Polimeraz Reaksiyonu (mPCR) ile <i>C. jejuni</i> ve <i>C. coli</i> 'nin İdentifikasyonu	44
2.2.2.1. DNA Ekstraksiyonu	44
2.2.2.2. Multipleks Zincirleme Polimeraz Reaksiyonu (mPCR)	45
2.3. <i>Campylobacter jejuni</i> ve <i>C. coli</i> 'nin Moleküler Tiplendirilmesi	46
2.3.1. Flagellin A ( <i>FlaA</i> ) Geninin PCR Amplifikasyonu	46
2.3.2. <i>FlaA</i> Tiplendirme (Flagellin A Geninin Restriction Fragment Length Polymorphism Analizi)	46
2.4. İstatistiksel Analiz	47
2.5. Kültür ve PCR Aşamasında Kullanılan Ayıraçlar	49
2.5.1. İzolasyonda Kullanılan Ayıraçlar	49
2.5.2. Zincirleme Polimeraz Reaksiyonu (PCR) İşleminde Kullanılan Ayıraçlar	51
2.5.2.1. DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Besiyerleri ve Ayıraçlar	51
2.5.2.2. Zincirleme Polimeraz Reaksiyonu (PCR) Analizinde Kullanılan Ayıraçlar	52
2.5.2.3. Zincirleme Polimeraz Reaksiyonu -Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) Analizinde Kullanılan Ayıraçlar	53

2.5.2.4. Elektroferez İşleminde Kullanılan Ayıraçlar	53
3. BULGULAR	55
3.1. <i>Campylobacter</i> İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	55
3.1.1 Sığırlarda <i>Campylobacter</i> İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	55
3.1.2. Koyunlarda <i>Campylobacter</i> İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	55
3.1.3. İnsanlarda <i>Campylobacter</i> İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	56
3.2. Multipleks Zincirleme Polimeraz Reaksiyonu (mPCR) ile <i>C. jejuni</i> ve <i>C. coli</i> İdentifikasyon Bulguları	57
3.2.1. Sığırlarda mPCR ile <i>C. jejuni</i> ve <i>C. coli</i> 'nin İdentifikasyon Bulguları	57
3.2.2. Koyunlarda mPCR ile <i>C. jejuni</i> ve <i>C. coli</i> 'nin İdentifikasyon Bulguları	59
3.2.3. İnsanlarda mPCR ile <i>C. jejuni</i> ve <i>C. coli</i> 'nin İdentifikasyon Bulguları	60
3.3. Flagellin A ( <i>FlaA</i> ) Tiplendirme Bulguları	62
3.3.1. Sığırlarda <i>FlaA</i> Tiplendirme Bulguları	62
3.3.1.1. Sığırlardan İzole Edilen <i>C. jejuni</i> İzolatlarının <i>FlaA</i> Tiplendirme Bulguları	62
3.3.1.2. Sığırlardan İzole Edilen <i>C. coli</i> İzolatlarının <i>FlaA</i> Tiplendirme Bulguları	65
3.3.2. Koyunlarda <i>FlaA</i> Tiplendirme Bulguları	67
3.3.2.1. Koyunlardan İzole Edilen <i>C. jejuni</i> İzolatlarının <i>FlaA</i> Tiplendirme Bulguları	67
3.3.2.2. Koyunlardan İzole Edilen <i>C. coli</i> izolatlarının <i>FlaA</i> Tiplendirme Bulguları	70
3.3.2.3. İnsanlardan İzole Edilen <i>C. jejuni</i> ve <i>C. coli</i> İzolatlarının <i>FlaA</i> Tiplendirme Bulguları	73
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	75
5. ÖZET	86
6. SUMMARY	88
7. KAYNAKLAR	90
8. ÖZGEÇMİŞ	119

**TEŞEKKÜR**

Doktora çalışmam boyunca danışmanlığımı üstlenen ve her zaman destek olan hocam Doç. Dr. Ahmet ÜNVER başta olmak üzere, Anabilim Dalımızın diğer saygıdeğer öğretim üyeleri Prof. Dr. Salih OTLU ve Prof. Dr. Mitat ŞAHİN'e teşekkür etmeyi borç bilirim. Çalışmalarım sırasında devamlı olarak bilgilerinden yararlandığım ve özellikle laboratuvar çalışmalarında deneyim kazanmamda yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Özgür ÇELEBİ, Arş.Gör.Dr. Fatih BÜYÜK, Dr. Doğan AKÇA ve Arş.Gör. Aliye GÜLMEZ'e minnettarlığımı bildiririm. Çalışma materyallerinin toplanmasındaki katkıları nedeniyle Veteriner Hekim Şafak Çağlar GÜLYİYEN ile tüm Kars Et Kombinası ve Belediye mezbahası çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Ayrıca maddi ve manevi desteklerini her zaman arkamda hissettiğim annem ve babama, doktora çalışmam süresince iyi ve kötü günlerimde hep yanımda olan ve beni sabır ve anlayışla karşılayan Biyoloji Öğretmeni eşim Melahat KARAKUŞ ve oğlum Eren KARAKUŞ'a, dünya ya gelmeleriyle birlikte evimizin neşesi ve moral kaynağı olan ikizlerimiz Ege KARAKUŞ'a ve Efe KARAKUŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

<b>Simge-Kısaltma</b>	<b>Acıklama</b>
<b>ABC</b>	ATP Binding Casset
<b>AFLP</b>	Amplified Fragment Length Polymorphism
<b>Bp</b>	Baz Çifti
<b>CadF</b>	Campylobacter Adesion to Fibrinonektin
<b>cAMP</b>	Cyclic Adenozin Mono Phosphate
<b>CDT</b>	Cytolethal Distending Toxic
<b>CDC</b>	Centers for Disease Control and Prevention
<b>CT</b>	<i>V. cholorea</i> Toxine
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>FAO</b>	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı
<b>FlaA</b>	Flagellin A
<b>FTS</b>	Fizyolojik Tuzlu Su
<b>GBS</b>	Guillain-Barre Syndrom
<b>HipO</b>	Benzoylglycine Amidohydrolase (Hippuricase)
<b>JlpA</b>	Jejuni lipoprotein A
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>LPS</b>	Lipopolisakkarit
<b>LOS</b>	Lipooligosakkarit
<b>MR</b>	Metil Red
<b>MLST</b>	Multilocus Sequence Typing
<b>mPCR</b>	Multipleks Zincirleme Polimeraz Reaksiyonu
<b>mrp-PFGE</b>	Macrorestriction Profile- Pulsed-Field Gel Electrophoresis
<b>PCR</b>	Zincirleme Polimeraz Reaksiyonu
<b>PCR-RFLP</b>	Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Lenght Polymorphism
<b>PFGE</b>	Pulsed Field Gel Electrophoresis
<b>RAPD</b>	Random Amplified Polymorphic DNA
<b>RE</b>	Restriction Enzyme
<b>RIA</b>	Radio Immuno Assay
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>RSKK</b>	Refik Saydam Kültür Kodu



<b>SDS</b>	Sodium Dodezil Sulfate
<b>TBE</b>	Tris-Boric acit-EDTA
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>UV</b>	Ultra Violet
<b>VBNC</b>	Viable but Non-Culturable
<b>VP</b>	Voges-Proskauer
<b>WHO</b>	Dünya Sağlık Örgütü

<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1.</b> Termofilik <i>Campylobacter</i> Türlerinin Üreme Özellikleri	3
<b>Tablo 2.</b> <i>Campylobacter</i> Türlerinin Özellikleri	5
<b>Tablo 3.</b> <i>Campylobacter</i> Türlerinin Sınıflandırılması	6
<b>Tablo 4.</b> <i>C. jejuni</i> İzolasyonu İçin Seçici Besiyerlerinin Formülleri	23
<b>Tablo 5.</b> Çalışmada İncelenen Örneklerin Canlı Türlerine Göre Dağılımı	43
<b>Tablo 6.</b> <i>C. jejuni</i> ve <i>C. coli</i> İzolatlarının PCR Analizinde ve Tiplendirilmesinde Kullanılan Primerler	48
<b>Tablo 7.</b> Konvansiyonel Kültür Yöntemi İle Sağlıklı Görünümlü Sığırlardan İzole Edilen <i>Campylobacter</i> spp. İzolatlarının Örnek Türüne Göre Dağılımı ve İzolasyon Oranı	55
<b>Tablo 8.</b> Konvansiyonel Kültür Yöntemi İle Sağlıklı Görünümlü Koyunlardan İzole Edilen <i>Campylobacter</i> spp. İzolatlarının Örnek Türüne Göre Dağılımı ve İzolasyon Oranı	56
<b>Tablo 9.</b> Konvansiyonel Kültür Yöntemi İle Sağlıklı Görünümlü İnsanlardan İzole Edilen <i>Campylobacter</i> spp. İzolatlarının Örnek Türüne Göre Dağılımı ve İzolasyon Oranı	56
<b>Tablo 10.</b> Sağlıklı Görünümlü Sığırlardan Elde Edilen <i>Campylobacter</i> İzolatlarının mPCR Bulguları	57
<b>Tablo 11.</b> Sağlıklı Görünümlü Koyunlardan Elde Edilen <i>Campylobacter</i> İzolatlarının mPCR Bulguları	59
<b>Tablo 12.</b> Sağlıklı Görünümlü İnsanlardan Elde Edilen <i>Campylobacter</i> İzolatlarının mPCR Bulguları	61
<b>Tablo 13.</b> Sığırlardan Elde Edilen <i>C. jejuni</i> İzolatlarının <i>flaA</i> Tiplendirme Bulguları	65
<b>Tablo 14.</b> Sığırlardan Elde Edilen <i>C. coli</i> İzolatlarının <i>flaA</i> Tiplendirme Bulguları	67
<b>Tablo 15.</b> Koyunlardan Elde Edilen <i>C. jejuni</i> İzolatlarının <i>flaA</i> Tiplendirme Bulguları	70
<b>Tablo 16.</b> Koyunlardan Elde Edilen <i>C. coli</i> İzolatlarının <i>flaA</i> Tiplendirme Bulguları	72

**Tablo 17.** İnsanlardan Elde Edilen *C. jejuni* ve *C. coli* İzolatlarının *flaA* Tiplendirme Bulguları

73

**ŞEKİL LİSTESİ****Sayfa No**

- Şekil 1.** Seçici Besiyerinde Üreyen *C. jejuni* Kolonilerinden Hazırlanan Gram Boyalı Preparatların, 100x Büyütmedeki Mikroskopik Görüntüsü. 2
- Şekil 2.** *C. coli*' nin Preston Campylobacter Selektif Agardaki Kolonileri. 3
- Şekil 3.** *C. jejuni* 'nin Su, Gıda ve Çevredeki Yaşam Siklusu 9
- Şekil 4.** Sığırlarda *Campylobacter* spp. Olarak İdentifiye Edilen Kültürlerden Elde Edilen DNA'ların *C. jejuni* ve *C. coli* Tür Spesifik Primerler Kullanılarak Yapılan mPCR Analizi Sonucu Oluşan Ürünlerin Ethidium Bromide İle Boyanmış Agaroz Jeldeki Görünümü. 58
- Şekil 5.** Koyunlarda *Campylobacter* spp. Olarak İdentifiye Edilen Kültürlerden Elde Edilen DNA'ların *C. jejuni* ve *C. coli* Tür Spesifik Primerler Kullanılarak Yapılan mPCR Analizi Sonucu Oluşan Ürünlerin Ethidium Bromide İle Boyanmış Agaroz Jeldeki Görünümü. 60
- Şekil 6.** İnsanlarda *Campylobacter* spp. Olarak İdentifiye Edilen Kültürlerden Elde Edilen DNA'ların *C. jejuni* ve *C. coli* tür Spesifik Primerler Kullanılarak Yapılan mPCR Analizi Sonucu Oluşan Ürünlerin Ethidium Bromide İle Boyanmış Agaroz Jeldeki Görünümü. 61
- Şekil 7.** *C. jejuni* ve *C. coli* Türlerinin *flaA* Genine Spesifik Primerler Kullanılarak Yapılan PCR Analizi Sonucu Oluşan Ürünlerin Ethidium Bromide İle Boyanmış Agaroz Jeldeki Görünümü. 63
- Şekil 8.** Sığırların Safra ve Barsak İçeriği Örneklerinden Elde Edilen *C. jejuni* İzolatlarındaki *flaA* Geninin *DdeI* ile Muamele Edilmiş PCR Ürünlerinin Ethidium Bromide İle Boyanmış Agaroz Jeldeki Görünümü. 64
- Şekil 9.** Sığırların Safra ve Bağırsak İçeriği Örneklerinden Elde Edilen *C. coli* İzolatlarındaki *flaA* Geninin *DdeI* ile Muamele Edilmiş PCR Ürünlerinin Ethidium Bromide İle Boyanmış Agaroz Jeldeki Görünümü. 66
- Şekil 10.** Koyunların Safra Örneklerinden Elde Edilen *C. jejuni* İzolatlarındaki *flaA* Geninin *DdeI* ile Muamele Edilmiş PCR Ürünlerinin Ethidium Bromide İle Boyanmış Agaroz Jeldeki Görünümü. 68
- Şekil 11.** Koyunların Rektal Svap Örneklerinden Elde Edilen *C. jejuni* İzolatlarındaki *flaA* Geninin *DdeI* ile Muamele Edilmiş PCR Ürünlerinin Ethidium Bromide İle Boyanmış Agaroz Jeldeki Görünümü. 69

- Şekil 12.** Koyunların Rektal Svap Örneklerinden Elde Edilen *C. coli* İzolatlarındaki *flaA* Geninin *DdeI* ile Muamele Edilmiş PCR Ürünlerinin Ethidium Bromide İle Boyanmış Agaroz Jeldeki Görünümü. 71
- Şekil 13.** İnsanların Dışkı Örneklerinden Elde Edilen *C. jejuni* ve *C. coli* İzolatlarındaki *flaA* Geninin *DdeI* ile Muamele Edilmiş PCR Ürünlerinin Ethidium Bromide İle Boyanmış Agaroz Jeldeki Görünümü. 74

## 1. GİRİŞ

### 1.1. Genel Bilgi

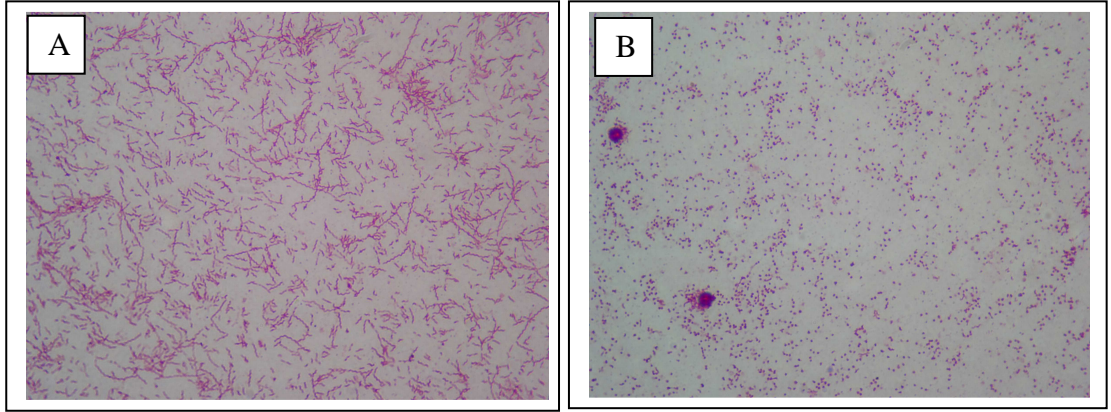
#### 1.1.1. Etiyoloji

Kampilobakteriyozis tüm dünyada yaygın bir zoonoz olup, *Campylobacter* cinsi içerisinde yer alan türler ilk kez 1880 yılında Theodore Escherich tarafından ishali çocukların dışkıсында tanımlanmış ve “Kolera infantum” olarak isimlendirilmiş fakat katı besiyerinde üretilmemiştir (39, 85). Kampilobakterlerin hayvanlarda abortlara ve ishale yol açtığı 20. yüzyılın başından beri bilinmekle birlikte ilk kez İngiliz veteriner hekimler, McFadyean ve Stockman epizotik düşük yapan koyunların plasentasında vibrioya benzeyen bir bakteri bulduklarını bildirmişler ve bu mikroorganizmayı morfolojik yapılarından dolayı *Vibrio* cinsi içerisinde değerlendirerek “*Vibrio fetus*” olarak adlandırmışlardır (161, 173). Termofilik *Campylobacter*'ler ise ilk kez Jones ve arkadaşları tarafından 1931 yılında sığır ve koyunların bağırsaklarında saptanarak *Vibrio jejuni* adını almış ve sığırların kış dizanterisinin sebebi olarak gösterilmiştir (127). Daha sonra domuz dizanterisinden sorumlu tutulan bir başka etken *V. coli* olarak adlandırılmıştır (66). *Campylobacter* cinsine ait türler spiral görüntülerinden dolayı 1963 yılına kadar *Vibrio* cinsi içinde yer almıştır. King adlı araştırmacı bu mikroorganizmaları, ishali çocukların kanında göstermiş, ancak klasik vibriolardan biyokimyasal ve antijenik yönden farklı olduğu için, bu vibrioları “related vibrio” olarak tanımlamıştır (135). Sebald ve Veron 1963 yılında related vibrio'ların G+C oranının klasik halofilik vibriolardan farklı olduğunu belirleyerek bu mikroorganizmaların “*Campylobacter: kıvrık bakteri*” adı altında yeni bir cins olarak adlandırılmasını önermişlerdir (39). Bu türlerin oksijenli ortamda üreyememeleri, karbonhidratları fermente edememeleri ve DNA baz yapısındaki guanin + sitozin (G+C) oranlarının farklılıkları, bu yıldan itibaren *Campylobacter* olarak isimlendirilmelerine yol açmıştır (131, 235).

Kampilobakter türlerinin izolasyonu için selektif besi yerleri ve filtrasyon tekniklerinin 1973 yılından itibaren yaygın olarak kullanılmaya başlanması ile birlikte bu türlerin insan ve birçok hayvan türünde çok yaygın olarak buldukları ve infeksiyonlara neden oldukları ortaya konulmuş olup, bu genusa ait çok sayıda türün genomik haritasıda çıkarılmıştır (39, 55, 240).

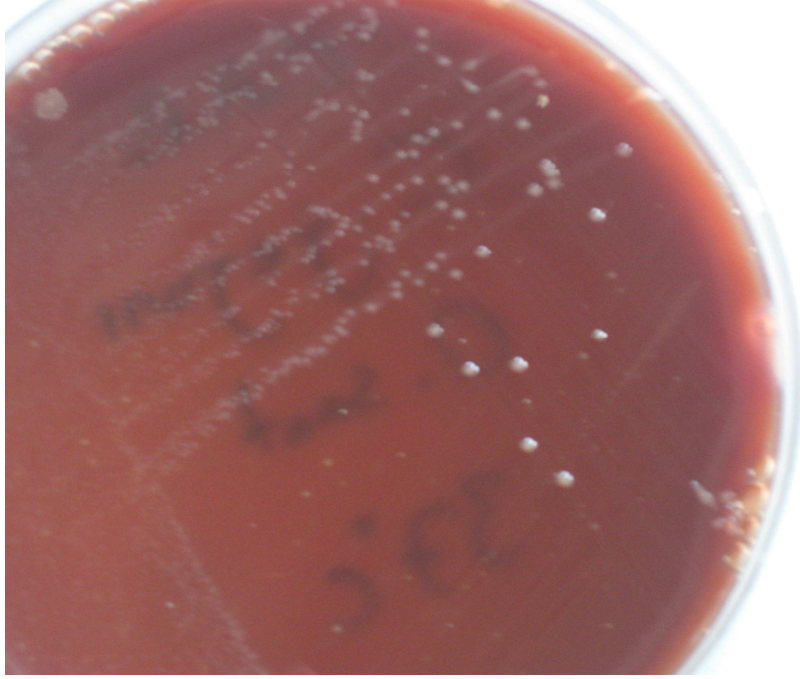
Kampilobakterler Gram negatif, 0,2-0,3 X 1,5-2,5 µm boyutlarında “S” harfi, virgül veya martı kanadı şeklinde mikroorganizmalardır. Kıvrımın açıklığı ortalama 1,1 µm'dir. Kampilobakterlerin üreme sıcaklıkları 30-43 °C arasında değişmekle birlikte genellikle optimal üreme sıcaklıkları 37 °C olup termofilik olanlar 42-43 °C'de üreme özelliğine sahiptirler. Kampilobakterler mikroaerofilik özellikte olup, optimal üremeleri için % 5 O<sub>2</sub>, % 10 CO<sub>2</sub> ve % 85 N<sub>2</sub> içeren ortamlara ihtiyaç duymaktadır (170) (Tablo 2).

Kampilobakterler oksidatif stres gibi faktörlerin bulunduğu ortamlarda spesifik şekillerini kaybedip, kokoid forma dönüşmektedirler. Kokoid formlar canlı olmalarına rağmen in vitro ve in vivo ortamlarda ürememektedir (24) (Şekil 1B).



**Şekil 1:** Seçici besiyerinde üreyen *C. jejuni* kolonilerinden hazırlanan Gram boyalı preparatların, 100X büyütmedeki mikroskopik görüntüsü. A-Karakteristik spiral morfoloji B- *C. jejuni*'nin kokoid morfolojisi.

Termofilik *Campylobacter*'ler her iki uçlarına yerleşmiş birer adet flagella ile aktif hareket etmektedir. Flagella ile ilgili *FlaA* ve *FlaB* genlerine sahiptirler. Kapsül ve fimbria bulundurmazlar. Fimbrialara sahip olmayan kampilobakter türleri plazmid taşırlar ve bazı plazmidlerin antibiyotik dirençliliğinde rol oynadıkları bildirilmiştir (117, 218). Kampilobakterlerin izolasyonu için zenginleştirilmiş ortamlara ve selektif besiyerlerine ihtiyaç vardır. Besiyerlerinde kampilobakterlerin oluşturduğu koloni morfolojileri oldukça değişkenlik göstermektedir. Koloniler genellikle pigment meydana getirmezler ve kanlı agarda hemoliz oluşturmazlar. Kolonilerin oluşması için ortalama 48-72 saat süreye gereksinim vardır (4, 12).



**Şekil 2:** *C. coli*' nin Preston Campylobacter Selektif Agardaki kolonileri.

Kampilobakterler karbonhidratları fermente edemedikleri için gereksinimleri olan enerjiyi trikarboksilik asit döngüsünden sağlayan bir respiratorik mekanizmaya sahiptirler. Oksidaz pozitif, lipaz aktiviteleri, jelatin, üre, Metil Red (MR) ve Voges-Proskauer (VP) testleri negatiftir. Üreme sıcaklık limitleri, katalaz, nitrat, hippurat, selenit redüksiyonu, H<sub>2</sub>S, tuz ve glisin tolerans özellikleri türler arasında farklılıklar gösterir (4, 13, 117) (Tablo 1).

**Tablo 1.** Termofilik *Campylobacter* türlerinin üreme özellikleri (117).

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



Üremenin optimizasyonu için besiyerlerine protein, yağ ve eser element kaynağı olarak %7-10 oranında defibrine at, koyun veya insan kanı ve B vitamin kompleksleri, kampilobakterler için toksik olduğu bilinen süper oksit anyonları ve hidrojen peroksit gibi oksijen radikallerini nötralize etmek içinde, şarkoal, hemin, hematin, ferröz sülfat, sodyum metabisulfit ve sodium pürivat kombinasyonundan oluşan supplementler ilave edilmektedir. Besiyerine kazein ilavesi *C. lari* 'nin üremesini arttırmaktadır. Besiyerlerine ilave edilen defibrine kan metabolik ihtiyaçların yanı sıra besiyerinde biriken toksik oksijen radikallerini yıkan katalaz, peroksidaz ve süperoksit dismutaz enzimlerini de içermektedir (101, 124).

Kampilobakterler besin yetersizliği, yüksek ya da düşük sıcaklık ve aerop ortam gibi olumsuz şartlarda, mikroskopta kokoid şekilde görülen canlı fakat kültüre edilemeyen Viable but non-culturable (VBNC) formuna dönüşmektedir. *C. jejuni* çevreye adaptasyonunu sağlayan VBNC formuna, *C. coli*'ye göre de daha hızlı dönüşmekte ve bu formda, yüzey sularında uzun süre aktivitesini koruyabilmektedir. Ancak, kültür plağındaki kampilobakterlerin tümü kokoidal forma dönüştüğünde, pasajlandıklarında üretilmemektedir. VBNC formunda alınan *C. jejuni*'nin intestinal fazdan sonra tekrar kültüre edilebilir hale geldiği, adezyon ve enteropatojenite özelliğini yeniden kazandığı, hayvanlar üzerinde deneysel olarak gösterilmiştir (45).

Kampilobakterlerin DNA baz kompozisyonları % 29 ile % 46 arasında farklılık göstermekle birlikte, termofilik kampilobakter DNA'larının G + C oranları diğer kampilobakter türlerinden ve birbirlerinden farklıdır. *C. jejuni* suşlarının ortalama G + C oranları % 31 , *C. coli*'nin % 32,6-34 ve *C. lari* 'nin % 32,1 'dir. *C. jejuni* genomunun 1,6 milyon baz çiftinden oluştuğu ve bunların 1654 geni kodladığı ve bu genlerin hiç birisinin faj ve plazmid DNA'sı içermediği bildirilmiştir (24, 170). Bu mikroorganizmalar konakçı dışındaki çevresel ortamlarda çoğalamazlar ve kısa sürede ölürlür. Kampilobakterler pH'nın 4,9'un altında olduğu ortamlarda canlı kalamazlar. *C. jejuni* ve *C. coli*'lerin optimal üremeleri için gerekli pH değerleri 6,5 - 7,5 arasında değişmektedir (Tablo 2).

**Tablo 2.** *Campylobacter* türlerinin özellikleri (155, 264).

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

d: Değişken, s: Duyarlı, r: Dirençli

### 1.1.2. Taksonomi

Kampilobakterlerle ilgili ilk sınıflandırma, Sebald ve Veron (235) tarafından yapılmıştır. Sebald ve Veron, bu mikroorganizmaları fenotipik özelliklerini dikkate alarak *Spirillaceae* familyası içerisinde *C. fetus* ve *C. bubulus* (şimdiki adı *C. sputorum*) olarak isimlendirilmişlerdir. (193). Bu sınıflandırmadan on yıl sonra biyokimyasal ve antijenik özellikleri ile G + C oranları da göz önüne alınarak sınıflandırma yeniden düzenlemiş ve daha önce *V. jejuni* ve *V. coli* olarak sınıflandırılan 2 türde *C. jejuni* ve *C. coli* adı ile *Campylobacter* cinsi içerisine dahil edilmiştir (266). Klinik ve çevre örneklerinden yeni kampilobakter türlerinin izole edilmesi ile cins içerisine çok sayıda yeni tür ve alt tür ilave edilmiştir. Bakterilerin son sınıflandırmasında fenotipik özelliklerden çok, bakteri genomundaki (DNA) yüksek derecede korunmuş dizilerin, özellikle doğal evrimsel gelişimi gösteren 16S rRNA dizilerinin baz olarak alındığı genotipik yöntemler kullanılmaktadır. Kampilobakterler, Vandamme ve Ley tarafından, DNA-RNA hibridizasyon yöntemi, 16S ribozomal RNA sekans analizleri ve serolojik tiplendirme teknikleri kullanılarak *Proteobacteria* takımı içerisinde "rRNA superfamily VI" adlı yeni bir filogenetik gruba dahil edilmiştir. (4, 265). Son olarak 2007 yılında revize edilen sınıflandırmaya göre kampilobakterler tek bir genus içerisinde yerleştirilmiş olup genus 17 tür ve 8 alt tür içermektedir (108) (Tablo: 1)

**Tablo 3:** Kampilobakterlerin sınıflandırılması (108).

Domain	: <i>Bacteria</i>
Phylum	: <i>Proteobacteria</i>
Class	: <i>Epsilonproteobacteria</i>
Order	: <i>Campylobacterales</i>
Family	: <i>Campylobacteraceae</i>
Genus	: <i>Campylobacter</i>

*C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *C. hyointestinalis*, *C. sputorum* biovar *sputorum*, *C. sputorum* biovar *paraureolyticus* ve *C. curvus* insanlardan ve hayvanlardan, gastroenterit etkeni olarak izole edilen filogenetik olarak yakın ilişkili türlerdir. Kampilobakter cinsi içinde bulunan *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* ve *C. upsaliensis* türleri 42 °C'de üreyebilme özellikleri göz önüne alınarak

“termofilik kampilobakterler” olarak tanımlanmaktadır (264). *C. jejuni* ve *C. coli*’nin insanlarda görülen akut bakteriyel gastroenteritlerin en yaygın etkenleri olduğu ve infeksiyonların % 90-95’inden *C. jejuni*, % 5-10’undan ise *C. coli*’nin sorumlu olduğu bildirilmiştir (85). Kampilobakterler genusu içerisinde hayvan ve insanlarda ishale seyreden hastalıklara sebep olan türler dışında, *C. concisus*, *C. showae*, *C. curvus*, *C. rectus*, *C. sputorum* ve *C. gracilis* gibi oral kaviteden izole edilen, peridontal infeksiyonlara yol açtığı bildirilen türler de yer almaktadır. Yine insanlardan ve hayvanlardan izole edilen *C. helveticus*, *C. hominis*, *C. insulaenigrae*, *C. lanienae*, *C. mucosalis* ve *C. sputorum* biovar *faecalis*’in patojen olup olmadığı belirlenememiştir.

### **1.1.3. Epidemiyoloji**

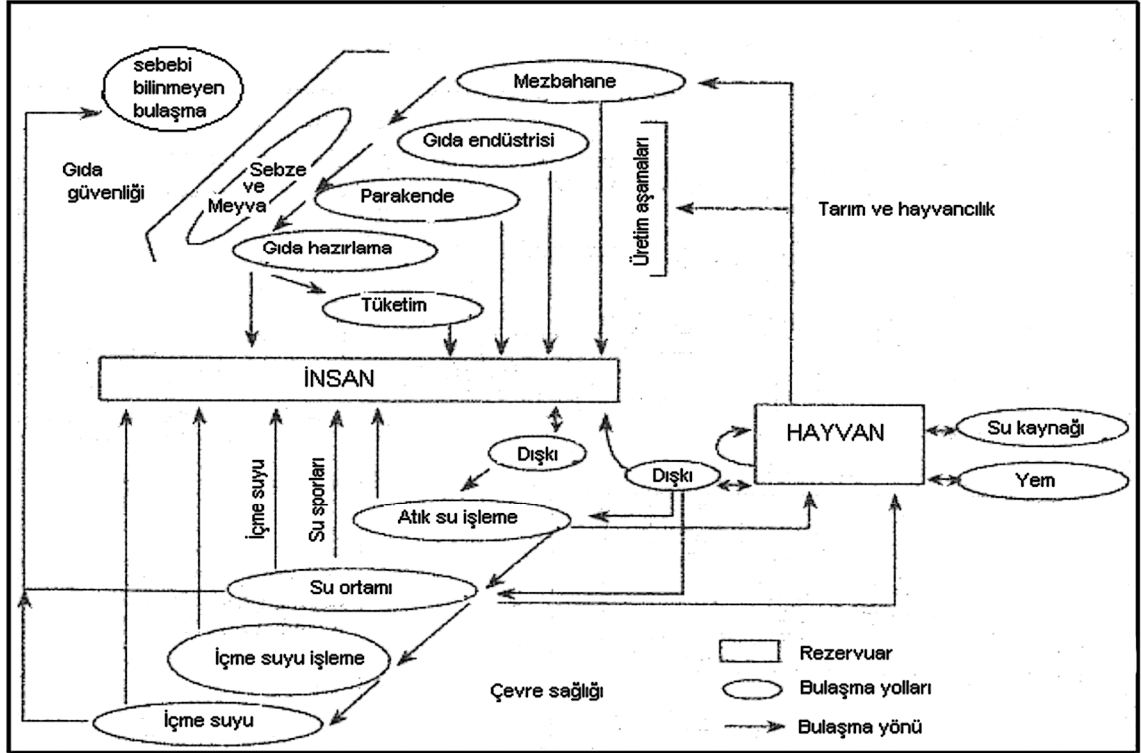
#### **1.1.3.1. Bulaşma ve Taşınma Yolları**

Etken, öncelikle kanatlılar, ruminantlar ve domuzlar olmak üzere çeşitli hayvanların gastrointestinal ve genital sisteminde kommensal olarak bulunmakta, diğer hayvan ve insanlara hayvan dışkıları ve bu dışkılar ile kontamine olmuş et, süt ve suların tüketimi ile veya infekte hayvanlarla temas sonucunda bulaşmaktadır (52, 188, 241, 252, 268). Kampilobakter türlerinin mikroaerofilik özellikleri, kuruma vb. dış çevresel koşullara karşı oldukça duyarlı olmaları ve 32-44 °C sıcaklıklar dışında üreyememeleri, bu etkenlerin çevrede canlı kalmalarını güçleştirmektedir (31).

Kampilobakterlerin insanlarda da hastalığa yol açtığı ilk kez, nedeni bilinmeyen ateş etyolojisi ile hastaneye yatırılan ve daha sonra ikisi ölen üç gebe kadının kanından *V. fetus*’ü tesbit eden Vinzent ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (39). İnsanlardaki kampilobakter infeksiyonları diğer infeksiyonların aksine sporadik olarak meydana gelmekle beraber, nadir olarak kontamine çiğ süt ve klorlanmamış suların içilmesi ile büyük salgınlar meydana gelmektedir (175). Sporadik vakaların yaklaşık % 70’inin kontamine kanatlı eti ve bu etlerin elle işlenmesi ile meydana geldiği ortaya konulmuştur (7). Amerika’da 1978-1986 yılları arasında *C. jejuni*’nin sebep olduğu gıda kaynaklı 57 salgının 26’sının çiğ süt ve 11’inin kontamine sütlerin tüketilmesi ile meydana geldiği bildirilmiştir (258). Yine Amerika’da 1978 yılında suların yetersiz klorlanması veya klorlanmaması ile ilişkili olarak meydana gelen bir kampilobakter salgınından dolayı 3500 kişinin etkilendiği rapor edilmiştir (267). Su ve sütün kontaminasyonunda sığır, koyun, domuz ve kanatlı hayvanların dışkılarıyla

etkenleri etrafa saçmalarının önemli rol oynadığı bildirilmiştir (158, 214, 241, 250-252, 268).

Kampilobakterler sığır ve koyun gibi çiftlik hayvanlarının dışkılarından kolaylıkla izole edilmiştir (89, 251). Kampilobakterlerin epidemiyolojisinde sığır ve koyunların önemi sadece mezbahada karkasların ve çiftlikte sütlerin kontaminasyonu için bir kaynak olmaları ile sınırlı değildir. Bu hayvanların akıntılarının yüzey sularını ve toprağı kontamine etmesi de etkenlerin çevreye yayılması açısından önemlidir (249). Karkaslar üzerinde yapılan prevalans ve vaka-kontrol çalışmalarında, kırmızı etlerin insan infeksiyonları için önemli bir risk oluşturduğuna dair çok az kanıt bildirilmiştir (249). Bunda karkaslar üzerinde termofilik kampilobakterlerin üremesini ve canlı kalmalarını önemli derecede olumsuz etkileyen kurutma ve soğutma işlemlerinin uygulanmasının rolü bildirilmiştir (99). Bağırsak içeriği ile karkasların kontaminasyonu bu organların çıkarılması esnasında meydana gelmektedir. Kontaminasyonların çoğunlukla mezbaha çalışanlarının elleri ve kullandıkları malzeme ile karkasların kros kontaminasyonu şeklinde meydana geldiği bildirilmiştir (203, 249). Fitzgerald ve arkadaşları insan ve bazı hayvanlar üzerinde yaptıkları bir tiplendirme çalışmasında elde ettikleri profillerin insan izolatları ile birlikte sığır, koyun ve kanatlı dışkısından elde edilen izolatlarda da bulunduğu bildirmişlerdir (81). Bu veriler insanlarda infeksiyon kaynağı olarak sadece kanatlıların değil ruminantların da önemli rol oynadığını ve çevreyi kontamine ettiğini göstermektedir. Kampilobakterlerin diğer rezervuarları insektler, rodentler, pet hayvanları, domuzlar ve deniz ürünleridir. Deniz ürünlerinin tüketilmesi ile ilişkili iki kampilobakter salgını bildirilmiş ve bunun suların kampilobakter ile kontamine olması ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (203, 263).



Şekil 3: *C. jejuni* 'nin su, gıda ve çevredeki yaşam siklusu (53).

### 1.1.3.2. Prevalans

Sığırların bağırsak içeriği ve dışkılarında kampilobakter prevalansının Amerika'da % 5-37 (115, 283), İngiltere'de % 11-40 (115, 251), Japonya'da % 47 (89), Portekiz'de % 20 (41), Danimarka'da % 23 (187) ve Norveç'te % 1 (229) ise civarında olduğu rapor edilmiştir. Kampilobakter prevalansının ülkeden ülkeye hatta coğrafik bölgeler arasında önemli farklılıklar göstermesinde; sürünün büyüklüğü, tipi, mevsim, hayvanların yaşı, örnek türü, örnek miktarı, bakım ve beslenme koşulları, izolasyon metotları ve coğrafik farklılıklar önemli rol oynamaktadır (4, 249). Örnek olarak *C. jejuni*'nin prevalansının meralardaki sığırlarda, kapalı alanlarda barındırılanlara oranla daha yüksek olduğu bildirilmiştir (88). İzolasyon oranları sürüden sürüye de farklılık göstermektedir. İngiltere'de kampilobakter türlerinin üç farklı sürüde ishelli sığırların dışkı örneklerinde sırasıyla % 79, % 40 ve % 37 oranlarında izole edildiği rapor edilmiştir (18). Stanley ve ark. (251), sığır bağırsak içeriği örnekleri ile ilgili yaptıkları bir çalışmada uygulanan izolasyon metodundaki farklılıkların prevalans üzerinde etkili olduğunu bildirmişlerdir. Atabay ve Corry sığırlardan elde ettikleri rektal svap örneklerini direkt izolasyon ve

zenginleştirme yöntemleriyle incelemiş ve direkt izolasyon ile % 2,5 zenginleştirme yöntemi ile ise % 55 oranında kampilobakter izole etmişlerdir (18).

Koyunlarda termofilik kampilobakterlerin prevalansı ülkeden ülkeye farklılık göstermekte olup karaciğer, dışkı ve rektal svap örnekleriyle yapılan çalışmalarda İngiltere’de % 92 (250), Yeni Zellanda’da % 66 (50), İsviçre’de % 18 (296) Portekiz’de % 15 (41), Nijerya’da % 4 (5) iken Kuzey İrlanda’da tespit edilememiştir (156). Bu farklılıkta yukarıda sıralanan faktörlerin önemli rolü vardır. Kapalı alanda beslenen koyunlarda kampilobakterlerin prevalansı önemli derecede düşükken, bu oran merada beslenen koyunlarda çok daha yüksektir. Stanley ve ark. koyunlarda kampilobakter prevalansındaki mevsimsel farklılıkları ortaya koymak amacıyla yaptıkları bir çalışmada, aylar arasında istatistiksel olarak farklılık olduğunu tespit etmişlerdir. Yine aynı çalışmada kampilobakterlerin prevalansının bahar aylarında ve kışın başlangıcında pik yaptığı, buna karşın şubat ve ekim aylarında ise en düşük olduğu saptanmıştır (250). Aynı araştırmacıların sığırlarda yaptıkları bir çalışmada mevsimsel farklılığın besi sığırlarında istatistiksel olarak önemli olmadığı, fakat süt ineklerinde kampilobakterlerin prevalansı üzerinde etkisi olduğu bildirilmiştir (251). Kampilobakter türleri ayrıca sığır ve koyunların safra, karaciğer, rumen, mezenteriyal lenf yumrusu vb. iç organlarında değişik oranlarda izole edilmişlerdir. Stanley ve ark. sığır ve koyunlarda ince bağırsak (% 80-60) ve rumenden (% 30) kampilobakter türleri izole ederken sekum ve kolonlardan etken izole edememişlerdir (250, 251). Koyunların karaciğerlerinde % 11 ile % 73 oranında kampilobakter izole edilmiş ve gıda kökenli kampilobakter infeksiyonlarında karaciğerin de önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (50, 143). Kampilobakter türleri bütün dünyada olduğu gibi ülkemizde de ciddi bir sorun teşkil eden infeksiyonlar ile karşımıza çıkmaktadır. Şu ana kadar ülkenin büyük bir coğrafik alanını içine alan geniş çaplı bir epidemiyolojik çalışma yapılmış olmadığından ülkemizde kampilobakterlerin prevalansı ve infeksiyonun yayılmasında ruminantların rolünün ne olduğu konusunda yeterli veri bulunmamaktadır.

Arıkoğlu ve arkadaşları sınırlı sayıda rektal svap örneği ile yaptıkları çalışmada, sığırlarda % 62, koyunlarda da % 56 *C. jejuni* izole ettiklerini bildirmişlerdir (13). Aydın ve arkadaşları Kayseri’de yaptıkları çalışmada sığırlardan alınan safra kesesi örneklerinde %31,6, insanlardan alınan dışkı svabı örneklerinde

ise % 1,43 *C. jejuni* izole etmişler (19). Muz ve arkadaşları Elazığ'da yaptıkları bir çalışmada, inceledikleri 112 adet sığır safrasında % 31 oranında *C. jejuni*, % 14 oranında *C. coli* izole etmişlerdir (178). Ertaş ve arkadaşları yine sınırlı sayıda safra örneği kullanarak yaptıkları bir çalışmada % 34 oranında *C. jejuni* ve % 32 oranında *C. coli* izole ettiklerini bildirmişlerdir (74). Açık ve arkadaşları sığırlarda % 79,3 *C. jejuni*, % 0,68 *C. coli*, koyunlarda % 20,68 *C. jejuni* ve % 15,27 *C. coli* izole ederken, Diker İç Anadolu Bölgesi'nde yaptığı bir çalışmada incelediği sığır safra örneklerinde % 35, koyun safra örneklerinde ise % 57 oranında kampilobakter izole ve tanımlamışlardır (1, 59).

Türkiye'nin farklı bölgelerinde safra, rektal svap ve dışkı örneklerinde yapılan bu çalışmalarda, sınırlı sayıda örnek kullanılmış olduğundan elde edilen veriler kampilobakterlerin Türkiye'deki prevalansını tam olarak yansıtmamaktadır. Kampilobakteriyozis, geçimini tarım ve hayvancılık gibi toprağa dayalı olarak temin eden, içme ve kullanma sularının sanitasyonunda ve gıda denetiminde yetersizlikler görülen az gelişmiş veya gelişmekte olan toplumlarda hiperendemiktir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün, gelişmekte olan ülkelerde ishal etkenlerinin dağılımını tesbit amacı ile, hastane laboratuvar kayıtlarını değerlendirdiği, retrospektif bir çalışmada, ishalleri hastaların dışkı kültürlerinde; Tanzanya'da % 18, Bangladeş'de % 17,5, Etiyopya'da % 13,8; Tayland'da % 13, Brezilya'da; % 9,9, Mısır'da; % 9 ve Ürdün'de; % 5,5 olmak üzere ortalama olarak % 5-20 oranında kampilobakter türlerinin tesbit edildiği bildirilmiştir. Ancak DSÖ, bu ülkelerde enfeksiyon hastalıklarının tanısı ve bildirimini ile ilgili halk sağlığı uygulamalarındaki yetersizliklerden dolayı, kampilobakteriyozis'in gerçek insidansının bildirilenlerden en az 10 kat daha fazla olabileceğini ifade etmektedir (217, 260). Suudi-Arabistan'da yapılan bir çalışmada 7.369 ishalleri çocuğun dışkısı kampilobakter yönünden değerlendirilmiş, 82 hastada kampilobakter türleri izole edilmiştir (48) Kampilobakteriyozisin özellikle 1990 yılından itibaren tüm dünyada giderek arttığı çok sayıda araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Ancak, Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve İngiltere gibi gelişmiş ülkelerde bile ishalleri hasta dışkılarının rutin mikrobiyolojik incelemesinde, kampilobakterlere yer verilmemesi, kampilobakteriyozisin gerçek insidansı hakkında sağlıklı bilgi edinilmesini engellemektedir (192). Her yıl yaklaşık olarak 76 milyon kişide gıda yolu ile bulaşan



hastalık gelişen ve bu hastalıklar sebebi ile yaklaşık olarak 5.000 kişinin kaybedildiği ABD’de Hastalık Kontrol Merkezi’nin (CDC) 2001 yılı verilerine göre, merkeze yalnızca 4.740 *Campylobacter* olgusu bildirilmiştir (217). Her yıl ortalama olarak 2.366.000 kişide gıda kaynaklı zoonotik hastalığın görüldüğü İngiltere-Galler’de, yaklaşık 500.000 olgu ile, en sık karşılaşılan ajanın kampilobakterler olduğu bildirilmektedir (163).

Ülkemizde, 1986-2002 yılları arasında yapılan bazı çalışmalara göre, akut bakteriyel gastroenteriti olan olguların dışkı kültürlerinden *Campylobacter* cinsi bakterilerin izolasyon sıklığı % 1-13 arasında değişmektedir (201). Yılmaz ve ark. Edirne’de ishalleri olan insanların dışkılarından *Campylobacter* spp. % 4 oranında izole etmiş olup (294), Polat Adana ve yöresinde yaptığı çalışmada % 5,1 oranında *Campylobacter* spp. izole ettiğini bildirmiştir (217). Özkan ve ark. İzmir’de % 2.01 (205), Aşçı ve ark. Elazığ’da % 14.67 (17), Akgün ve ark. Eskişehir’de % 1.4 oranında *C. jejuni* saptadıklarını; Gültekin ve ark. Sivas yöresinde % 4.7 (103), Aktaş ve ark. Erzurum’da % 8.8 (6), Öztürk ve ark. İstanbul’da % 6.6 (206), Yıldırım ve ark. Kayseri’de % 2.7 (293), Özen ve ark. Denizli’de % 1.5 (204) oranında *Campylobacter* spp. belirlediklerini bildirmişlerdir.

#### 1.1.4. Patogenez ve Virulens

Kampilobakter türlerinin genomik yapılarının, yüksek düzeyde tür içi varyasyonlar göstermesi ve uygun hayvan modellerinin olmayışı virulansla ilgili faktörlerin tespitini zorlaştırmaktadır (245). Birçok bakteri türünün oral yolla infeksiyon oluşturabilmesi için yüzbinlerce sayıda bakterinin vücuda girmesi gerekirken, termofilik kampilobakterlerin 500-800 adedi bile bağırsaklara kolonize olmak ve infeksiyon oluşturmak için yeterlidir (27). Kontamine gıda ve suların konakçı tarafından alınması ile birlikte bu etkenler mide asit engelini aşarak bağırsaklara geçerler. Bağırsaklardaki etkenler penetrasyon yolu ile distal ileum ve kolon epitelini örten mukozaya kolonize olurlar. Bağırsak yüzeyine tutunan bu etkenler, epitel hücrelere saldırarak ve toksin üreterek direkt yolla ya da konakçıda yangısal bir reaksiyon meydana getirerek indirekt yolla bağırsakların emilim kapasitesini bozarlar (288). Besinlerle birlikte mideden duodenuma geçen *C. jejuni* burada da oksijen yoğunluğu düşük, yüksek osmolariteli, sınırlı demir ve bakterisidal

etkili safra tuzları içeren olumsuz şartlara maruz kalmaktadır. Bu durum karşısında *C. jejuni* ve *C. coli*'nin bir çok suşunda, çoklu ilaç dirençli bakterilerde görülen, multidrug ATP Binding Casser (ABC) transporter sisteminin homoloğu olan, Cme ABC multidrug efluks pompa sisteminin olduğu, hücre duvarını geçen toksik safra tuzları ve benzer kimyasal toksik maddeleri bu sekresyon sistemi sayesinde periplazmik alandan hücre dışına pompalayarak, bakterisidal etkilerden korundukları ileri sürülmüştür (151). Bazı bilimsel çalışmalar, bu etkenlerin intestinal epitel hücrelerinde bozukluklar oluşturup, buradan kan dolaşımına katılarak vücutta yayıldığını göstermiştir (241). Kampilobakterler, bol miktarda gıda ve sıvı ile alındığında, duodenumu geçerek distal ileum ve kolona inmekte, burada epitelin yüzeyini örten mukus tabakasını geçerek, enterosit ve kolonositlerin yüzeyine kolonize olmaktadır. Mukozal bariyerin aşılmasında kampilobakterin tirbuşon tarzında hareket eden polar flagellası etkilidir. Flagellasını kaybetmiş izolatların epitel hücreyle temasında azalma olduğu in vitro deneylerle gösterilmiştir. Kampilobakter enfeksiyonlarının gelişmesinde, epitel yüzeyine adezyon şarttır. İntestinal epitelin yüzeyine kolonizasyonda mikroorganizmaya ait adeziv fimbria ve nonfibrial yüzey yapı elemanları etkilidir. *C. jejuni* suşlarında, CadF, PEB1, JlpA olarak adlandırılan en az üç yüzey proteinin adezyondan sorumlu olduğu gösterilmiş, ancak bu proteinlerin herbirinin tek başına adezyona katkısı tam olarak belirlenememiştir. Campylobacter adesion to fibronectin (CadF) kampilobakterlerin fibronectin reseptörlerine ( $\alpha 5\beta 1$  integrin) bağlanmasını sağlayan, 37 kDa'luk dış membran proteindir (169, 245). Bu etkenler, konakçı bağırsak epitelinde yangısal reaksiyon sonucu meydana gelen kimyasal maddeleri algılama ve yangı bölgesine hareket etmelerini sağlayan mekanizmalara sahiptirler (131). Kemotaksisin önemi, in vivo ortamlarda yapılan çalışmalarda kemotaktik olmayan mutantların hasta bir fareye verildiğinde, kolonize olmadığının ortaya konmasıyla kanıtlanmıştır (131, 255, 292). Kampilobakterler, ya intestinal mukoza tabakası içinde kalarak canlılıklarını devam ettirirler ya da bağırsak epitel hücrelerini işgal ederler. İnvazyon esnasında etkenler öncelikle epitel hücrelerine akın etmektedirler. In vivo ortamlarda yapılan çalışmalarda, kampilobakterlerin epitel hücrelerine invazyonu hücrede hasara, hücrelerin fonksiyonlarında kayıplara ve ishale neden olmaktadır (230, 275). Bu sebeple invazyon, *C. jejuni*'nin patogenezinde önemli bir role sahiptir.

Bakteriyel protein sentezinin invazyon için gerekli olduğu rapor edilmiştir. Kampilobakterlerin hücre kültürlerinde ürettikleri zaman invazyon yeteneğine sahip en az 14 protein sentezledikleri radyoimmunoassay (RIA) yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir (140). In vivo ve in vitro ortamlarda yapılan çalışmalarda kampilobakterlerin epitel hücrelere adhezyonunda rol oynayan en önemli faktörün flagella olduğu tespit edilmiştir (43). Flagella, kampilobakter kolonilerinin nemli olarak görünmesini ve kampilobakterlerin mikroskopta hareketli görünmesini sağlayan bir virulens faktördür. Diğer bakterilerde olduğu gibi flagellar filamentler, flagellin proteinlerini multimerlerini içerir ve bakterilerin hareket etmesinde bir motor görevi görürler. Flagellaların hareketi, kampilobakterleri konakçının peristaltik hareketlerinden korur ve epiteli örten mukoza tabakasına girmelerini ya da buradan geçmelerini sağlar. Flagellalar ayrıca epitel hücrelere invazyonda önemli rol oynarlar. Bu yüzden flagellaların sağladığı motilite, kampilobakterlerin hücrelere ulaşmaları ve yakın temas kurmaları için gereklidir (276, 291). In vitro ortamlarda yapılan çalışmalarda, lipopolisakkaridlerin (LPS) insan embriyonik bağırsak (INT-407) hücrelerine adhezyonunda önemli bir rol aldıkları rapor edilmiştir (132, 162).

Diğer Gram negatif bakterilerde olduğu gibi kampilobakter LPS'lerinin lipid A komponenti, endotoksin olarak görev yapmaktadır. Kampilobakterlerin sistemik infeksiyonlarında salıverilen LPS'den dolayı sepsis ve şoklar meydana gelmektedir (132, 211). *C. jejuni*'deki LPS, sakkarid yapısındaki çok sayıda O- antijenlerinden birine sahiptir. Bu O- antijenler hem polisakkarid hem de oligosakkarid yan zincirleri ile benzerlik gösterebilirler. Bu yüzden kampilobakter türleri, LPS ya da lipooligosakkarid (LOS) veya her ikisini birlikte üretebilirler (14). Lipopolisakkaridlerin, infeksiyonun ilerlemesine neden olan serum dirençliliği, fagositik yıkıma karşı direnç oluşumu ve hücre toksisitesine katkı sağladığı bildirilmiştir (131).

Son zamanlarda kampilobakterlerin hücre duvarlarında bulunan ve kampilobakter adhezyon geni (*CadF*) tarafından kodlanan CadF proteininin fibronektine bağlandığı gösterilmiş olup, In vivo ortamlarda yapılan çalışmalarda *C. jejuni*'nin kanatlılara kolonize olması için *CadF* proteininin bulunması gerektiği bildirilmiştir (141, 275). *CadF*'yi kodlayan genin, diğer bakterilerin dış membran

proteinlerinin homoloğu olduğu tespit edilmiştir (141). Klinik örnekten izole edilen çok sayıda *C. jejuni* ve *C. coli* suşunun genomunda *cadF* bölgesinin korunmuş olduğu ve bu bölge mutasyonlarında mikroorganizmanın hücre yüzeyine adezyonunda önemli ölçüde azalma olduğu gösterilmiştir. *C. jejuni* suşlarında *cadF*'den başka henüz isimlendirilmemiş iki tane daha fibronektin bağlayan protein belirlenmiştir. Bir diğer adeziv protein olan periplasmic binding protein (PEB1); Gram negatif bakterilerdeki aminoasit transport proteinlerine benzeyen, 28 kDa'luk bir dış membran proteindir. *peb1*'genindeki mutasyonların *C. jejuni*'nin epitel hücrelere adezyonunu önemli ölçüde azalttığı, in vitro deneylerle gösterilmesine rağmen PEB1 adezini için konak hücre resptörü henüz tanımlanamamıştır. İmmunojenik karakterdeki bu proteinlerden biri olan PEB1, epitel hücrelerinde bulunan ve büyük bir yapışma proteini olan CEB1 ile benzerdir (210). PEB1'in yokluğu, farelere kolonize olmanın yanı sıra epitel hücrelerin adhezyonu ve invazyonu da olumsuz etkiler (209). Jin ve arkadaşları tarafından bulunan ve *Jejuni* lipoprotein A (*JlpA*) adezini olarak tanımlanan bir diğer adezin ise 42,3 k-Da'luk yüzey etkili bir lipoproteindir. *jlpa* genindeki mutasyonun *C. jejuni*'nin HEp-2 hücrelerine adezyonunu, *jlpa* geni intakt olan *C. jejuni* suşuna göre % 19 oranında azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca bakteri hücre membranında yer alan *JlpA*'nın intestinal epiteldeki Hsp90 ile karşılıklı etkileştiği ve bu etkileşimin NF- $\kappa$ B nin ve p38MAP kinazın aktivasyonunu indüklediği tesbit edilmiştir (125).

Fimbrialar pek çok patojen bakterilerde bulunan önemli bir virulens faktördür ve bakterilerin hücrelere adhezyonunda görevlidirler. Klasik fimbrialar kampilobakterlerde olmamasına rağmen, kıl benzeri fimbrial yapılar, bakterinin safra tuzu ile muamele edilmesi neticesinde gözlenmiştir. Putative peptidaz enzimini kodlayan prepilin peptidaz geni (*pspA*) bu fimbrial yapıların biyosentezinde görevlidir ve bu genin inaktivasyonu afimbrial mutantların oluşmasına neden olmaktadır. Ancak bu fimbrial filamentlerin alt ünitelerini kodlayan genler identifiye edilememiştir (65, 131).

Kampilobakter enterotoksinleri, hücre içinde siklik adenozin monofosfat (cAMP) seviyesinin yükselmesine ve hedef hücre reseptörlerine bağlanabilme yeteneğine sahip proteinler olarak tanımlanmaktadır (274). *Vibrio cholerae* toksini (CT) ve yakın ilişkili *Escherichia coli*'nin ısıya duyarlı toksini (LT) kampilobakter

enterotoksinlerinin prototipleridir (247). *Vibrio cholerae* toksin ve LT iki alt üniteden oluşmaktadır. Büyük olan A alt ünitesi enzimatik aktiviteye sahiptir, daha küçük ve pentamer bir yapıya sahip olan B alt ünitesi ise hücre reseptörlerine bağlanma yeteneğine katkı sağlamaktadır. B alt ünitesi ile hücre reseptörlerine bağlanan enterotoksinler, A alt ünitesi ile hücre içerisine taşınır ve hücre adenilat siklaz düzenleyici sistemi bozarlar. Sonuç olarak, hücre içi cAMP seviyesi yükselir ve hücreler arasında ve içinde iyon dengesinde değişiklikler meydana gelir. Bu değişiklikler sıvının bağırsaklara sekresyonunu artırarak ishallerin oluşmasına neden olur (274, 275). Sitotoksinler hem hücre içinde hem de hücreler arasında etkili olan ve hedef hücreyi öldüren proteinler olarak tanımlanmaktadır. Hücre içi aktivite gösteren sitotoksinler hücreye yapışmayı takiben işlenerek hücre sitoplazmasına ulaşırlar ve hücreyi öldürürler. İkinci tür sitotoksinler hedef hücre porlarında formasyonlara, hücre içinde sitotoksin ve granül içeriklerinin salıverilmelerine neden olurlar. Bu reaksiyon konakçı dokularında hafif lokal bozukluklara neden olur. Sitotoksinler ayrıca lökosit, granülosit ve makrofajları da öldürdükleri için konakçının immun cevabını baskırlar (4, 131, 274).

Kampilobakterlerde en az altı farklı toksin ya da toksin sınıfının varlığı tespit edilmiştir. Bunlar in vitro hücre kültürlerindeki etkilerine göre:

- 1- HeLa hücrelerini aktive etmesine rağmen Vero hücrelerini aktive edemeyen 70 kDa büyüklüğündeki toksin (100).
- 2- HeLa ve Vero hücrelerini aktive eden sitotoksin ya da toksinler (82).
- 3- Hemolitik etki gösteren sitotoksinler (137).
- 4- Shiga benzeri toksin (175).
- 5- Cytotolethal distending toksin (CDT) (126).
- 6- Hepatotoksinler (137) şeklinde sıralanmaktadır.

Bunlardan CDT, genetik bölgesi klonlanmış ve sekans analizi yapılmış ilk toksindir. Benzer toksinler *E. coli*'de de tespit edilmiş (132, 212) ve bu toksinin G2/mitoz fazında HeLa hücre bölünmesini engellediği ve hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir (132, 286). Bakteriyemi sıklıkla *C. fetus* infeksiyonları sonrasında görülür. *C. fetus* suşlarının yüzeyinde yer alan S-protein, mikroorganizmayı serumun bakterisidal etkisine karşı korumakta, bu nedenle *C. fetus* infeksiyonlarından sonra bakteriyemi daha sık gelişmektedir (244).

### 1.1.5. Antimikrobiyal Dirençlilik

Günümüze kadar insan ve hayvanlarda kampilobakter infeksiyonlarının tedavisi amacıyla en sık kullanılmış olan antibiyotikler florokinolonlardır. Florokinolonlar bakterilerdeki topoizomeraz IV ve DNA giraz (topoizomeraz II) enzimlerini inhibe ederek etkisini gösteren antimikrobiyal ajanlar olup, bu ajanlar geniş spektrumlu ve antimikrobiyal aktiviteleri yüksek olduklarından dolayı insan ve hayvanlardaki tüm bakteriyel infeksiyonların tedavisinde kullanıldıkları gibi kampilobakter ve diğer gastrointestinal infeksiyonların tedavisinde de sıklıkla kullanılmaktadırlar (4, 119, 120,). Florokinolonlara direnç ilk kez 1990'lı yıllarda insan ve hayvanlarda bu ilaçların çok fazla kullanılmaya başlandığı Asya kıtasındaki bazı ülkeler ile İsviçre, Hollanda, Finlandiya ve İspanya gibi bazı Avrupa ülkelerinde ortaya konmuştur (73). Tayland'da 1994 yılında insan izolatlarında yapılan bir çalışmada, *C. jejuni*'lerin büyük bir çoğunluğunun siprofloksasine dirençli olduğu bildirilmiştir (116). İngiltere'de ise tavuklara enrofloksasin ve sarafloksasin verilmeye başlanması, florokinolonlara dirençli kampilobakter infeksiyonunda artışlara neden olmuştur (233).

Türkiye'de florokinolonlar 1989 yılında broylerlerde koruyucu amaçla yoğun olarak kullanılmaya başlanmasına rağmen, 1992 yılına kadar florokinolonlara dirençli kampilobakter izolatları tespit edilememiş olmakla birlikte Savaşan ve ark. kanatlı hayvanlarda kinolonlara karşı oluşan direnç ile ilgili yaptıkları bir çalışmada, 1987 yılındaki kanatlı izolatlarında enrofloksasin ve siprofloksasine karşı bir dirençliliğin olmadığını, 2000 yılında ise enrofloksasine % 76, siprofloksisine ise % 73 oranında bir direnç olduğunu tespit etmişlerdir (61, 234). Bu sonuçlar, Türkiye'de kontrolsüz florokinolon kullanımının kampilobakter suşlarında yüksek düzeyde direnç oluşumuna ve yayılımına yol açtığını, bunun da gıda güvenliği ve hekimlik yönünden ciddi sonuçlar doğurabileceğini göstermektedir. Kampilobakter türleri ayrıca tetrasiklin, ampisilin, klindamisin, nalidiksik asit, azitromisin, metronidazol vankomisin, rifampin, trimetoprim ve sefalosporin gibi antibiyotiklere de direnç göstermektedirler (7). Larkin ve ark. besi sığırlarından izole ettikleri kampilobakterlerin ampisiline % 18, azitromisine % 67, klindamisine % 47, tetrasikline % 44 ve streptomisine % 57 oranında dirençli olduğunu bildirilmişlerdir (146).

### 1.1.6. Bağışıklık

Genç yaşlarda etkene maruz kalan insan ve hayvanlar, ileriki yaşlarda etkenle tekrar karşılaştıklarında hastalanmadan geçici bir taşıyıcılık gösterirler (4). Kampilobakterler konakçı tarafından alındıktan sonra bunlara karşı spesifik immun yanıt meydana gelir. Mide asiditesi gibi spesifik olmayan savunmalar, kampilobakteriozisin patogenezinde önemli rol oynamalarına rağmen, etkenlerin bağırsak epiteline kolonize olması ve infeksiyonun önlenmesinde yeterli değildir (4, 269). Konakçı tarafından alınan bu etkenlere karşı fagositik hücrelerden interlökin-8 (IL-8) adı verilen bir ön yangı sitokini salıverilir (114). Ekstraselüler patojen olarak bilinen kampilobakterlerin meydana getirdiği infeksiyonlara karşı humoral immun yanıt oluşur. İnfeksiyonu takiben konakçı bağırsak lümeninde salgısal IgA (SIgA) ve IgG, serumda ise IgM ve IgG sınıfı antikorların seviyesi yükselir. IgM ve IgG sınıfı antikorlar 45 gün süresince serumda ve bağırsak lümeninde yüksek seviyede kalırlar ve yaklaşık 90 gün sonra normal seviyelerine gelirler. Salgısal IgA ise çok daha kısa bir sürede normal seviyesine ulaşır (4, 128, 271). Erken yaşlarda kampilobakter etkenlerini alan hayvanlarda kademeli olarak gelişen bu antikorlar, hayvanları daha sonraki infeksiyonlardan genellikle korur ve bağırsaktaki etkenlerin zamanla buradan eliminasyonunu sağlarlar. Meydana gelen bu sekonder immun yanıt hastalığın yayılmasını sınırlar. İmmun sistemi baskılanmış hastalarda hastalığın daha uzun, şiddetli seyretmesi ve nükslerin görülmesi bu görüşü desteklemektedir (4, 246).

Humoral immun yanıtın yanında hücresel immun yanıt da bakteriyel infeksiyonu ortadan kaldırmada ya da sınırlamada önemlidir. Hücresel immun yanıt genel olarak zorunlu ya da fakültatif hücre içi patojenlere karşı gelişen spesifik bir immun yanıttır. Kampilobakter etkenleri ekstraselüler patojen olmalarına karşılık, yapılan bazı çalışmalar bu etkenlerin bağırsak epitel hücreleri ve makrofajların içinde de canlı kalabildiğini göstermiştir (268). *C. jejuni*'nin en yüksek immunojenik proteini iki gen (*flaA* ve *flaB*) tarafından kodlanan flagellindir. Bu genlerden her birinin antijenitede değişikliklere yol açtığı deneysel olarak ortaya konmuştur (275).

### 1.1.7. Klinik Belirtiler

*C. jejuni* ve *C. coli* gebe sığırlarda sporadik abortlarla seyrederken, gebe koyunlarda enzootik abortlara neden olmaktadır. Gebe hayvanlarda abortus öncesi veya sonrasında hafif bir ishal görülür. Kampilobakterler kuzularda besi ishali olarak

adlandırılan enteritlere neden olmaktadır. İnfeksiyon sulu bir ishalle karakterizedir. Bu etkenler ayrıca genç kuzularda sporadik seyirli dizanterik enterit ve kolitise de neden olabilirler. Bu infeksiyon tipinde vücut sıcaklığı artar, dışkı yumuşar, mukoid bir hal alır ve taze kan pıhtıları görülür. *C. jejuni* ve *C. coli* yeni doğan ve süten kesilen buzağılarda da enterik infeksiyonlar oluştururlar (20). İnfeksiyon koyunlarda olduğu gibi genellikle dizanterik formda seyredir. Hayvanlarda bakteriyemiye bağlı olarak yüksek ateş, mukuslu veya kanlı dışkı dikkati çeker (4, 12, 219). Termofilik *campylobacter*'ler sığırların mastitis vakalarından da izole edilmişlerdir (225).

### 1.1.8. İnsanlarda kampilobakter İnfeksiyonları

Hem hayvanlarda hem de insanlarda hastalık yapabilen kampilobakter cinsi bakteriler, insanlarda çoğu kez kendikendini sınırlayan, basit sekretuar tip ishalle seyreden, enterit tablosuna yol açmaktadır. Diğer taraftan daha nadir olmakla beraber dizanterik formdaki kampilobakter enteritlerindeki bulgu ve belirtiler, invaziv özellikteki bağırsak patojenlerinin yaptığı hastalıklardaki belirtilerden önemli bir ayrıcalık göstermez (268). Hastalığın inkübasyon dönemi, alınan mikroorganizmanın miktarı ve virulansına göre değişmekle birlikte 18 saat-8 gün (ortalama 3,2 gün) arasında değişmektedir. Başlangıçta hastaların çoğunda, 12-24 saat süren ateş, baş ağrısı, miyalji, kırıklık ve bazende taze kan içeren yumşak dışkılamasında olduğu, prodrom dönemi görülmektedir. Prodromal döneminin ardından, 2-3 gün süren ishal, ateş, karın ağrısının bazende bulantı ve kusmanın görüldüğü intestinal evre başlamaktadır (7). Genellikle sekretuar tipde başlayan ishal vakaların yaklaşık olarak %30'unda kanlı ve mukuslu dizanterik forma dönüşebilmektedir. Bazı hastalarda günde 8 veya daha fazla dışkılama görülebilmektedir (29). Kampilobakter ishallerine eşlik eden ateş 39-40 dereceye kadar çıkabilmekte, çocuklarda febril konvülsiyonlara neden olabilmektedir. Karın ağrısı şiddetli olup, kramp şeklinde ve tüm batında yaygın olarak hissedilmekte, bazen sağ alt kadrana lokalize olarak akut apandisit taklit edebilmektedir (28). Kampilobakter enteriti genellikle 5-7 günde kendiliğinden düzelmekte nadiren uzamış enfeksiyonlara neden olmaktadır. Ancak olguların yaklaşık %5-10'unda relaps görüldüğü, mikroorganizmanın nekahat döneminde iki hafta ile bir ay süreyle dışkıdan atıldığı bildirilmektedir. Kampilobakter enteritlerinin ardından, özellikle immün yetmezliği olan hastalarda,



bebekler ve yaşlılarda mikroorganizmanın intestinal kanaldan yakın bölgelere direkt yayılımı ile kolesistid, pankreatit, peritonit ve mesenterik adenit gibi lokalize enfeksiyonlar ve bakteriyemi gelişebilmektedir (32, 130).

Kampilobakter enfeksiyonlarından sonra Guillain Barre sendromu, hemolitik üremik sendrom, interstisyel nefrit, IgA nefropatisi, reaktif artrit, bursit ve eritema nodozum gibi geç başlangıçlı, non enfeksiyöz komplikasyonlar da görülebilmektedir. Periferik polinöropatiler grubu içerisinde yer alan Guillain-Barre Sendromu (GBS), periferik sinir sisteminin, otonom sinir sisteminin ve kranial sinirlerin, akut başlangıçlı progresif seyirli, inflamatuvar hastalığıdır. Bu sendrom periferik sinirleri etkileyerek felçlere neden olan bir hastalıktır ve üç farklı klinik formu vardır. Akut demiyalize formu sekonder aksonal dejenerasyona, akut motor aksonal formu akut motor-sensörlerde bozuklara neden olmaktadır. Son form ise oftalmoplejilerin ve ataksilerin meydana geldiği Miller-Fischer sendromudur (181, 217). Dünya çapında oldukça düzgün bir dağılım gösterdiği ve genel insidansının 1,0-2,7/100.000 olduğu bildirilen GBS'u dünyanın büyük bir bölümünde Polionun eradike edilmesinden sonra, akut flask paralizilerin en yaygın sebebi olarak gösterilmektedir. Toplumda çok sık görülmemesine rağmen ortaya çıkan kalıcı sakatlık, GBS'ünü önemli bir halk sağlığı sorunu haline getirmektedir. GBS'nun periferik sinirlerin antijenik proteinlerine karşı antikor üretimi sonucu gelişen otoimmün bir hastalık olduğu, başta *C. jejuni* olmak üzere *Mycoplasma pneumoniae*, *E. coli*, Cytomegalovirus, Epstein-Bar virus, Human immunodeficiency virus (HIV), Influenza virus, Coxsackie virus, Herpes simplex virus, Hepatit A ve C virus gibi enfeksiyon ajanlarının, aşılama ve cerrahi girişimlerin bu antikorların yapımını tetiklediği düşünülmektedir. Nitekim, GBS'lu olguların % 50-70'inde nörolojik semptomlar, gastroenterit, solunum yolu enfeksiyonu veya aşılama 2 ile 4 hafta sonra gelişmektedir. *C. jejuni* enfeksiyonu sonrası genellikle kalıcı nörolojik defisitlerin görüldüğü aksonal tutulumlu GBS görülmekte, GBS'da geçirilmiş kampilobakter enfeksiyonu kötü prognostik faktörler arasında sayılmaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalarda aksonal tip GBS'lu olguların yaklaşık % 30 ile % 40'ında, 2-3 hafta önce geçirilmiş *C. jejuni* enfeksiyonunun tesbit edildiği bildirilmektedir (217).

*C. fetus*. subs. *fetus*'ün neden olduğu enteritler *C. jejuni*'ye nazaran daha az sıklıkla görülmektedir. Fakat, bu hastalarda bakteriyemi, septik tromboflebit,

meningoensefalit gibi sistemik enfeksiyonlar, septik artrit, salpinjit, ampiyem, selülit, üriner sistem enfeksiyonları, osteomyelit ve kolesistit gibi lokalize enfeksiyonlar daha sık görülmektedir. Kampilobakter enfeksiyonlarının HIV ile enfekte hastalarda, genel popülasyona göre daha sık görüldüğü ve daha şiddetli seyrettiği bildirilmektedir. Bu hastalarda persistan ve durdurulamayan bol sulu ishaller görülmekte, enteriti takiben ya da enterit görülmeksizin, bakteriyemi, menenjit, endokardit ve perikardit gibi mortaliteyi artıran sistemik komplikasyonlar gelişebilmektedir (7, 284).

### **1.1.9. Tanı**

Gerek sekretuar tip bakteriyel ve viral, gerekse dizanterik tip *E. histolytica* gastrointestinal sistem enfeksiyonlarından klinik olarak ayırt edilemeyen kampilobakter enteritlerinin laboratuvar tanısı, uygun tedavi ve kontrol tedbirlerinin alınabilmesi için son derece önemlidir. Kampilobakter enfeksiyonlarının sığır, koyun ve insanlardaki tanısı, genellikle dışkı, kan, rektal svap ve diğer örnekler yardımı ile yapılmaktadır. Enteritli hayvan ve hastaların dışkılarının direkt incelemesinde; lökosit varlığının yanı sıra karanlık saha veya faz-kontrast mikroskopta hızlı hareket eden bakterilerin görülmesi tanıya yardımcı bulgulardır. Bazik fuksin ya da karbol fuksin kullanılarak modifiye edilmiş bir Gram boyama, dışkıdan direkt olarak organizmanın tespiti için kullanılır, fakat kesin tanı için dışkı kültürü yapılması gerekmektedir (98, 179, 217). Kampilobakterler hayvan, gıda ve çevresel örneklerde düşük oranlarda bulduklarından dolayı, diğer mikroorganizmalar bu bakterilerin izolasyonunu büyük oranda baskılamaktadır. Kampilobakterler vankomisin, polimiksin B, trimetoprim laktat ve sefalosporin gibi bazı antibiyotiklere karşı dirençli olduklarından, bu antibiyotikler kampilobakterlerin izolasyonu için kullanılan besi yerlerine sıklıkla ilave edilmektedirler (186).

Kampilobakterlerin dışkıdan ilk izolasyonu vankomisin, polimiksin B, trimetoprim ve defibrine at kanı içeren selektif bir besiyerini geliştiren Skirrow tarafından gerçekleştirilmiştir. Skirrow besiyeri dışkıdan kampilobakterlerin izolasyonu için etkili olmasına rağmen, kontamine gıdalar ve çevresel örnekler için uygun değildir. Bu durum gıda ve çevreden kampilobakterlerin izolasyonu için daha etkili ve uygun bir besiyeri olan Preston besiyerinin geliştirilmesine yol açmıştır (4, 34, 240). Blaser ve ark. klinik laboratuvarlarda çok yaygın olarak kullanılan Campy-BAP besiyerini, Bolton ve ark. ise sefazolin ve sodyum deoksikolat içeren CCD besiyerini tanımlamışlardır. Ayrıca Karmali ve ark. kampilobakterlerin selektif izolasyonu amacı ile vankomisin, sikloheksimid, sefoperazon içeren CSM ve trimetoprim, polimiksin B, vankomisin içeren SKM besiyerlerini geliştirerek kullanmışlardır (4, 30, 33, 129). Son yıllarda ise bu selektif besi yerlerinin dışında kampilobakterlerin dışkıdan izolasyonu amacı ile daha etkili ve duyarlı olan sefoperazon, amfoterin B, teikoplanin (CAT) ve modifiye edilmiş CCDA (sefoperazon, amfoterin B) gibi selektif besiyerleri kullanılmaktadır (4, 15, 51, 217).

Kampilobakter izolasyonunda yaygın olarak kullanılan ve bazıları ticari olarak temin edilebilen besiyerlerinin etkinliğini karşılaştıran çok sayıda araştırma yapılmış ve araştırmaların yapıldığı araştırma merkezlerine göre değişen farklı duyarlılık oranları bildirilmiştir. Bu çalışmalardan birisinde, 50 ishali hastanın dışkı örneği Skirrow, Butzler, Blaser, Campy-BAP ve Preston besiyerine yapılan ekimlerde sırası ile 13 (% 26), 10 (% 20), 12 (% 24), 5 (% 10), 15 (% 30) oranında kampilobakter pozitifliği bildirmişlerdir (35).

Kampilobakterlerin izolasyonu için genellikle ön zenginleştirme metodu kullanılmaktadır. Zenginleştirme aşaması, ishali hayvandan toplanan dışkı örnekleri gibi klinik numuneler için gerekli olmamakla birlikte, gıda ve çevresel örneklerden etken izolasyonu için önem arz etmektedir.

BESİYERİNİN ADI	TEMEL BESİYERİ	KATKI MADDELERİ
<b>Butzler'in selektif besiyeri</b>	Sıvı thioglikolat besiyeri (Difco)	Agar (%3) Koyun kanı (%10) Basitrasin (25.00 IU/lit) Novobiosin (5 mg/lit) Kolistin (10.000 IU/lit) Sefalotin (15 mg/lit) Aktidion (50 mg/lit)
<b>Blaser'in besiyeri (Campy-BAP)</b>	Brucella agar base	Koyun kanı (%10) Vankomisin (10 mg/lit) Trimethoprim (5 mg/lit) Polimiksin B (2.500 IU/lit) Sefalotin (15 mg/lit) Amfoterisin B (2 mg/lit)
<b>Skirrow'un kanlı agar besiyeri</b>	Blood agar base (temel kanlı agar ) No. 2 (Oxoid)	At kanı (%7) Vankomisin (10 mg/lit) Polimiksin B (2.500 IU/lit) Trimethoprim (5 mg/lit)
<b>Butzler virion besiyeri</b>	Columbia agar base (Oxoid CM331)	Koyunkanı(%10) Sefoperazon (15mg/lit) Rifampisin (10 mg/lit) Kolistin (10.000 IU/lit) Ampoterisin B (2 mg/lit)
<b>*Preston (1)</b>	Nutrien buyyon # 2 (Oxoid CM 67) % 1.2 New Zealand agar	Trimethoprim(10 µg/ml) Polimiksin B (5 IU/ml) Rifampin (10 µg/ml) Sikloheksimid (100 µg/ml)
<b>**Preston(2)</b>	Nutrien buyyon # 2 (Oxoid CM 67) % 1.2 New Zealand agar	Sodyum deoksikolat Demir sülfat Sodyum piruvat Kazein hidrolizat Sefoperazon (32 mg/lit)
<b>***Preston (3)</b>	Nutrien buyyon No. 2 (Oxoid)	Sefoperazon (32 mg/lit) Amfoterisin (2 mg/lit) Campylobacter rowht supplement (Oxoid)
<b>**Karkoal (charcoal)-Bazlı selektif besiyeri</b>	Columbia agar base (GİBCO)	Hematin (0.032 g/lit) Sodyum piruvat (0.1 g/lit) Vankomisin (20 mg/lit) Sefaperazon (32 mg/lit) Sikloheksimid (100 mg/lit)

**Tablo 4:** *C. jejuni* izolasyonu için seçici besiyerlerinin formülleri (284).

\*: %5 defibrine at kanı + Saponinli, \*\*:Kansız, karkoallı, \*\*\*: %7 defibrine at kanlı

Kampilobakter türleri bağırsak florasındaki diğer bakterilerden daha geç ve güç üremektedir. Bu sebeple kolay üreyerek kültür plağına hâkim olan flora bakterilerinin kültür ortamından elimine edilmesi için, örnekler ya direkt selektif besiyerine ekilmeli ya da dışkının % 10'luk süspansiyonu yapıldıktan sonra 0.65 µm por çaplı selüloz asetat filtrelerden süzülüp, süzütünün 0.45-0.25 µm por çaplı membran filtreden tekrar süzülükten sonra membranın uygun besiyerlerine konulması sureti ile ekim yapılmalıdır (253). Selektif besiyerleri kullanılarak kampilobakterlerin izolasyonu oldukça uzun sürmektedir. Özellikle bu etkenlerin çok düşük oranlarda bulunduğu gıda ve çevresel örneklerden izolasyonunda, zenginleştirme aşaması da gerektiğinden, izolasyon için yaklaşık beş günlük bir süreye gereksinim duyulmaktadır. Kültür metotlarının bu dezavantajından dolayı gıda ve çevreden kampilobakterlerin saptanabilmesi için alternatif metotların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur.

Konakçıda kampilobakterlere spesifik poliklonal ve monoklonal antikorların oluşması, bu antikorları tespit eden teşhis metotlarının geliştirilerek kullanılmasına yol açmıştır (4). Kampilobakterlerin hızlı tanısında hasta başı testler olarak tanımlanan, dışkıda kampilobakter antijenlerini araştıran, ProSpecT *Campylobacter* enzim immunoassay ( *Campylobacter*EIA) Campyslide sistem, Meritec-Campy ve Microscreen gibi presipitasyon temelli çok sayıda ticari test geliştirilmiştir. Direkt dışkı örneklerinin yanısıra zenginleştirici besiyerindeki dışkı örneklerinin de değerlendirilebildiği *Campylobacter* EIA testinde, kampilobakterlerin iki yüzey antijenine karşı geliştirilmiş poliklonal antikorlar kullanılmaktadır. Campyslide testi ile dışkı örneklerinden antijen tespitinde, kampilobakterlerin hücre duvar antijenlerine karşı üretilmiş anti-kampilobakter antikorları ile kaplı lateks partikülleri kullanılmaktadır. Meritec Campy testinde ise latex partiküllerinin sensitizasyonunda flagellar antijene karşı geliştirilmiş antikorlar kullanılmaktadır (4).

Bu testler, *C. jejuni*, *C. coli* ve *C. lari* gibi enteropatojen kampilobakterlerin teşhisi için tasarlanmıştır. Meritec-Campy yönteminin çok basit bir şekilde uygulanabilmesi avantajı iken, *C. lari* gibi bazı türleri tespit edememesi dezavantajdır. Microscreen, kampilobakter türlerinin büyük bir çoğunluğu ile reaksiyona girerek bu türleri tespit etmektedir. Ayrıca kampilobakter olmayan türlerle kros reaksiyon oluşturmaması ve Campyslide'ye göre kullanımının daha

kolay olması gibi avantajları vardır. Lateks aglütinasyon metotları standart kültür metotları kadar duyarlı olmamasına rağmen, dışkı ve gıda örneklerinden kampilobakterlerin direkt tespiti için sıklıkla kullanılmaktadır (111, 180). Yine dışkı örneklerinden kampilobakterlerin direkt tespiti için enzim linked immunosorbent assay (ELISA) tekniği kullanılmaktadır. Bu tekniğin spesifitesinin % 99, sensitivitesinin ise % 96 olduğu, 50 adet kampilobakter kültür pozitif ve 114 adet kültür negatif dışkı örneğini inceleyen araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (261). İmmunolojik metotlar rutin laboratuvarlarda kolaylıkla uygulanabilir olup, çok pahalıda değildir. Bu testler konvansiyonel kültür metotlarıyla karşılaştırıldığında, sonuçların daha çabuk elde edilmesi, kolay yorumlanabilmesi ve çevresel koşullara daha az duyarlı olması gibi birçok avantaja sahiptirler.

Kampilobakterlerin insan ve hayvanlardaki prevalansının artış göstermesi, bu türlerin daha çabuk ve güvenilir bir şekilde saptanmasına olanak sağlayacak yeni teşhis yöntemlerinin geliştirilmesi ihtiyacını doğurmuştur. Kampilobakter enfeksiyonlarının tanısında kültürde izolasyon “altın standart” olarak kabul edilmekle birlikte, 24 saatten daha kısa süre içerisinde kampilobakterleri tür düzeyinde tanımlayan, uygulaması kolay, tekrarlanabilir sonuçların elde edildiği, yüksek duyarlılığa sahip, çevresel faktörlerden daha az etkilenen nükleik asit çoğaltma yöntemini (NAA) baz alan, PCR/RFLP, mPCR, AFLP, PCR-hibridizasyon gibi moleküler yöntemler daha yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır (272). Etkenin flagellin gen bölgelerini hedef alan spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen zincirleme polimeraz reaksiyonu (PCR) kampilobakterlerin teşhisi amacıyla uygulanmıştır (4, 49, 200). Ayrıca etkenin 16S ribozomal RNA (rRNA), demir bağlayan protein *ceuE*, aspartokinaz, oksidoredüktaz, 23S rRNA, *hip O*, *mapA*, *Cad F*, *glyA* ve *groEL* genlerini hedef alan PCR uygulamalarına gidilmiştir (44, 74, 76, 122, 144, 147, 166, 272). Bu yöntemlerle çok sayıda örneğin etkene spesifik primerler yardımıyla çok kısa süre içerisinde teşhis edilmesi mümkündür. PCR metodunda, kültür işlemine gerek kalmadan numuneden direkt DNA ekstraksiyonu ile doğru bir şekilde etken teşhisi yapmak mümkündür. Bununla birlikte, son zamanlarda mPCR gibi yöntemler ile birden fazla etkenin aynı anda saptanabilmesine olanak tanıyan metotlar geliştirilmiştir (2, 3). Bu metotların dışında

nested PCR ve PCR-ELISA gibi modifiye edilmiş farklı PCR teknikleri de kampilobakterlerin saptanması için kullanılmıştır (118, 287).

### **1.2. *C. jejuni* ve *C. coli*'nin Moleküler Tiplendirilmesi**

Epidemiyolojik araştırmaların temel amacı mikroorganizmaların kaynak, rezervuar ve yayılma yollarını belirleyerek bunlara karşı kontrol önlemleri geliştirmektir. Bu nedenle infeksiyon olgularından izole edilen aynı cins veya türden olan etkenlerin birbirinin aynı olup olmadıklarının belirlenmesi yani alt tiplendirmenin yapılması gereklidir. Genel anlamda ele alınacak olursa alt tiplendirme; infeksiyon epidemilerinin, çapraz yayılımın bulunup bulunmadığının, infeksiyon kaynaklarının, özellikle virulent suşların tanımlanmasında ve aşılama programlarının izlenmesinde büyük önem taşımaktadır. İnfeksiyon olgularından izole edilen etkenlerin tiplendirilmesi, sadece etkin sağaltıma yönelik ve koruyucu önlemlerin alınmasında değil, aynı zamanda bunlara yönelik eradikasyon planlarının kısa sürede hazırlanması bakımından da oldukça önemlidir (4, 191, 215). Kampilobakterlerin doğru bir şekilde tiplendirilmesi, hem klinik ve epidemiyolojik veriler açısından hem de infeksiyon kaynağının doğru bir şekilde tespit edilmesi açısından oldukça önemlidir. Kampilobakter türlerinin tiplendirilmesi için fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılmaktadır.

#### **1.2.1. Fenotiplendirme**

Kampilobakterlerin tiplendirilmesinde en yaygın olarak kullanılan fenotipik yöntemler, serotiplendirme ve biyotiplendirme dir.

##### **1.2.1.1. Serotiplendirme**

Kampilobakterlerin hastalık etkeni olarak izole edildiği ilk günden günümüze kadar geçen süre içerisinde yapılan çalışmalarda, uygulama güçlüğü, zamana dayalı sonuç üretme ve genetik yapıdaki değişimlere bağlı olarak izolatların biyokimyasal özelliklerinden çok salgın suşlarının antijenik özellikleri ve faj duyarlılıklarına göre identifikasyonunu baz alan fenotipik yöntemler kullanılmıştır. Antijenik özelliklere göre yapılan çalışmalarda Penner ve Lior'un antijenik sınıflandırmasını esas alan serolojik identifikasyon yöntemleri baz olarak alınmıştır. Orijinal Penner yönteminde

indirekt hemaglutinasyon (IHA) tekniği kullanılır ve kampilobakter izolatları ısıya dirençli (TS/HS) antijenlerindeki homolojiye göre identifiye edilirler (211, 217). Bu yöntemin en önemli dezavantajı antijenik benzerlik sebebi ile diğer Gram negatif barsak bakterileri ile çapraz reaksiyonlara bağlı yalancı pozitiflik oranının yüksek oluşudur. Bu sebepten dolayı yöntem daha sonra modifiye edilmiştir. Bakteri aglutinasyonuna dayalı bir yöntem olan, Modifiye Penner yönteminde özgül olmayan aglutinasyonlar ve çapraz reaksiyonların en aza indirilebilmesi için, kampilobakterlerin HS atijenine karşı geliştirilmiş adsorbe serumlar ve bakteri süspansiyonları kullanılmaktadır (86, 217). İngiltere başta olmak üzere Avrupa'da bulunan referans merkezlerinde kampilobakterlerin fenotipik özelliklerine göre tiplendirilmelerinde Modifiye Penner yöntemi, faj tiplendirme yöntemi ile birlikte kullanılmaktadır. Lior yönteminde ise ısıya duyarlı (TL/HL) antijenler lam aglutinasyon testi ile araştırılmaktadır (154). Ancak antiserum panellerinin fazlalığı, tiplendirilemeyen izolatların varlığı, yöntemlerin maliyetinin ve iş yükünün fazla olması gibi nedenlerden dolayı fenotipe dayalı çalışmalarda serotiplendirme yöntemlerinin uygulanabilirliği, referans laboratuvarları ile sınırlı kalmaktadır.

### 1.2.1.2. Biyotiplendirme

Rutin laboratuvarlarda kampilobakter türlerini ayırmak için genellikle oksidaz ve katalaz aktiviteleri, hippuratı hidrolize etme yetenekleri, TSI agarda H<sub>2</sub>S oluşturma özellikleri, sefalotin, nalidiksik asit ve tuz tolerans yetenekleri test edilmektedir. Geçtiğimiz yıllarda yapılan çalışmalarda kampilobakterler; katalaz (+), katalaz (-) ve termofilik kampilobakterler gibi gruplara ayrılmaktayken kampilobakterlerin taksonomisinde meydana gelen değişiklikler, bu testlerin doğruluğu ve geçerliliğinin azalmasına sebep olmuştur (217, 227, 228). Günümüzde *C. jejuni* ve *C. coli*'yi ayırmak için tek biyokimyasal test olarak hippurat testi kullanılmaktadır (Tablo 1). *C. jejuni* hippurat pozitif, *C. coli* ise negatif olmasına rağmen, bazı durumlarda hippurat negatif *C. jejuni* suşları da tespit edilmiştir. Bu nedenle sadece bu testi kullanarak *C. coli*'leri hippurat negatif olan *C. jejuni*'lerden ayırt etmek mümkün olamamaktadır (242). Bazı kampilobakter türleri doğal olarak nalidiksik aside dirençli olduğundan dolayı identifikasyonda bu test de kullanılmaktadır. Ancak kinolonlara dirençli kampilobakter türlerinde, çapraz



dirençle nalidiksik aside direnç de arttığı için bu testle kampilobakterleri ayırmak zordur (4, 223). Kampilobakter türlerinin alt tiplendirilmesinde kullanılan diğer fenotipik yöntemler arasında; antimikrobiyal maddelere duyarlılık (resistotyping), faj tiplendirmesi, etkenlerin morfolojisine ve antijenik özelliklerinin (toksin, flagella, kapsül vs.) tespiti ve immunblotlama (immunoblotting) gibi yöntemler uygulanmaktadır (133, 154, 172, 174, 273, 285). Fenotipik testler kullanılarak kampilobakterler ayırt edilirken iki temel sorun ile karşılaşmaktadır. Bunlardan birincisi; uygulanan testlerin, testi uygulayan araştırmacının kullandığı metodolojiden etkilenmesinden dolayı aynı testi uygulayan farklı araştırmacıların farklı sonuçlara ulaşmasına neden olan standardizasyon eksikliği olup, uygulanan bu testlerin doğruluğuna ve geçerliliğine gölge düşürmektedir. İkincisi ise mevcut fenotipik testlerin kampilobakter gibi taksonomisi kompleks mikroorganizmaları tanımlama yeteneğindeki yetersizliğidir. Şu ana kadar tanımlanan çoğu testler bilinen bir sınıfın fenotipik profili ile bilinmeyen sonuçlarının karşılaştırılması esasına dayanmaktadır. Bu nedenden dolayı kampilobakterlerde bu testlerin kullanılması çeşitli güçlükler içermektedir (192, 216).

Sonuç olarak, faj duyarlılığına göre, antijenik özelliklere göre ve antimikrobiyal duyarlılıklarına göre identifikasyonu esas alan fenotipik tiplendirme yöntemleri, gerek taksonomik gerekse epidemiyolojik çalışmalar için yeterli duyarlılık ve özgüllüğe sahip olmadığından dolayı özellikle epidemiyolojik çalışmalarda, salgınlardan izole edilen suşların tiplendirilmesi ve ilişkilendirilmesinde genotipik yöntemlerin kullanılması istenmektedir (278).

### **1.2.2. Genotiplendirme**

Fenotipik metodların sahip oldukları dezavantajlardan dolayı kampilobakterlerin tiplendirilmesinde de kullanılmak üzere tekrarlanabilirliği, ayırım gücü ve tiplendirilebilirliği daha yüksek olan genotipik yöntemler sıklıkla kullanılmaya başlanılmıştır. Genotipik metodlar ile, tür içinde değişken ancak suşlarda stabil olan belirli genetik göstergeler kullanılarak, epidemiyolojik olarak ilişkili aynı tür içindeki izolatların genetik olarak da ilişkili olup olmadıkları araştırılmaktadır. Moleküler tiplendirme yöntemleri; infeksiyonların kaynağı ve yayılma yolları hakkında hipotezlerin test edilmesi, infekte hayvanların

epidemiyolojik olarak birbiri ile olan ilişkilerinin belirlenmesi, antibiyotik tedavisinin etkinliğinin belirlenmesi, antibiyotik direncinden sorumlu genler hedef alınarak yapılan tiplendirme ile dirençli suşların tanımı ve yaygınlıklarının belirlenmesi, popülasyondaki epidemik suşların zaman içindeki prevalansını izleyerek epidemiyolojik olarak koruma ve kontrol yöntemlerinin değerlendirilmesi, virulensten sorumlu genlerin belirlenmesi ve bunları taşıyan suşların popülasyon içindeki yaygınlıklarının ortaya konulması gibi amaçlara ulaşmada yardımcı olur (4, 10, 69, 278).

Son yıllarda kampilobakterlerin epidemiyolojisini ortaya koymak amacıyla çeşitli tiplendirme metotları geliştirilerek kullanılmıştır. Bu moleküler tiplendirme metotlarının başlıcaları aşağıdaki gibidir (16, 36, 46, 56, 68, 72, 87, 95, 96, 104-107, 121, 134, 139, 142, 147, 152, 160, 165, 168, 199, 208, 231, 232,237, 254, 270, 280, 281).

- Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)
- Macrorestriction profile- pulsed-field gel electrophoresis (mrp-PFGE)
- Restriction fragment length polymorphism (RFLP)
- Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)
- Repetitive extragenic palindromic element-PCR (REP-PCR)
- Random amplified polymorphic DNA (RAPD)
- Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)
- Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE)
- Multilocus sequence typing (MLST)
- Amplified fragment length polymorphism (AFLP)
- Fluorescent amplified fragment length polymorphism (FAFLP)
- Single-enzyme-amplified fragment length polymorphism (SAFLP)
- Single strand conformational polymorphism (SSCP)
- *flaA* typing,
- *hipO* typing,
- Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs)
- Ribotyping (47, 67, 75, 79, 81, 83, 93, 94, 97, 150, 164, 182, 184, 195, 214, 217, 220, 238, 239, 243, 278,)

### 1.2.2.1. PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis)

PFGE, büyük DNA moleküllerinin agaroz jelde elektroforetik olarak ayrıştırılması için geliştirilmiştir. Bu yöntemde, sıvı veya katı besi yerinde üretilen bakteriler, düşük erime ısıyla agaroz karıştırılıp küçük kalıplara dökülmektedir. Agaroz içine karıştırılan bakteri hücreleri, deterjan ve enzim yardımıyla parçalanarak (in situ-lysis) DNA izolasyonu yapılmaktadır (79). PFGE’de bozulmamış DNA gerekli olduğundan, DNA’da kırılmalara yol açabilen rutin DNA izolasyon metotları bu yöntem için uygun değildir (11). Lizis işlemi takiben agaroz kalıpları iyice yıkanarak veya diyalize edilerek protein ve karbonhidrat gibi kontaminantların uzaklaştırılması sağlanır. Büyük olan kromozomal DNA agaroz jel kalıpları içinde kalır. Agaroz içindeki bakteriyel DNA, nispeten az sayıda ve büyük parçalar oluşturan bir restriksiyon enzimi (RE)-(infrequent cutters) ile kesime uğratılmaktadır (in situ-digestion). Daha sonra içinde kesime uğratılmış DNA bulunan kalıplar, elektroforez uygulanacak jel içindeki uygun çukurlara yerleştirilmekte ve belirli aralıklarla yönü değiştirilen elektrik akımına tabi tutulmaktadır. DNA molekülü ne kadar büyükse tekrar yönlenmesi o kadar uzun zaman alır. DNA moleküllerinden tekrar yönlenme zamanı elektrik vuruşunun süresinden az olanlar, büyüklüklerine göre ayrılırlar. Bu tip bir elektrik akımı, 10-800 kilobazlık DNA segmentlerinin net olarak ayırt edilmesine imkan sağlamaktadır. PFGE, 20 kb ile 10 Mb arası uzunluktaki DNA parçalarını ayırır (72, 79, 81, 93, 104, 105, 199, 270). Şu ana kadar PFGE ile ayrıştırılan en büyük kromozom bir mantara aittir ve 12.6 milyon baz çiftinden oluşmaktadır. Elektroforez son olarak etidyum bromid ile boyanarak, her bir izolata ait bant profili görünür hale getirilmektedir (36, 107, 213, 232, 281).

Bu bant profilleri ya çıplak gözle ya da bilgisayar yardımı ile değerlendirilerek suşların birbirleri ile olan ilişkileri ortaya konulmaktadır. Bilgisayara dayalı analizlerde, incelenen mikroorganizmalara ait PFGE profillerinin saklanması ile “veri bankası” oluşturulabilir. Böylece çalışılan suşların profillerinin, daha önce var olan verilerle karşılaştırılma olasılığı oluşmaktadır (191).

PFGE’de yüksek kalitede DNA’nın elde edilmesi oldukça önemlidir. Bu nedenle soğuk tampondaki hücrelerin hızlıca işlenmesi, erimiş agaroz eklemeye önce bakterilerin buzda tutulması ve agaroz kalıplarının soğukta tutulması gerekmektedir (159).

RE seçerken göz önünde tutulması gereken birçok faktör vardır (70);

1. Bakteriyel DNA'nın G+C içeriğidir. Düşük G+C içerikli DNA'lar (*Staphylococcus aureus*'ta olduğu gibi), tanıma bölgesi G+C bakımından zengin olan RE (*SmaI* gibi) ile muamele edildiğinde yeteri kadar kesilememektedir.
2. Tanıma bölgesi uzun olan enzimler, kısa olanlara kıyasla daha az sayıda kesim parçaları oluştururlar.

Büyük DNA parçalarının agarozda ayrıştırılmasına etki eden çeşitli faktörler vardır. Bunlardan başlıcaları (159);

- Agaroz konsantrasyonu
- Tampon konsantrasyonu
- Sıcaklık
- Pulse süresi
- Voltaj
- Toplam elektroforez süresidir.

Yöntemin ayırım gücü oldukça yüksektir. Ancak zaman alıcı ve kompleks bir sistemdir (256). Yöntem uygulanırken, bakterilerin işlenmesi aşamasında kontaminasyonu önlemek için azami dikkat gösterilmelidir. Jeli boyamada kullanılan etidyum bromidin güçlü bir mutajen olduğu göz önüne alınarak, maske ve eldiven giyilerek çevreyi kirletmeden çalışılmaya özen gösterilmelidir. Kampilobakterlerin PFGE ile kesin olarak tiplendirilemeyeceğine dair çelişkili raporlar vardır. Bu problem DNase ürünlerine bağlı olabilir ve formaldehit ile muamele edilince üstesinden gelinebilir (91, 232). Diğer taraftan PFGE yönteminin yüksek ayırım gücü, *C. jejuni* genomunun stabil olmaması ve genomik yapının sürekli olarak mutasyona uğraması sebebi ile uzun süren global epidemilerde, standart indeks suş tayini ve indeks sapmalarının yorumlanmasını güçleştirmektedir. Bu sebeple PFGE yöntemi ancak kısa süreli epidemilerde, suşlar arası genetik ilişki ve indeks suş ile kaynak tespitine yardımcı olabilmektedir. Yine PFGE yöntemi ile total genom analizi yapıldığı için iyi korunmuş yapısal genler (housekeeping) ile ilgili spesifik bilgi edinilememektedir. Böylece bu yöntemle değerlendirilen suşların farklılıkları ortaya konmakta ancak filogenetik ilişkilendirme yapılamamaktadır (194).

### 1.2.2.2. Macrorestriction Profile- Pulsed-Field Gel Electrophoresis (mrp-PFGE)

Tüm bakteri genomunun restriksiyon enzimi ile kesilerek, ortaya çıkan bant profillerindeki polimorfizmin değerlendirildiği macrorestriction profile- pulsed-field jel elektroforezi (mrp-PFGE) kampilobakter izolatlarının genotiplendirilmesinde altın standart olarak gösterilmektedir. Bu yöntemde kampilobakter DNA'sı parçalanmadan bir bütün olarak izole edildikten sonra, *Sma* I veya *Kpn* I restriksiyon enzimi ile kesilerek elde edilen DNA parçaları, elektroforezle yürütülmekte ve ortaya çıkan paternler karşılaştırılarak çok sayıda suş aynı anda değerlendirilebilmektedir. DNA'nın *Sma* I restriksiyon enzimi ile kesilmesi ile büyüklükleri 40 ila 400 bp arasında değişen 4 ile 20 bant ortaya çıkmaktadır. Ancak DNA'nın *Kpn* I enzim ile kesilmesi sonucunda daha çok pant profili elde edildiği, bu nedenle bu enzimin kullanıldığı PFGE'in ayırım gücünün daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Bazı araştırmacılar kampilobakter izolatlarının genotiplerinin belirlenmesinde eş zamanlı olarak her iki enzimin kullanıldığı mrp-PFGE yöntemlerinin kullanılmasını ve sonuçların korele edilmesini önermektedir (194).

### 1.2.2.3. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesime uğratıldıktan sonra, agaroz jel elektroforezine tabi tutulup, etidyum bromid ile boyanan jelde oluşan DNA bantlarının yeri ve sayısı kıyaslanarak elde edilen çeşitliliğe "restriction fragment length polymorphism, RFLP" adı verilir (75, 79, 81, 215, 239, 243). RFLP metodu sıklıkla moleküler biyologlar tarafından DNA parçacıklarını incelemek için, genetik materyalin ölçülmesinde ve haritalanmasında kullanılır. DNA, enzimlerle kesildiğinde farklı uzunlukta parçalar oluşur ve analizlerde değişik pozisyonlarda görülürler. Restriksiyon enzimleri (RE), çok özgül olarak DNA'yı belirli yerlerinden keserek genellikle 1.000-20.000 baz çiftlik parçalar oluşturan enzimlerdir. 1970'li yıllardan sonra R.E. kullanımına bağlı olarak rekombinant DNA teknolojisi hızla gelişmiş ve bu gelişme seçilen bir genin çoğaltılmasını, genin kodladığı proteinin üretilmesini, genin diziliminin belirlenmesini ve bu gende değişimler yapılmasını mümkün hale getirmiştir. Bu gün 230'un üzerinde farklı DNA dizilimini tanıyan yaklaşık 3000'den fazla RE vardır. Sıklıkla kullanılan R.E. arasında *Eco*RI, *Cla*I, *Hind*III ve *Hind*fl sayılabilir (11, 63, 70, 213). Kampilobakterlerin PCR-RFLP ile

tiplendirilmesi için şimdye kadar *AluI*, *DdeI*, *HinfI*, *EcoRI* ve *PstI* gibi enzimler yalnız ya da çeşitli kombinasyonlarda kullanılmıştır (8, 38). Sadece *HinfI* ile yapılan kesme işleminin yeterli olmadığı görülmüştür (197). Buna karşılık *DdeI*, hayvan orijinli izolatlar için en iyi ayırım gücü sağlayan enzim olarak bildirilmiştir (22).

RFLP analizinde çok farklı teknikler kullanılmakla beraber başlıca iki temel teknik uygulanmaktadır. Bunlardan birisi Southern Blotting tekniği; diğeri ise PCR tekniğidir (11, 70). RFLP analizi bakteriyel kromozomun restriksiyon profillerini belirlemede kullanılmaktadır (70, 72, 75, 87, 95, 182, 214, 239). Yöntem dört temel aşamada gerçekleşmektedir;

1. DNA'nın izolasyonu,
2. DNA'nın RE ile kesimi,
3. Kesilen DNA'nın elektroforezi,
4. Jeldeki DNA'ların görüntülenmesidir.

Bu yöntemde en önemli basamak, DNA'nın hücre dışına çıkarılması ve saflaştırılmasıdır. Aksi halde enzimler DNA'yı kesemez veya kısmen keser. DNA izolasyonuna Gram negatif bakterilerde önce lizozim, sonra Triton-X100 gibi iyonik olmayan, ya da sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi iyonik bir deterjanla başlanabilirken, Gram pozitiflerde lizodafin ya da genel amaçlı litik enzimler (mutanolysin, achoromopeptidase) tercih edilir. Fenol-kloroform ekstraksiyonuyla bu çözültiden protein ve lipitte çözünür materyaller uzaklaştırılır. Sıvı fazdaki DNA etanol ya da izopropanol ile çöktürülür, takiben %70'lik alkolle yıkanır ve çoğunlukla Tris-EDTA (10 mM Tris – 1 mM EDTA) çözültisi ile yeniden süspansiyon edilir (11, 70, 213).

RFLP yöntemi kolaylıkla uygulanabilen, yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip duyarlı bir yöntemdir. Ancak enzim seçimi önemlidir. Çok sayıda ya da çok yakın bantları değerlendirmek mümkün olmayabilir. Az sayıda mikroorganizma ile çalışıldığında değerlendirme nispeten kolay iken, sayı arttıkça kıyaslama güçleşmektedir.

İyi ayırt ediciliği açısından avantajlı gibi görünmekle birlikte; yöntemde bulunan DNA izolasyonu, enzimlerle kesme, elektroforez, blotlama, hibridizasyon basamakları zaman alıcı ve oyalayıcıdır. Ayrıca her tür için uygun enzimler

seçilmelidir ve iki ya da üç enzimin kullanılmasıyla ayırt edicilik artırılmalıdır (11, 70).

#### **1.2.2.4. Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)**

Kromozomal DNA'nın RE ile kesilmesi saf ve fazla miktardaki DNA varlığında iyi sonuç vermektedir. Ancak, bu yöntemlerde özgüllüğü artırmak amacıyla eklenen hibridizasyon basamağı zamanı uzatmaktadır. Bu nedenle örnekteki nükleik asidin amplifikasyonu yapılarak alt-tiplendirme daha kısa zamanda ve yüksek güvenilirlikte gerçekleştirilebilmektedir. PCR ile özel bir genomik bölge amplifiye edilerek suşlar arasındaki çeşitliliği ya da antibiyotik direncini göstermek mümkün olabilmektedir. Lokus spesifik PCR sonrası amplifikasyon ürününün RE ile kesilmesiyle yöntemin ayırt ediciliği artırılmaktadır (4, 11, 70).

#### **1.2.2.5. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)**

Bu yöntemde bilinen özgül bir DNA bölgesini çoğaltmak yerine, rasgele seçilen bir veya daha fazla primerle DNA'daki birçok bölgenin çoğaltılması gerçekleştirilmektedir. Primerlerin bağlanma yerleri arasındaki uzaklık farklılıkları agaroz jelde saptanabilen farklı sayı ve uzunluktaki (baz çifti) bantların oluşmasına neden olur. Kullanılan primerler genellikle 9-10 bazlık primerler olup G-C'ce zengindir (en az %40 mol G+C içermelidir). *Kampilobakter* türlerinin RAPD ile tiplendirilmesinde en sık kullanılan primerin OPA-11 olduğu rapor edilmiştir (112, 113). Bağlanma (annealing) ısısı 45-50<sup>0</sup>C'ye düşürülmüştür. Düşük sıcaklık derecesinde gerçekleştirilen bağlanma aşamasında, seçilen primerler kromozom üzerinde hem kendilerine özgü bölgelere, hem de kendilerine özgü olmayan bölgelere bağlanmaktadır. Aynı tür içerisindeki farklı suşlarda primerlerin bağlanma yerlerinin sayısı ve birbirlerine olan uzaklıkları değişik olacağından, agaroz elektroforezinde amplifiye edilen parçaların sayı ve büyüklüğü de farklılık gösterecektir (46, 70, 72, 93, 208).

Amplifikasyon sonucunda jel elektroforezinde gözlenen her bir izolata ait bant profilleri birbirleriyle karşılaştırılır. Aynı bant profilleri gösteren izolatlar epidemiyolojik olarak ilişkili olarak yorumlanabilir.

Uygulama kolaylığı ve kısa sürede sonuç verebilme açısından geniş kullanım alanı bulunan bu yöntemin önemli dezavantajlarından biri, henüz standardizasyonunun sağlanamamış olması, dolayısıyla laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliğinin düşük olmasıdır (25, 221, 278). Diğer bir dezavantajı ise bant paternlerinin DNA konsantrasyonundan etkilenmesi ve yorumlanamayan minör bantların ortaya çıkabilmesidir (4).

#### 1.2.2.6. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Bu yöntem, “selective restriction fragment amplification (SRFA)” olarak da bilinir. Genomik DNA'nın restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu oluşan DNA parçacıklarının bir grubunun selektif amplifikasyonu esasına dayanan bir genotiplendirme metodudur. İki varyasyonu bulunmaktadır. Birinci varyasyonda iki farklı restriksiyon enzimi (RE) ve amplifikasyon için iki farklı primer kullanılmakta, ikincisinde ise tek primer ve tek RE kullanılmaktadır (67, 68, 70, 72, 93, 139, 237, 278).

En yaygın kullanım şekli; bakteriyel DNA ekstrakte edilmekte, saflaştırılmakta ve iki adet RE ile (*EcoRI* ve *MseI*, *HindIII* ve *TaqI* gibi) kesilmektedir. Restriksiyon ürünü olan DNA segmentleri, her bir RE için hazırlanmış olan adaptörler (restriction-half-site-specific adaptors: Bu adaptörlerde her enzimin kesimi için gerekli olan baz dizilimi hem de PCR amplifikasyon primeri için bağlanma bölgesi bulunmaktadır) ile ligasyona sokulmaktadır. RE-ligasyon ile oluşan DNA, amonyum asetat ve saf alkol ile çöktürülür, %70'lik alkol ile yıkanır, distile suda süspansiyon edilerek PCR'da kullanılır (96, 278, 280). Amplifikasyonda kullanılan primerler adaptöre uygun baz dizilimi yanında 3' uçlarında 1-2 selektif baz da içermektedir. Örneğin; *EcoRI* enziminin kesim noktasına göre hazırlanan bir primer 5'-GAATTCAA-3' baz dizilimini içermelidir. Bu bazlardan ilk altısı *EcoRI* kesim bölgesinin komplementeri, 3' ucundaki son iki AA ise selektif amplifikasyonu sağlamaktadır. Bu iki AA sayesinde, genomik DNA'nın *EcoRI* ile kesimi sonucu oluşan parçalarda yalnızca 3'-CTTAATT-5' olanların selektif amplifikasyonu oluşmaktadır (kesim yerinde baz dizilimi 3'-CTTAATC-5' olan parçalar amplifiye edilememektedir). Amplifikasyon ürünü, poliakrilamid-üre sequencing jelde elektroforeze tabi tutulabilir (AFLP). Kullanılan primerlerin <sup>32</sup>P ile işaretlenmesi



durumunda, poliakrilamid jelde yürütülen bantlar röntgen filmine aktarılarak değerlendirilebilir ya da primerler floresan madde ile işaretlenir ve sonuçlar bilgisayar programı ile analiz edilebilen dalgalara dönüştürülüp, otomatize floresansı okuyan sekans analiz cihazlarında görüntülenmektedir (FAFLP). Ayrıca jel etidyum bromid ile boyanarak bantlar UV ışığı altında da gözlenebilir (47, 70, 92, 96, 106, 185, 248).

Bu tekniğin en büyük avantajı ayırım gücünün yüksek ve hızlı sonuç veriyor olması, dezavantajı ise kompleks olmasıdır. Ayrıca maliyeti diğer testlerle karşılaştırıldığında oldukça yüksektir (278).

#### **1.2.2.7. Multilocus sequence typing (MLST)**

Global moleküler epidemiyolojik çalışmalarda filogenetik ilişkiyi ortaya koyan en uygun yöntemler arasında yer alan multilocus sequence typing (MLST) ve multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) yöntemleri birbirinin analogu olan iki yöntemdir. Subtiplemeye indeks oluştururken, MLST ile kampilobakterlerdeki çok sayıdaki “housekeeping” gene ait çeşitli lokusların dizi analizi yapılırken MLEE bu genlerinin kodladığı enzimlerdeki polimorfizmin tespitini baz alır. “Housekeeping” genlerdeki mutasyonlar çok yavaş gelişir ve sıklıkla sessiz mutasyonlardır. Yani meydana gelen mutasyonlar enzimin tabiatını değiştirmez. Bu sebeple MLEE ve özellikle MLST bazlı metodlar, tiplendirilen suşlar arasındaki filogenetik ilişkiyi de ortaya koymaları sebebi ile global epidemilerde başarı ile kullanılmaktadır. Multilocus sequence typing (MLST) ile dizi analiz yapılan lokuslardan elde edilen her allele bir kod verilerek, her suş için bir dizi tipi (ST) belirlenmekte ve elde edilen veri tabanları dijital ortamda saklanmaktadır. Bu metod, otomatize sistemlerde dizi analizinin kolaylıkla yapılabilmesi, daha yüksek ayırım gücüne sahip olması, hedef lokuslarda yavaş gelişen mutasyonlar sebebi ile daha stabil ve tekrarlanabilir sonuçların üretilebilmesi ve elektronik ortama taşınabilen sonuçlarla daha stabil indeks oluşturulabilmesi sebebi ile yaygın kullanım alanı bulmuştur (64).

#### **1.2.2.8. Flagellin (*fla A*) Typing**

*C. jejuni*'nin flagella gen lokusu iki flagella geni (*FlaA* ve *FlaB*) içerir ve 170 nükleotit ile ayrılır. Hem yüksek derecede korunmuş hem de değişken bölgelerin

mevcut olduğu bu lokus, PCR ürünlerinin RFLP analizi için elverişlidir (96). Yöntemde, araştırılacak izolatın DNA'sı saf olarak elde edildikten sonra, *FlaA* genine özgü dizayn edilmiş primerlerle PCR uygulanır. Primerlerin bağlanmasını takiben genom RE ile kesilerek oluşan DNA parçaları agaroz jelde yürütüldükten sonra oluşan bantlar yardımıyla tiplendirme yapılır (79, 150, 184).

En az yedi *fla* tiplendirme prosedürü geliştirilmiştir (8, 22, 26, 38, 136, 183, 189). PCR-RFLP prosedürleri içinde, DNA ayırma teknikleri, primer dizaynı, annealing sıcaklıkları, kullanılan restriksiyon enzimleri ve türlerin genotipik adlandırılmaları gibi önemli kısımlar vardır (8, 26, 38, 183, 189, 198).

*FlaA* lokusunun korunmuş bölgeleri, *C. jejuni*'den başka diğer türlerde de kısmen korunmuştur. Bu nedenle, *C. jejuni* soylarının tiplendirilmesi için geliştirilmiş primerler, bu patojen ile benzer suşlar için de kullanılabilir. Flagella tiplendirmesi (*fla*) *C. jejuni* subsp *doylei*, *C. coli*, *C. lari* ve *C. helveticus* türlerinin çoğu için geçerliliği kanıtlanmış kıymetli bir tiplendirme yöntemidir (198).

Primer setleri özellikle *flaA* gen sırasının çoğaltılmasına yönelik dizayn edilmiştir. Çoğu vakalarda restriksiyon fragmentlerinin toplam uzunluğu içinden sadece bir *fla* geninin çoğaltılması önerilir. Çoğu metotta üç primer kombine olarak *flaA* ve *flaB* nin ayırımı ve çoğaltılmasında kullanılır (22, 167).

*FlaA* çoğaltma seti, mevcut *flaA* dizilişindeki polimorfizmi en üst düzeyde belirlediği gibi önceden tanımlanmış primer ile eşleşen bölgeleri bir çok suşta belirlemiştir (183).

Restriksiyon enzimleri birbirlerine anlamlı bir şekilde benzemeyen PCR ürün fragmentleri oluşturmak için kullanılmaktadır. *AluI*, *DdeI*, *HinfI*, *EcoRI* ve *PstI* enzimleri ve bunların kombinasyonları güncel olarak kullanılmaktadır. *HinfI* ile yapılan kesimde bantlar yeterince ayırıcı olmaz iken, *AluI* ürünlerinin bantları çok küçük olup pratik olmayabilir, *DdeI* ise iyi ayırımı sağlar. Ayırımı seviyesi *DdeI* ve *HinfI* enzimlerinin birlikte kullanılması ile artırılabilir (8, 22, 26, 38, 183, 197, 198).

*FlaA* tiplendirme metodu kullanışlı, güvenilir, kısa sürede sonuç veren ve nispeten yalın bir alt tiplendirme tekniği olmasına karşın, prosedürdeki varyasyonlar sonuçların farklı laboratuvarlar arasında doğrudan karşılaştırılmasına olanak vermez.

Bunun için de kullanılan primerlerin ve restriksiyon enzimlerinin uluslararası standardizasyonu gerekmektedir.

#### 1.2.2.9. Hip O Typing

*C. jejuni*'nin alt tiplendirilmesinde kullanılan bir metottur. *C. jejuni* sodyum hippuratu hidrolize etmesi ile diğer termofilik kampilobakter türlerinden ayrılır. Bu alt tiplendirme metodunun amacı; *C. jejuni*'nin sodyum hippuratu hidrolize etmesini sağlayan *HipO* [benzoilglycine amidohidrolase (hippuricase)] geninin, *C. jejuni* alt türlerindeki farklılıklarını ortaya koyarak alt tür seviyesinde tür teşhisini sağlamaktır (109).

*C. jejuni* olduğu düşünülen suşlar sodyum hippurat içeren besi yerlerinde 37°C'de 24 saat inkübe edilir. Hippurat pozitif olan kolonilerde koyu mor renk görülür. Amplifikasyonda kullanılacak primerler dizayn edilir. Bunun için ticari olarak 5'-GTACTGCAAATAGTGGCG-3'(Hip1) ve 5'-GAGCTTTTAGCAAACCTTCC-3' (Hip 2) olmak üzere iki adet 20 bazlık setler bulunmaktadır. *HipO* geni primerler ve PCR yardımıyla amplifiye edildikten sonra RFLP analizi uygulanarak oluşan bantlar karşılaştırılır. Farklı alt türlerde, farklı sayıda ve büyüklükte bantlar oluşacağından alt tür ayırımına gidilmiş olur (109, 207, 243).

#### 1.2.2.10. Ribotyping

Ribozomal RNA (rRNA) genlerinin restriksiyon (RFLP) analizine dayalı bir yöntem olan ribotiplendirme yöntemi de taksonomik ve epidemiyolojik araştırmalarda yoğun olarak kullanılmıştır. Bir çok araştırmacı, ribotiplendirme yönteminin başarısının seçilen prob ve enzime bağlı olduğunu, sadece 23S rRNA'yı hedef alan prob kullanıldığında yöntemin ayırım gücünün düşük olacağını belirterek, 16S rRNA'yı yada hem 23S rRNA hemde 16S rRNA genini hedef alan prob ve iki farklı enzim kullanılması halinde yöntemin başarısının daha yüksek olacağını bildirmiştir (54, 57). Ribozomal RNA genindeki bölgelerin korunması ve bağlanma bölgelerinin yüksek oranda değişkenlik göstermesinden dolayı bu genler, alt tiplendirme amaçları için uygun hedeflerdir (57). Ribozomal genler esas alınarak yapılan genotiplendirme için ikinci bir teknik ise, rRNA genleri için spesifik bir prob

ile Northern blot hibridizasyonunu takip eden kesilmiş genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezidir. Daha önceden kullanılan ribotiplendirme yöntemleri *C. jejuni* ve *C. coli* suşlarının tam olarak ayırımında başarısız kalmış olup, son yıllarda hem 23S hem de 16S rRNA genine spesifik problemler ile iki restriksiyon enzimi kullanılarak kampilobakterler tiplendirilmiştir (54, 77, 80). Ribotiplendirmede kromozomları kesmek amacıyla kullanılan restriksiyon enzimleri farklılıklar göstermektedir. *PstI*, *HaeIII*, *HindIII* ve *PvuII* tek başlarına, çift ya da bazen üç enzimi içeren kombinasyonlar halinde kullanılabilir (80, 90). Bu metot, düşük ayırım gücü ve uygulama zorluğu nedeni ile rutin genotiplendirme için uygun değildir. Ayrıca ribotiplendirmenin yüksek maliyeti, kompleks oluşu, uygulamada yoğun emek gücü gerektirmesi ve sonuçların uzun sürede alınması ribotiplendirme yöntemlerinin dezavantajı olarak gösterilmiştir (54, 278).

### 1.2.3. Tedavi ve Koruma

Kampilobakter infeksiyonları sığır, koyun ve insanlarda genellikle kendiliğinden geçtiğinden dolayı tedaviye gerek yoktur. Fakat genç hayvanlarda meydana gelen kampilobakter infeksiyonlarının tedavisi gerekmektedir. Bu amaçla, hayvanlara oral ya da parenteral yolla enrofloksasin, kloramfenikol, eritromisin, gentamisin ve tetrasiklin gibi antibiyotik tedavisinin yanı sıra sıvı tedavisi uygulanmaktadır. Gebe hayvanlarda eğer erken dönemde hastalık teşhis edilip antibiyotik tedavisi uygulanırsa abort olayları büyük oranda önlenir (4, 9, 78). Kampilobakterlerin neden olduğu abortlardan korunmanın en etkin yolu aşılama değildir. Bu amaçla *C. jejuni*, *C. coli* ve *C. fetus* subsp. *fetus*'u içeren bivalent aşılar kullanılmaktadır. Hastalığı atlatan hayvanlar bağışıklık kazandıkları için böyle hayvanlara aşı yapılmasına gerek yoktur. Aşılama sadece sürüye yeni giren hayvanlar ile ilk kez gebe kalan hayvanlara uygulanır. Enterik kampilobakter infeksiyonlarına karşı ise bir aşı geliştirilmemiştir. Böyle infeksiyon durumlarında hasta hayvanların sürüden ayrılması, farklı hayvan türleri arasındaki temasın azaltılması, yem ve suların dışkı ile bulaşmasının engellenmesi başlıca koruyucu önlemlerdir (4, 12, 78).

İnsanlarda sıvı-elektrolit replasmanı diğer enteritli olgularda olduğu gibi tedavinin temelini oluşturmaktadır. Ancak yüksek ateş ve kanlı ishali olan, dışkı

sayısı günde 8'den fazla veya ishali bir haftadan daha uzun süren hastalarda, gebelerde, HIV enfeksiyonlu veya diğer immunsistemi baskılanmış hastalarda ve ekstra-intestinal tutulumu olan hastalarda antimikrobik tedavi önerilmektedir. Kampilobakterler genel olarak makrolid, kinolon, aminogikozit, tetrasiklin gurubu antibiyotiklere ve kloramfenikole duyarlıdır (217).

Yüksek doku düzeyi sağlaması ve ciddi toksisitesinin olmaması nedeniyle eritromisin, kampilobakter enfeksiyonlarının tedavisinde en fazla tercih edilen antibiyotiktir. Endikasyonu olan hastalarda, eritromisinin yetişkinlerde 6 saat ara ile 250 mg; çocuklarda ise dört eşit dozda 30-50 mg/kg/gün olacak şekilde bir hafta süre ile kullanılması önerilmektedir. Eritromisin tedavisinin kampilobakterlerin dışkıdan atılımını hızlandırdığı, relapsları azalttığı, ancak hastalığın süresini etkilemediği bildirilmektedir (125).

### 1.3. Amaç

Bu çalışmada;

- a) Kars ilindeki kombina ve mezbahanede kesimleri yapılan sığırların bağırsak içeriği ve safra örneklerinden, merkez köylerdeki koyunlardan toplanan rektal svap örneklerinden, Kars merkezindeki kasaplarda kesilen koyunlardan toplanan safra örneklerinden ve kombina ile kasaplarda çalışan insanların ve Kars Devlet Hastanesinden alınan dışkı örneklerinden termofilik *Campylobacter* türlerinin izolasyonu ve *C. jejuni* ve *C. coli*'nin spesifik mPCR ile identifikasyonu,
- b) *C. jejuni* ve *C. coli* olarak identifiye edilen izolatların *flaA* gen bölgesinin spesifik olarak PCR ile çoğaltılması,
- c) Bu etkenler arasındaki genetik farklılıkların *flaA* tiplendirme yöntemi ile ortaya konması,
- d) Yörede termofilik *Campylobacter*'lerden olan *C. jejuni* ve *C. coli*'nin epidemiyolojisi hakkında bilgi sahibi olunması,
- e) Bölgede hayvan yetiştiriciliğinin temelini teşkil eden sığır ve koyunlardan izole edilen türlerle, insanlardan izole edilenler arasında genetik benzerliğin ya da farklılığın belirlenmesi amaçlandı.

## 2. GEREÇ ve YÖNTEM

### 2.1. Örneklerin Toplanması

#### 2.1.1. Sığırlardan Örnek Toplanması

Çalışmada materyal olarak Temmuz-Eylül 2009 tarihleri arasında Kars ilindeki bir mezbahada ve kombinada kesilen klinik olarak sağlıklı görünüşteki sığırlardan, 150 safra sıvısı ile 150 bağırsak içeriği olmak üzere toplam 300 farklı sığırdan 300 örnek toplandı (Tablo 3).

#### 2.1.2. Koyunlardan Örnek Toplanması

Temmuz 2009 da Kars ilinin batısındaki merkez köylerde bulunan sürülerdeki koyunlardan; 200 rektal svap örneği toplandı (Tablo 3).

#### 2.1.3. İnsanlardan Örnek Toplanması

Temmuz-Ağustos 2009 tarihleri arasında Kars ilindeki mezbahane, kombina ve kasap çalışanlarından 34, Kars Devlet Hastanesinden tamamı ishalleri hastalara ait 86 dışkı örneği toplandı (Tablo 3).

Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyler Yerel Etik Kurulundan 03.07.2009 tarih ve 26 sayı ile alınan etik kurul raporu çerçevesinde gerçekleştirilmiştir.

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

Safra örnekleri steril enjektörler vasıtası ile alındı. İnsanlardan dışkı örnekleri Modifiye Carry-Blair besiyeri içerisine eküvyon yardımı ile alındı. Bağırsak içerikleri kesimden hemen sonra dışarı çıkarılan ince bağırsaklardan svap yardımı ile alınarak % 0,9 NaCl içeren tüplere transfer edildi. Rektal svaplar da Modifiye Carry-Blair besiyeri içerisine pamuklu eküvyon yardımı ile alındı. Örnekler alınırken tüm hijyen kurallarına uyuldu ve rutin bakteriyolojik incelemeler için uygun şartlar altında (+4 °C'de) ve kısa sürede laboratuvara ulaştırıldı.

Bu çalışmada Kars merkez ve merkeze bağlı köylerden getirilen hayvanlardan hedeflenen sayıya ulaşmak için küme örnekleme yöntemi ile örnekleme yapıldı. *C. jejuni* 'nin sığır, koyun ve insan izolatları için prevalans oranları sırasıyla % 62, % 56

ve % 13 alındı (13, 202). Bu oran (prevalans) doğrultusunda çalışmadaki örnek miktarı % 95 güven aralığı ve % 5 kesinlik derecesi ile sığırlarda 337, koyunlarda 354, insanlarda da 143 olarak hesaplandı (62, 259).

$$N (t_{1-\alpha})^2 (p.q)$$

$$n= \frac{S^2(N-1)+S^2(p.q)}{(t_{1-\alpha})^2 (p.q)}$$

$$S^2(N-1)+S^2(p.q)$$

( $t_{1-\alpha}$ ): belirli güven düzeyinde t tablosundan sonsuz serbestlik derecesinde bulunacak değer.

p: önceki araştırmalardan elde edilen oran.

q: incelenen olayın meydana gelmeme olasılığı (1-p).

$S^2$ : araştırmada belirlenecek oranın standart hatası.

**Tablo 5.** Çalışmada incelenen örnekler ve türlere göre dağılımı.

Kaynak	Sığır	Koyun	İnsan	Toplam
Safra	150	150	---	300
Dışkı	---	---	120	120
Bağırsak içeriği	150	---	---	150
Rectal svap	---	200	---	200
<b>Toplam</b>	<b>300</b>	<b>350</b>	<b>120</b>	<b>770</b>

## 2.2. *Campylobacter* İzolasyonu ve İdentifikasyonu

### 2.2.1. *Campylobacter* İzolasyonu

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



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

## **2.2.2. Multipleks Zincirleme Polimeraz Reaksiyonu (mPCR) ile *C. jejuni* ve *C. coli*' nin İdentifikasyonu**

### **2.2.2.1. DNA Ekstraksiyonu**

*Campylobacter* spp. izolatlarının tür bazında mPCR ile identifikasyonu amacıyla öncelikle şüpheli izolatlardan DNA ekstraksiyonu işlemi gerçekleştirildi. Bu amaçla; şüpheli izolatların bulunduğu petri kutularından 8-10 koloni alınarak içerisinde 100 µl steril fizyolojik tuzlu su (FTS, pH:7.2) bulunan Eppendorf tüplerinde süspansiyon edildi. Her bir örneğe 1 ml FTS eklenip vortekslendikten sonra soğutmalı santrifüjde +4°C'de 13000 devirde 10 dakika santrifüjlendi. Peletin üzerindeki sıvı pipetle alındıktan sonra 200 µl FTS ile bakteri süspansiyonu yapıldı. Her bir süspansiyona 3 µl Proteinase K (20 mg/ml) ve 400 µl TNES buffer ilave edilip hafif vortekslendikten sonra blok ısıtıcıda 65°C'de 15-20 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra süspansiyon hafif vortekslenip ardından da pikofüjde hafif (5-10 tur) santrifüjlendi. Toplam miktar (600 µl) kadar kloroform/izoamil alkol (24/1) katıldı. Her bir gode 15 saniye kuvvetlice vortekslendi. Soğutmalı santrifüjde +4°C'de 13000 devirde 10 dakika santrifüjlendi. Orta faza dokunmaksızın üst fazdan, dikkatli bir şekilde 200-400 µl alınarak diğer bir Eppendorf tüpüne aktarıldı. DNA süspansiyonuna 3 M sodyum asetat'tan 1/10 volüm ve absolut alkolden ise 2,5 volüm katıldıktan sonra 10-15 sn vortekslendi ve -20 °C'de bir gece bekletildi. Soğutmalı santrifüjde +4°C'de 13000 devirde 10 dakika santrifüjlendi ve pelete zarar vermeden alkol boşaltıldı. Elde edilen pelet 1ml % 70'lik etanol ile yıkandı. Hafif vortekslendikten sonra soğutmalı santrifüjde +4°C'de 13000 devirde 10 dakika santrifüjlendi. Pelete zarar vermeden alkol boşaltıldı. Godeler kağıt havlu üzerine

ters konularak 10-15 dakika kurutuldu. DNA peleti 100 µl DNAz free suda süspansiyon edilerek template olarak kullanıldı(4).

### 2.2.2.2. Multipleks Zincirleme Polimeraz Reaksiyonu (mPCR)

İzole edilen termofilik kampilobakterlerin tür düzeyinde identifikasyonu amacıyla mPCR kullanıldı. Bu amaçla PCR karışımı aşağıdaki gibi hazırlandı;

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
10X PCR Buffer	5 µl
25mM MgCl <sub>2</sub>	5 µl
10mM dNTP	1 µl
C1 primeri 100pmol/µl	Misawa ve ark. (166) 1 µl
C4 primeri 100pmol/µl	Misawa ve ark. (166) 1 µl
CC18 primeri 100pmol/µl	Misawa ve ark. (166) 1 µl
CC519 primeri 100pmol/µl	Misawa ve ark. (166) 1 µl
Template DNA	6 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase (MBI, Fermentas)	0,25 µl
<u>ddH<sub>2</sub>O</u>	<u>28,75 µl</u>
Toplam	50 µl

Toplam 50µl'lik volümde hazırlanan PCR karışımı thermalcycler (MJ Mini Personal Thermal Cycler, Bio Rad) cihazında gerçekleştirildi. PCR amplifikasyonunda 94 °C'de 1 dakika ön denaturasyon aşamasını takiben, toplam 35 PCR siklusu 94 °C'de 30 saniye denaturasyon, 58 °C'de 30 saniye hibridizasyon ve 72 °C'de 1 dk sentez olarak gerçekleştirildi. Son siklusu müteakip 72 °C'de 5 dakika son zincir uzatma aşaması gerçekleştirildi. Amplifiye edilen PCR ürünleri ethidium bromide (10 mg/ml) eklenmiş % 1,5'lük agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra Ultra Violet (UV) transilluminatörde (Vilber Lourmat) incelenerek sonuçlar değerlendirildi. Oluşan bantların moleküler ağırlığını saptamak amacıyla 1 Kb 'lik DNA ladder plus (MBI, Fermentas SM 1331) kullanıldı. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi neticesinde oluşan 159 bp moleküler uzunluğundaki bantlar *C. jejuni* ve 502 bp moleküler uzunluğundaki bantlar *C. coli* göstergesi olarak kabul

edildi. PCR’de pozitif kontrol olarak Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezinden sağlanan *C. jejuni* [RSKK ( Refik Saydam Kültür Kodu ) 11322] ve *C. coli* [RSKK 11366] referans suşları ve negatif kontrol olarak distile su kullanıldı.

mPCR’da 159 bp ve 502 bp moleküler uzunluğunda bantlar oluşturmayan izolatlar; selektif besiyerinde ve 42 °C’de mikroaerobik ortamda üreyebilmeleri, koloni morfolojileri ve mikroskopik görünüm (Gram boyama)’lerinde spiral veya “S” şekilli olmalarından dolayı *Campylobacter* spp. olarak değerlendirildi.

### 2.3. *C. jejuni* ve *C. coli*’nin Moleküler Tiplendirilmesi

#### 2.3.1. Flagellin A (*FlaA*) Geninin PCR Amplifikasyonu

*FlaA* geninin amplifikasyonu amacıyla PCR karışımı aşağıdaki gibi hazırlandı;

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
10X PCR Buffer	5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	5 µl
10 mM dNTP	1 µl
Fla1 primeri (f) 100pmol/µl Nachamkin ve ark. (182)	1 µl
Fla2 primeri (r) 100pmol/µl Nachamkin ve ark. (182)	1 µl
Template DNA	5 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase (MBI, Fermentas)	0,25 µl
<u>ddH<sub>2</sub>O</u>	<u>31,75 µl</u>
Toplam	50 µl

Tür spesifik PCR ile *C. jejuni* ya da *C. coli*’ye ait olduğu belirlenen DNA örneklerinde *flaA* geninin amplifikasyonu amacıyla Nachamkin ve arkadaşları tarafından bildirilen ve *flaA* geninin 1700 bp’lik bir kısmını amplifiye eden bir çift spesifik primer (Tablo 4) kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirildi (182). PCR karışımı hazırlandıktan sonra amplifikasyon işlemi; 94 °C’de 1 dakika ön denaturasyonu takiben, 94 °C’de 1 dakika denaturasyon, 45 °C’de 2 dakika hibridizasyon ve 72 °C’de 1 dakika sentez olmak üzere toplam 35 siklusta gerçekleştirildi. Son siklustan sonra 72 °C’de 5 dakika son zincir uzatma aşaması gerçekleştirildi.

### 2.3.2. *FlaA* Typing

Elektroforez işlemini müteakip *flaA* geni yönünden pozitif olduğu belirlenen PCR ürünleri aşağıdaki gibi restriksiyon işlemine tabi tutuldu.

Restriksiyon karışımı aşağıdaki gibi hazırlandı;

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
10X Restriksiyon Buffer	1,5 µl
Restriksiyon enzimi <i>DdeI</i> (Promega, Madison)	0,2 µl
PCR ürünü	12,5 µl
<u>ddH<sub>2</sub>O</u>	<u>5,8 µl</u>
Toplam	20 µl

Hazırlanan karışım 37°C'de 2 saat inkube edildi. Restriksiyona maruz bırakılan ürünler ethidium bromide eklenmiş % 2'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu. Oluşan profiller UV transilluminatörde analiz edildi ve fotoğraflandı (Vilber lourmat).

### 2.4. İstatistiksel Analiz

Sağlıklı görünüşteki sığır ve koyunlar ile gerek klinik olarak sağlıklı gerekse ishalleri insanlardan izole edilen kampilobakter türlerinin izolasyon oranları arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemliliğini ortaya koymak amacı ile  $\chi^2$  testi kullanıldı.  $P < 0,05$  bulunan olasılık değerleri istatistiksel olarak önemli kabul edildi (4).

**Tablo 6.** *C. jejuni* ve *C. coli* izolatlarının PCR analizinde ve tiplendirilmesinde kullanılan primerler (166, 182)

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

f: Forwad primer; r: Reverse primer

## 2.5. Kültür ve PCR Aşamalarında Kullanılan Ayıraçlar

### 2.5.1. İzolasyonda Kullanılan Besiyerleri ve Ayıraçlar

#### ***Campylobacter* Agar Base (Oxoid, CM0689, Basingstoke, Hampshire, U.K)**

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

*Campylobacter* Agar besi yerinden 18,5 gr tartılarak 475 ml distile su içerisinde eritilip, 121 °C'de 15-20 dk otoklavlandı. Besiyeri 45-50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine 25 ml defibrine at kanı ve 1 vial Preston *Campylobacter* Selective Supplement ilave edilip karıştırıldıktan sonra steril petri kutularına 15-20 ml taksim edildi.

#### **Preston *Campylobacter* Selective Supplement (Oxoid, SR0117, Basingstoke, Hampshire, U.K)**

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

Aseptik şartlarda 1:1 oranında aseton/distile su karışımından 2 ml alınarak Preston *Campylobacter* Selective Supplement içeren vial ilave edildi ve iyice çözüldü. Daha önce hazırlanmış 500 ml *Campylobacter* Agar veya Nutrient Broth'a bir vial ilave edildi.

#### ***Campylobacter* Growth Supplement (Oxoid, SR0084, Basingstoke, Hampshire, U.K)**

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

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

### **Lize Edilmiş At Kanı**

Hazırlanan *Campylobacter* Agar Base ya da Nutrient Broth'a % 7 oranında lize edilmiş at kanı ilave edildi. Çalışmalar boyunca Paşacayı mahallesindeki sağlıklı görünüşteki atlardan alınan kanlar defibrine edilip besiyerlerine ekilmek suretiyle, bakteriyolojik kontrolleri yapıldıktan sonra besiyeri hazırlamada kullanıldı.

### **Nutrient Broth (Oxoid, CM0001, Basingstoke, Hampshire, U.K)**

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

Nutrient Broth besiyerinden 13 g tartılarak 1 L distile su içerisine ilave edildi ve iyice karıştırıldı. 121 °C'de 15-20 dk otoklavlanarak steril tüpler içerisine 6'şar ml dağıtıldı.

### **Blood Agar Base No. 2 (Oxoid, CM0271, Basingstoke, Hampshire, U.K)**

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

Blood Agar Base No: 2 besiyerinden 40 g tartılarak 1 L distile su içerisinde eritildi ve 121 °C'de 15 dk otoklavlandı. Besiyeri 45-50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine % 7 steril defibrine koyun kanı ilave edilip karıştırıldıktan sonra steril petri kutularına 15-20 ml taksim edildi.

***Brucella* Broth (Difco, Detroit, Michigan, U.S.A)**

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

*Brucella* Broth besiyerinden 28 g tartılarak 1 L distile su içinde çözdürüldükten sonra 121 °C'de 15 dk otoklavlandı. Besiyeri 45-50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine % 7 defibrine at kanı ilave edildi. Dikkatli bir şekilde karıştırılıp steril tüplere 8-10 ml taksim edildi.

**2.5.2. Zincirleme Polimeraz Reaksiyonu (PCR) İşleminde Kullanılan Ayıraçlar****2.5.2.1. DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Ayıraçlar****Proteinase K Solüsyonu (100 mg, Sigma, P2308, St. Louis, MO, U.S.A)**

Solüsyon 100 µg/ml olacak şekilde hazırlandı.

**TNES buffer tampon solüsyonu**

20 mM Tris, pH 8,0
150 mM NaCl
10 mM EDTA
% 0,2 SDS

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

**Chloroform: Isoamyl alcohol 24:1**

Chloroform 960 ml/L
Isoamyl alcohol 40 ml/L
pH (20 °C) 7,6-8,0

Bu karışımdan her bir örnek için 600 µl miktarında kullanıldı.



**Natriumacetat krist. (Merck, Darmstadt, Germany)**

DNA'nın presipitasyonu için süspansiyona 1/10 volüm (3M) miktarında ilave edildi.

**Absolute ethanol (Merck, Darmstadt, Germany)**

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

**2.5.2.2. Zincirleme Polimeraz Reaksiyonu (PCR) Analizinde Kullanılan Ayıraçlar****10x PCR Buffer (MBI Fermentas, Germany)**

750 mM Tris-HCl (pH 8,8; 25 °C)

200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

% 0,1 Tween 20

Her PCR numunesi için 5 µl kullanıldı.

**MgCl<sub>2</sub> (MBI Fermentas, Germany)**

MgCl<sub>2</sub> (25 mM), her PCR numunesi için 5 µl miktarında kullanıldı.

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

Her deoksinükleotitten eşit oranda alındı ve steril distile su ile 1/2.5 oranında (10 mM) sulandırıldı. Her PCR numunesi için 1 µl kullanıldı.

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

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

**Primerler (MIAG, Martinsried, Germany)**

Çalışmada kullanılan tüm primerler Metabion International AG (MIAG) firmasından temin edildi. Primerler her PCR numunesi için ortalama 100 pmol/µl olacak şekilde sulandırıldı ve aynen kullanıldı.

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

#### ***DdeI* Restriksiyon Enzimi (10U/µl; Promega; Madison, WI, U.S.A)**

Her PCR ürünü için 0,2 µl enzim kullanıldı.

#### **10x Restriksiyon Buffer (*DdeI*; Promega, Madison, WI, U.S.A)**

60 mM Tris-HCl (pH 7,9)

1,5 M NaCl

60 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM DTT

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

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

### 2.5.2.4. Elektroforez İşleminde Kullanılan Ayıraçlar

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

Tris 54,4 g

Borik Asit 27,2 g

EDTA 4,6 g

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

#### **Agarose LE, (Prona, Spain)**

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

#### **1 kb DNA Ladder Plus ( SM 1331 50µg/100µl; MBI Fermentas, Germany)**

DNA Ladder agaroz jel kuyucuğuna 2 µl yüklendi.

#### **6x Loading Dye Solüsyonu (1 ml; MBI Fermentas, Germany)**

Yükleme boyası 6 µl PCR ürünü için 1 µl kullanıldı.

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

Ethidium bromide solüsyonundan 0,5 ml alınarak distile su ile 15 ml'ye tamamlandı. 50 ml agarozu 4 µl ethidium bromide ilave edildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. *Campylobacter* İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

##### 3.1.1. Sığırlarda *Campylobacter* İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Sağlıklı görünüşteki sığırlardan toplanan 300 örneğin % 22'si (66/300) uygulanan konvansiyonel kültür metotları neticesinde *Campylobacter* spp. yönünden pozitif olarak saptandı. *Campylobacter* spp.'nin safra örneklerinde izolasyon oranı % 26 (39/150) iken, bağırsak içeriği örneklerinde izolasyon oranı ise % 18 (27/150) olarak tespit edildi. Sığır örneklerinden elde edilen *Campylobacter* spp. izolasyon oranları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz bulundu ( $P>0,05$ ) (Tablo 7).

**Tablo 7.** Konvansiyonel kültür yöntemi ile sağlıklı görünüşlü sığırlardan izole edilen *Campylobacter* izolatlarının örnek türüne göre dağılımı ve izolasyon oranları (%).

Örnek Türü	Örnek Sayısı	İzolasyon Sayısı	%
Safra	150	39	26
Bağırsak içeriği	150	27	18
<b>Toplam</b>	<b>300</b>	<b>66</b>	<b>22</b>

##### 3.1.2. Koyunlarda *Campylobacter* İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Konvansiyonel kültür metotları kullanılarak incelenen toplam 350 adet sağlıklı görünüşteki koyun örneğinin % 34'ünden (119/350) *Campylobacter* spp. izolasyonu ve identifikasyonu yapıldı. *Campylobacter* spp.'nin rektal svap örneklerinden izolasyon oranı % 46,5 (93/200) iken safra örneklerinde izolasyon oranı % 17,33 (26/150) saptandı. Koyun örneklerinden elde edilen *Campylobacter* spp. izolasyon oranları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulundu ( $P<0,001$ ) (Tablo 8).

**Tablo 8.** Konvansiyonel kültür yöntemi ile sağlıklı görünümlü koyunlardan izole edilen *Campylobacter* izolatlarının örnek türüne göre dağılımı ve izolasyon oranları (%).

Örnek Türü	Örnek Sayısı	İzolasyon Sayısı	%
Safra	150	26	17.33
Rektal svap	200	93	46.5
<b>Toplam</b>	<b>350</b>	<b>119</b>	<b>34</b>

### 3.1.3. İnsanlarda *Campylobacter* İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Konvansiyonel kültür metotları kullanılarak incelenen toplam 120 adet dışkı örneğinin, Kars Devlet Hastanesindeki tamamı ishaller hastalardan alınan 86 dışkı örneğinden *Campylobacter* spp. izole edilemezken, Kars yöresindeki kasap, kombina ve mezbahanedeki ishal olgusu olmayan insanlardan alınan 34 dışkı örneğinden 3 tanesinde (% 8,82) *Campylobacter* spp. izole edilmiş olup, insanlardan alınan tüm dışkı örnekleri dikkate alındığında, alınan dışkı örneklerinin % 2,5'inden (3/120) *Campylobacter* spp. izolasyonu ve identifikasyonu yapıldı. (Tablo 9).

**Tablo 9.** Konvansiyonel kültür yöntemi ile ishaller ve sağlıklı görünümlü insanlardan izole edilen *Campylobacter* izolatlarının örnek türüne göre dağılımı ve izolasyon oranı (%).

Örnek Kaynağı	Örnek Sayısı	İzolasyon Sayısı	%
Kars Devlet Hastanesi (Tamamı ishaller hasta)	86	0	0
Kasap-Kombina-Mezbahane çalışanları (İshal olgusu yok)	34	3	8,82
<b>Toplam</b>	<b>120</b>	<b>3</b>	<b>2,5</b>

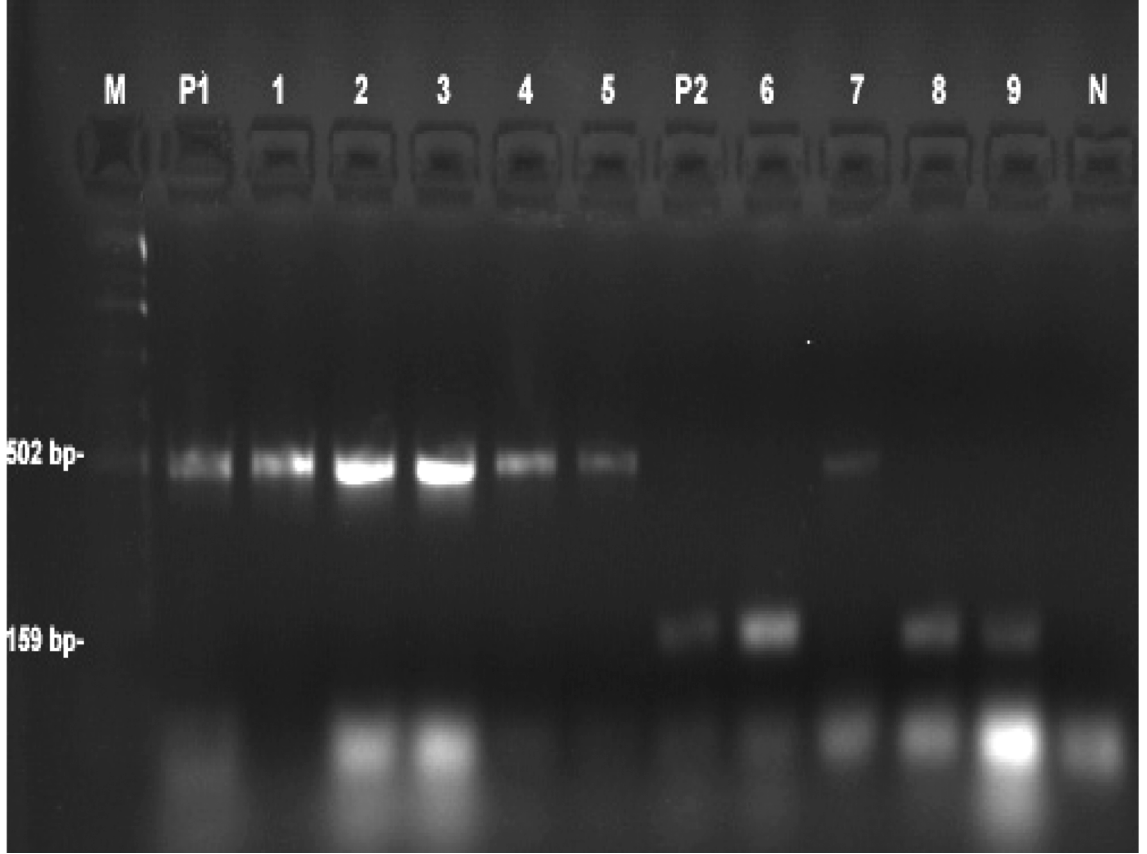
### 3.2. Multipleks Zincirleme Polimeraz Reaksiyonu (mPCR) ile *C. jejuni* ve *C. coli* İdentifikasyon Bulguları

#### 3.2.1. Sığırlarda mPCR ile *C. jejuni* ve *C. coli*'nin İdentifikasyon Bulguları

Sığırlarda *Campylobacter* spp. olarak identifiye edilen izolatlardan elde edilen DNA'ların *C. jejuni* ve *C. coli* türlerinin mPCR amplifikasyonuna tabi tutulmaları neticesinde % 45,45'inde (30/66) *C. jejuni*'ye spesifik 159 bp uzunluğunda bantlar ve %28,79'unda (19/66) *C. coli*'ye spesifik 502 bp uzunluğunda bantlar elde edildi (Tablo 8) (Şekil 4). Örneklerin tamamı dikkate alındığında *C. jejuni* ve *C. coli* izolasyon ve identifikasyon oranları sırasıyla % 10 (30/300) ve % 6,3 (19/300) olarak hesaplandı ( $P>0,05$ ). *C. jejuni*'nin en yüksek identifikasyon oranı % 48,15 (13/27) ile bağırsak içeriği örneklerinden elde edildi ve bunu % 43,58 (17/39) ile safra örnekleri takip etti. *C. coli* ise % 37,04 (10/27) ile en yüksek oranda bağırsak içeriği örneklerinden elde edildi ve bunu %23,08 (9/39) ile safra içeriği örnekleri takip etti. Sığırların bağırsak içeriği ve safra örneklerinden elde edilen *C. jejuni* ve *C. coli* izolasyon oranları arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu ( $P>0,05$ ), (Tablo 10).

**Tablo 10.** Sağlıklı görünüşlü sığırlardan elde edilen kampilobakter izolatlarının mPCR bulguları.

Örnek	Kültür Pozitif Örnek Sayısı	mPCR pozitif örnek sayısı (%)		
		<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter</i> spp.
Safra	39	17 (43,58)	9 (23,08)	13 (33,33)
Bağırsak içeriği	27	13 (48,15)	10 (37,04)	4 (14,81)
<b>Toplam</b>	<b>66</b>	<b>30 (45,45)</b>	<b>19 (28,79)</b>	<b>17 (25,75)</b>



**Şekil 4.** Sığırlarda *Campylobacter* spp. olarak identifiye edilen kültürlerden elde edilen DNA'ların *C. jejuni* ve *C. coli* tür spesifik primerler kullanılarak yapılan mPCR analizi sonucu oluşan ürünlerin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jeldeki görünümü.

M: DNA Ladder Plus (1 Kb), N: Negatif kontrol, P1: *C. coli* pozitif kontrol, 1-5,7: *C. coli* pozitif örnekler, P2: *C. jejuni* pozitif kontrol, 6,8,9: *C. jejuni* pozitif örnekler.

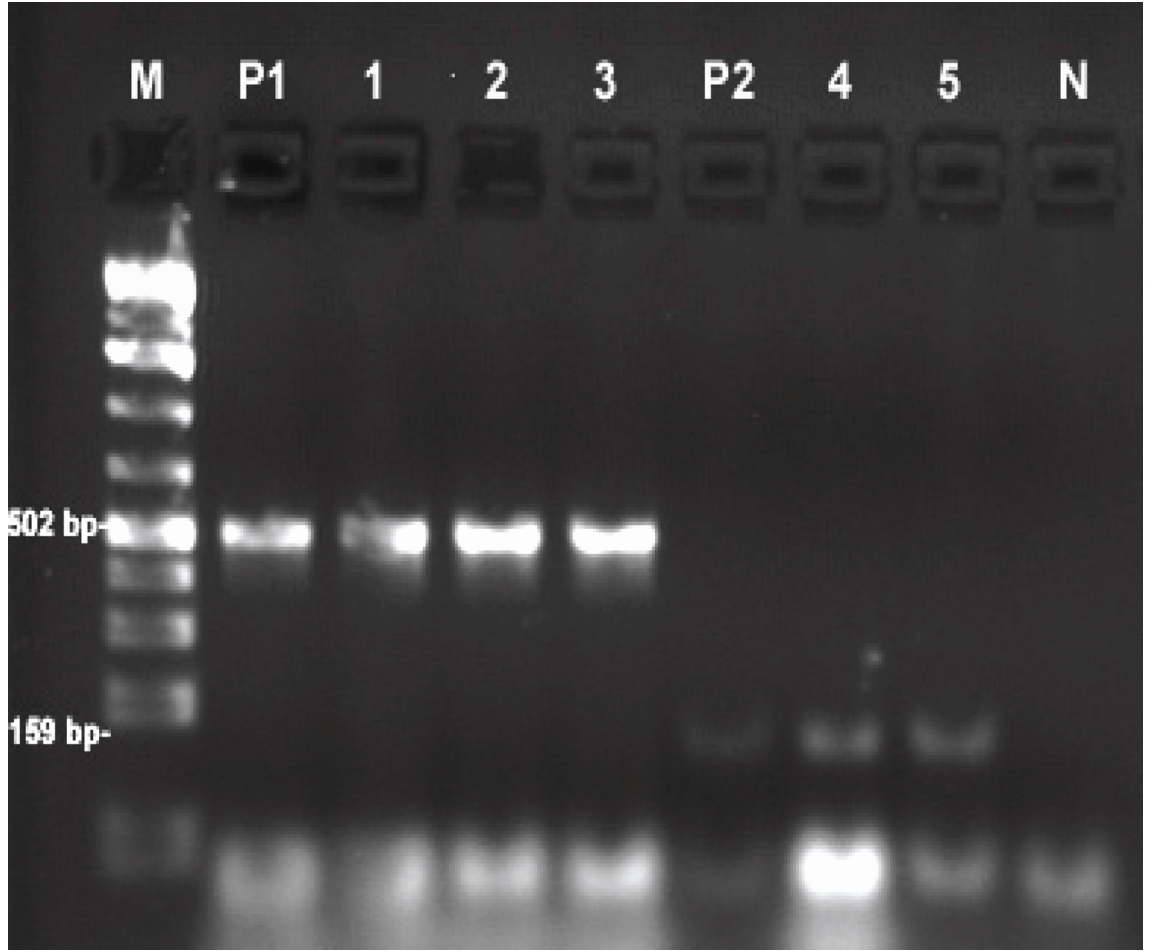
### 3.2.2. Koyunlarda mPCR ile *C. jejuni* ve *C. coli*'nin İdentifikasyon Bulguları

Koyunlarda *Campylobacter* spp. olarak tanımlanan izolatlardan elde edilen DNA'ların *C. jejuni* ve *C. coli* türlerinin mPCR amplifikasyonuna tabi tutulmaları neticesinde % 31,93'ünde (38/119) *C. jejuni*'ye spesifik 159 bp uzunluğunda bantlar ve % 42,86'sında (51/119) *C. coli*'ye spesifik 502 bp uzunluğunda bantlar elde edildi (Tablo 11) (Şekil 5). Örneklerin tamamı dikkate alındığında *C. jejuni* ve *C. coli* izolasyon ve tanımlama oranları sırasıyla % 10,86 (38/350) ve % 14,57 (51/350) olarak hesaplandı. *C. jejuni*'nin en yüksek tanımlama oranı % 61,54 (16/26) ile safra sıvısından elde edilirken ve bunu % 23,66 (22/93) ile rektal svap örnekleri takip etti. *C. coli* ise % 52,69 (49/93) ile en yüksek oranda rektal svap örneklerinden tanımlanırken bunu % 7,69 (2/26) oranla safra sıvısı örnekleri takip etti. *C. jejuni* safra örneklerinde önemli oranda yüksek bulunurken, *C. coli* rektal svap örneklerinde daha yüksek oranda izole edildi ( $P<0,001$ ). Safra sıvısı örneklerinden elde edilen *C. jejuni* ve *C. coli*'lerin izolasyon oranları arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulundu ( $P<0,001$ ) (Tablo 11).

**Tablo 11.** Sağlıklı görünüşlü koyunlardan elde edilen *Campylobacter* izolatlarının mPCR bulguları.

Örnek	Kültür Pozitif Örnek Sayısı	mPCR pozitif örnek sayısı (%)		
		<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter</i> spp.
Safra	26	16 (61,54)	2 (7,69)	8 (30,77)
Rektal svap	93	22 (23,66)	49 (52,69)	22 (23,66)
<b>Toplam</b>	<b>119</b>	<b>38 (31,93)</b>	<b>51 (42,86)</b>	30 (25,21)





**Şekil 5.** Koyunlarda *Campylobacter* spp. olarak tanımlanan kültürlerden elde edilen DNA'ların *C. jejuni* ve *C. coli* tür spesifik primerler kullanılarak yapılan mPCR analizi sonucu oluşan ürünlerin etidium bromide ile boyanmış agaroz jeldeki görünümü.

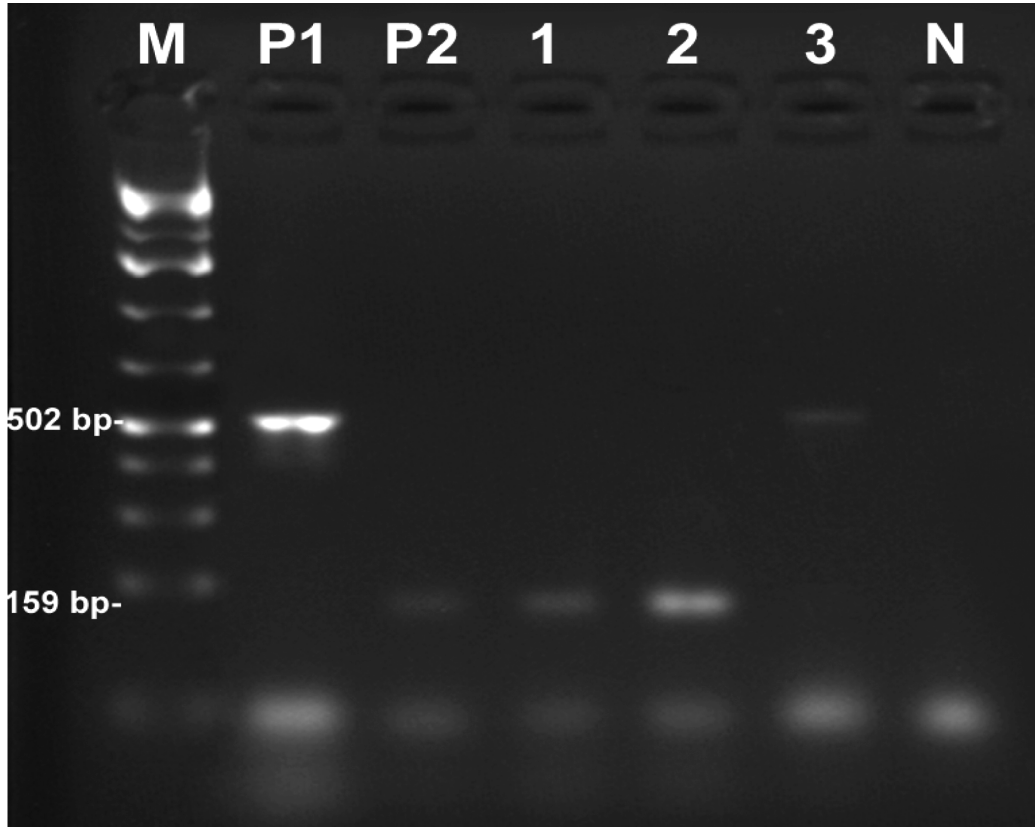
M: DNA Ladder Plus (1 Kb), N: negatif kontrol, P1: *C. coli* pozitif kontrol, 1-3: *C. coli* pozitif örnekler, P2: *C. jejuni* pozitif kontrol, 4,5: *C. jejuni* pozitif örnekler.

### 3.2.3. İnsanlarda mPCR ile *C. jejuni* ve *C. coli*'nin İdentifikasyon Bulguları

İnsanlarda *Campylobacter* spp. olarak tanımlanan izolatlardan elde edilen DNA'ların *C. jejuni* ve *C. coli* türlerinin mPCR amplifikasyonuna tabi tutulmaları sonucunda % 1,67'sinde (2/120) *C. jejuni*'ye spesifik 159 bp uzunluğunda bantlar ve % 0,83'ünde (1/120) *C. coli*'ye spesifik 502 bp uzunluğunda bantlar elde edildi (Tablo 12) (Şekil 6).

**Tablo 12.** Sağlıklı görünüşlü insanlardan elde edilen kampilobakter izolatlarının mPCR bulguları.

Örnek	Kültür Pozitif Örnek Sayısı	mPCR pozitif örnek sayısı (%)		
		<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter spp.</i>
Dışkı	3	2 (66,66)	1 (33,33)	0



**Şekil 6.** İnsanlarda *Campylobacter spp.* olarak tanımlanan kültürlerden elde edilen DNA'ların *C. jejuni* ve *C. coli* tür spesifik primerler kullanılarak yapılan mPCR analizi sonucu oluşan ürünlerin etidium bromide ile boyanmış agaroz jeldeki görünümü.

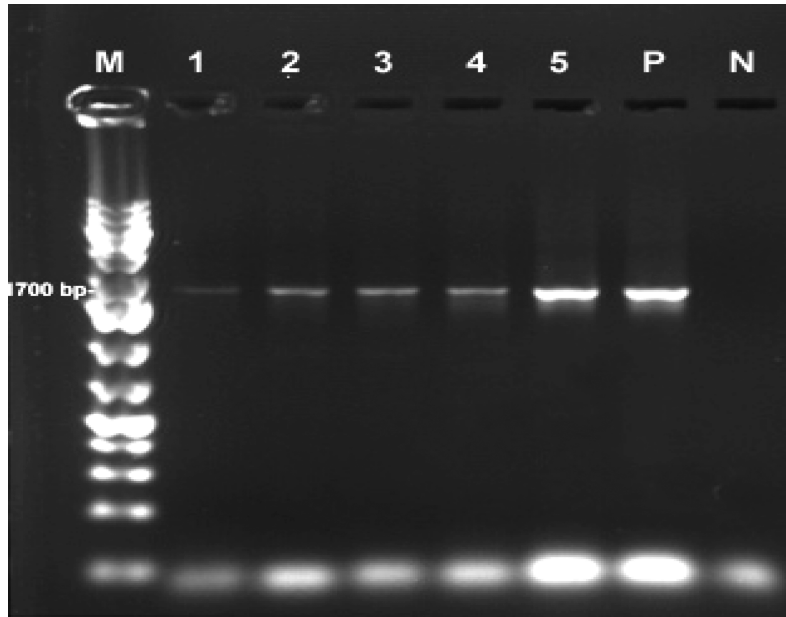
M: DNA Ladder Plus (1 Kb), N: negatif kontrol, P1: *C. coli* pozitif kontrol, 3: *C. coli* pozitif örnek, P2: *C. jejuni* pozitif kontrol, 1, 2: *C. jejuni* pozitif örnekler.

### 3.3. Flagellin A (*FlaA*) Tiplendirme Bulguları

#### 3.3.1. Sığırlarda *FlaA* Tiplendirme Bulguları

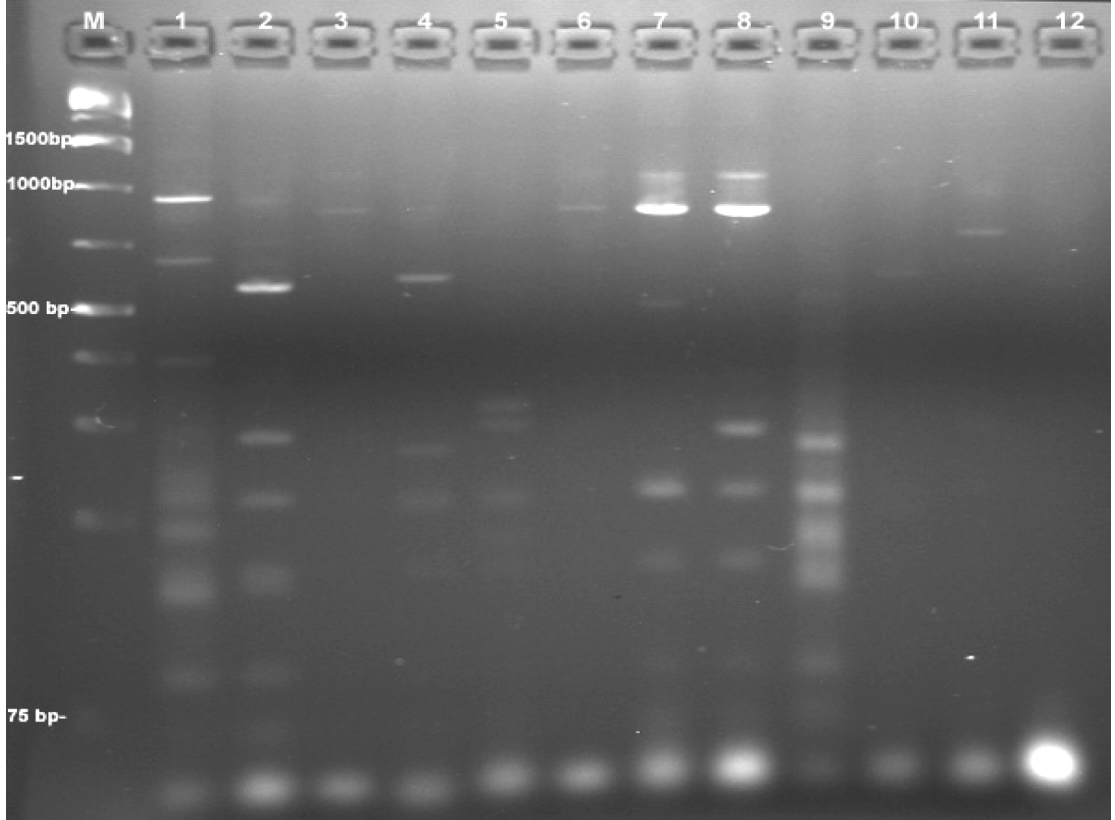
##### 3.3.1.1. Sığırlardan İzole Edilen *C. jejuni* İzolatlarının *FlaA* Tiplendirme Bulguları

Tür spesifik PCR ile *C. jejuni* olarak identifiye edilen 17 safra sıvısı ve 13 bağırsak içeriğinden elde edilen toplam 30 izolatu *flaA* genine spesifik primerler ile PCR amplifikasyonuna tabi tutulması neticesinde tüm izolatlar 1700 bp uzunluğunda bantlar oluşturdu (Şekil 7). *FlaA* geni yönünden pozitif PCR ürünlerinin *DdeI* restriksiyon enzimi ile yapılan RFLP analizi neticesinde toplam 13 farklı profil elde edildi. Safra sıvısı örneklerinden elde edilen *C. jejuni* izolatlarından 9 farklı profil belirlendi. Barsak içeriği örneklerinden elde edilen *C. jejuni* izolatlarından ise dört farklı profil saptandı (Şekil 8) (Tablo 13). Bağırsak içeriği örneklerinden izole edilen *C. jejuni* izolatlarından elde edilen bir profil (IV) safra sıvısı örneklerinden izole edilen *C. jejuni* izolatlarından elde edilen bir profil (V) ile benzerlik gösterdi. Bağırsak içeriği örneklerinden izole edilen *C. jejuni* izolatlarından elde edilen bir profil (VII) aynı zamanda koyun safra sıvısı örneklerinden izole edilen *C. jejuni* izolatlarından elde edilen bir profil (V) ile benzerlik gösterdi.



**Şekil 7.** *Campylobacter jejuni* ve *C. coli* türlerinin *flaA* genine spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR analizi sonucu oluşan ürünlerin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jeldeki görünümü.

M: DNA Ladder Plus (1 Kb) N: Negatif Kontrol, P: Pozitif Kontrol, 1-5: *FlaA* geni pozitif örnekler.



**Şekil 8.** Sığırların safra (1-4) ve barsak içeriği (5-14) örneklerinden elde edilen *C. jejuni* izolatlarındaki *flaA* geninin *DdeI* ile muamele edilmiş PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jeldeki görünümü.

M: DNA Ladder Plus (1 Kb), 1-14: *FlaA* geninin farklı restriksiyon profilleri. Kuyucuk no (Profil no); 1 (I), 2 (II), 3 (III), 4 (IV), 5 (IV), 6 (V), 7 (VI), 8 (VII), 9 (VIII), 10 (IX), 11 (X), 12 (XI), 13 (XII), 14 (XIII).

**Tablo 13.** Sığırlardan elde edilen *C. jejuni* izolatlarının *flaA* tiplendirme bulguları (n: 30)

Profil No	İzolot sayısı (%)	Kaynak
I	7 (41,2)	Safra
II	5 (29,4)	Safra
III	2 (11,8)	Safra
IV	3 (17,6)	Safra
	1(7,7)	Bağırsak içeriği
V	1(7,7)	Bağırsak içeriği
VI	3 (23,1)	Bağırsak içeriği
VII-VIII	2 (15,5)	Bağırsak içeriği
IX	3 (23,1)	Bağırsak içeriği
X-XII*	3 (7,7)	Bağırsak içeriği

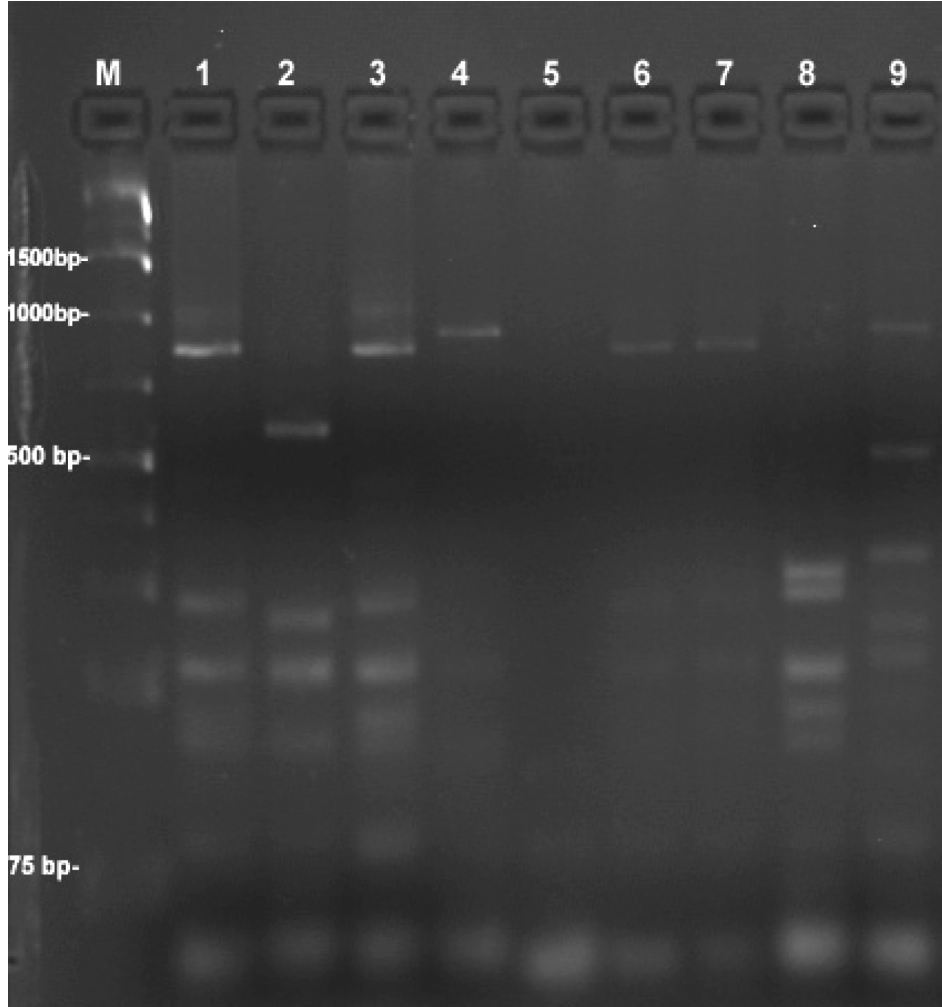
\* Profillerin her biri sadece bir izolatta gözlendi.

### 3.3.1.2. Sığırlardan İzole Edilen *C. coli* İzolatlarının *FlaA* Tiplendirme Bulguları

Tür spesifik PCR ile *C. coli* olarak tanımlanmış 10 bağırsak içeriği ve 9 safra sıvısından elde edilen toplam 19 *C. coli* izolatının *flaA* genine spesifik primerler ile PCR amplifikasyonuna tabi tutulması neticesinde tüm izolatlar 1700 bp uzunluğunda bantlar oluşturdu (Şekil 7). *FlaA* geni yönünden pozitif PCR ürünlerinin *DdeI* restriksiyon enzimi ile yapılan RFLP analizi neticesinde toplam 6 farklı restriksiyon

profili gözlemlendi. Bu profillerin dördü barsak içeriğinden, ikisi safradan elde edildi (Şekil 9). Safrada gözlenen profil (I);

- bağırsak içeriğinde gözlenen profillerden birisi ile,
- koyun rektal svap örneklerinde gözlenen profillerden biri ile (III),
- koyun safra örneklerinde gözlenen bir profil ile (XV), benzerlik gösterdi (Şekil 9).



**Şekil 9.** Sığırların safra (1,2) ve bağırsak içeriği (3-9) örneklerinden elde edilen *C. coli* izolatlarındaki *flaA* geninin *DdeI* ile muamele edilmiş PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jeldeki görünümü.

M: DNA Ladder Plus (1 Kb). Kuyucuk no (Profil no); 1 (I), 2 (II), 3 (I), 4 (III), 5 (IV), 6-7 (I), 8 (V), 9 (VI).

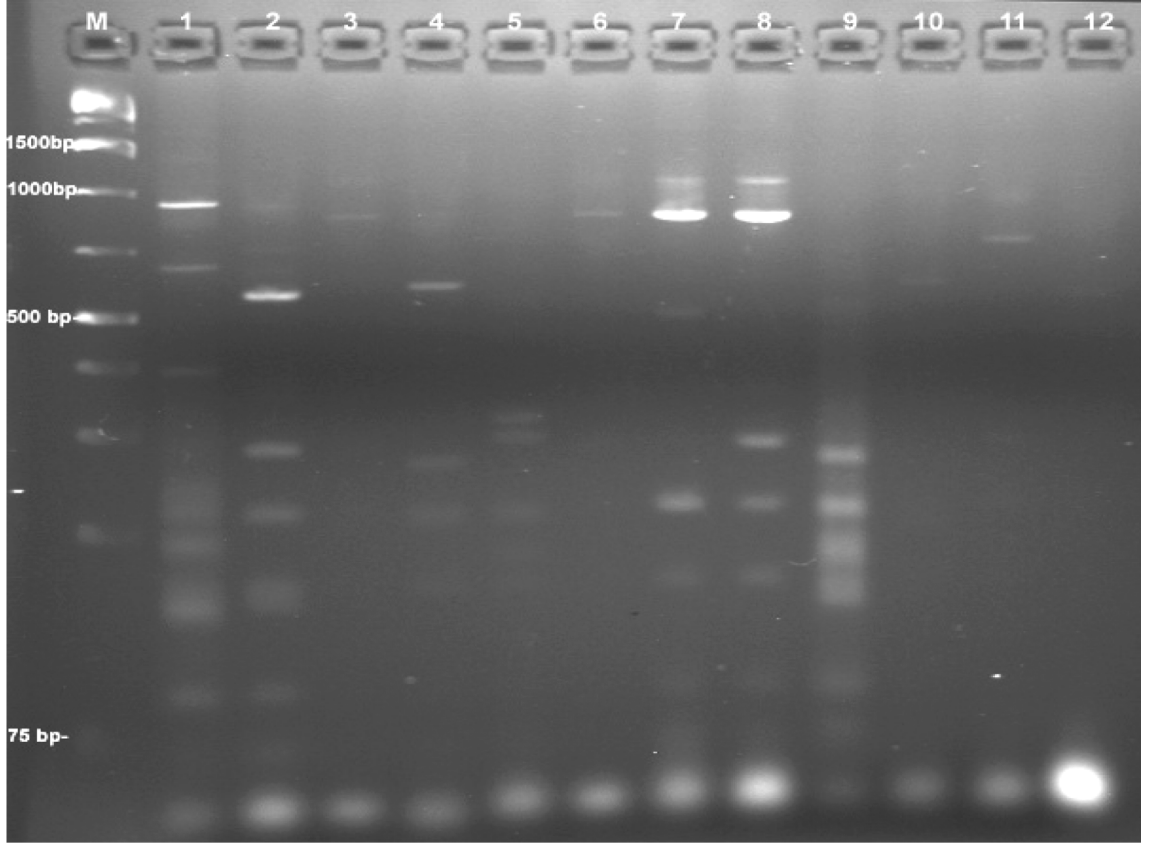
**Tablo 14.** Sığırlardan elde edilen *C. coli* izolatlarının *flaA* tiplendirme bulguları (n:19)

Profil No	İzolat sayısı (%)	Kaynak
I	1 (11,1)	Safra
	3 (30)	Bağırsak içeriği
II	8 (88,8)	Safra
III	1(10)	Bağırsak içeriği
IV	3 (30)	Bağırsak içeriği
V	1 (10)	Bağırsak içeriği
VI	2 (20)	Bağırsak içeriği

### 3.3.2. Koyunlarda *FlaA* Tiplendirme Bulguları

#### 3.3.2.1. Koyunlardan İzole Edilen *C. jejuni* İzolatlarının *FlaA* Tiplendirme Bulguları

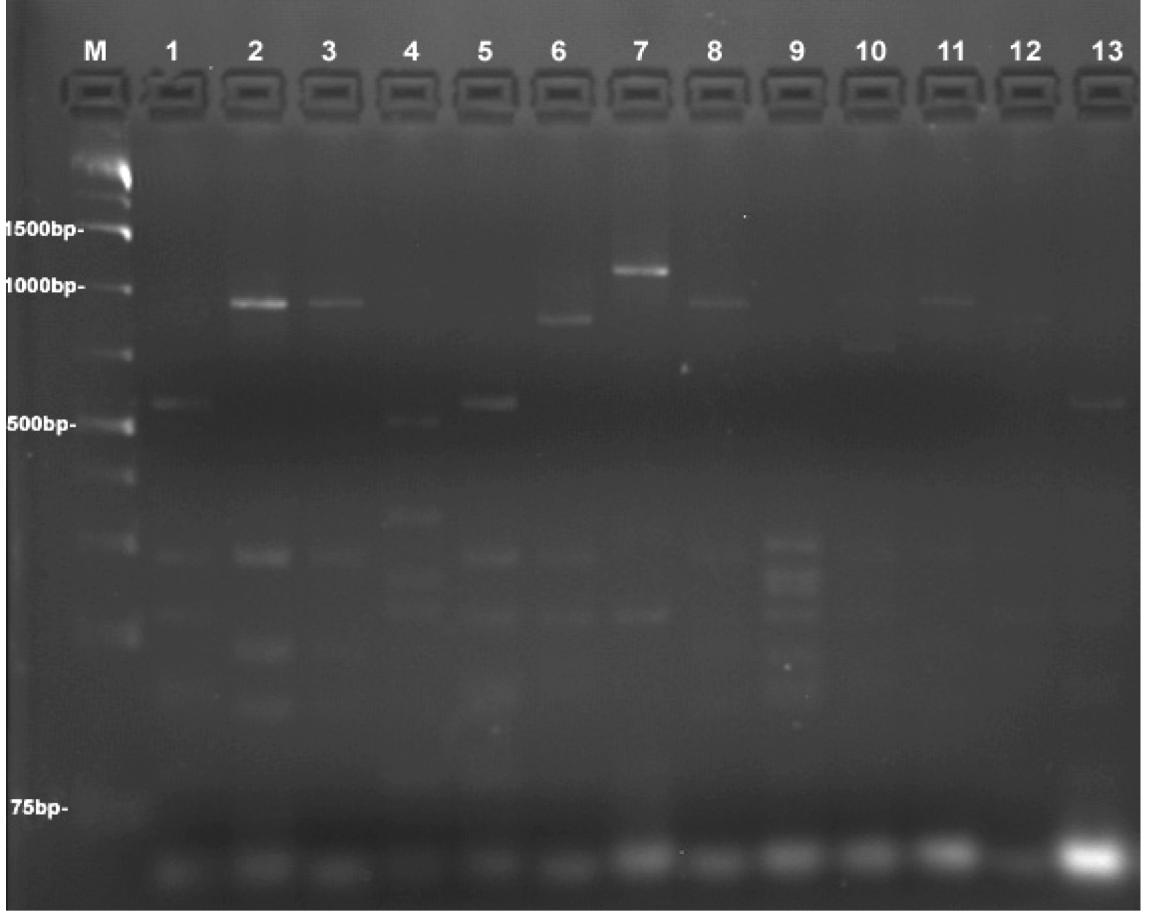
Tür spesifik PCR ile *C. jejuni* olarak tanımlanmış 16 safra sıvısı ve 22 rektal svap örneğinden elde edilen toplam 38 *C. jejuni* izolatının *flaA* genine spesifik primerler ile PCR amplifikasyonu tabii tutulması neticesinde tüm izolatlar 1700 bp uzunluğunda bantlar oluşturdu (Şekil 7). *FlaA* geni yönünden pozitif PCR ürünlerinin *DdeI* restriksiyon enzimi ile yapılan RFLP analizi neticesinde toplam 24 farklı restriksiyon profili elde edildi. Safra sıvısı örneklerinden elde edilen *C. jejuni* izolatlarından 11 farklı profil belirlendi (Şekil 10). Rektal svap örneklerinden elde edilen *C. jejuni* izolatlarından 13 farklı profil belirlendi (Şekil 11) (Tablo 15). Rektal svap izolatlarından elde edilen bir profil (XXIII), safra sıvısında gözlenen bir profil ile (X) benzerlik gösterdi. Ayrıca koyunlardan alınan safralardan elde edilen profillerden biri (VII), insan dışkılarından elde edilen izolatlardan birine (II), diğer biri (VIII) ise yine insan dışkılarından elde edilen diğer bir izolata (III) benzerlik gösterdi.



**Şekil 10.** Koyunların safra örneklerinden elde edilen *C. jejuni* izolatlarındaki *flaA* geninin *DdeI* ile muamele edilmiş PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jeldeki görünümü.

M: DNA Ladder Plus (1 Kp), 1-12: *FlaA* geninin farklı restriksiyon profilleri. Kuyucuk no (Profil no); 1 (I), 2 (II), 3 (III), 4 (IV), 5 (V), 6 (III), 7 (VII), 8, (VIII), 9 (IX), 10 (X), 11 (XI), 12 (X).





**Şekil 11.** Koyunların rektal svap örneklerinden elde edilen *C. jejuni* izolatlarındaki *flaA* geninin *DdeI* ile muamele edilmiş PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jeldeki görünümü.

M: DNA Ladder Plus (1 Kp), 1-13: *FlaA* geninin farklı restriksiyon profilleri. Kuyucuk no (Profil no); 1 (XII), 2 (XIII), 3 (XIII), 4 (XIV), 5 (XV), 6 (XVI), 7 (XVII), 8 (XVIII), 9 (XIX), 10 (XX), 11 (XXI), 12 (XXII), 13 (XXIII).

**Tablo 15.** Koyunlardan elde edilen *C. jejuni* izolatlarının *flaA* tiplendirme bulguları (n:38)

Profil No	İzolat sayısı (%)	Kaynak
I -II	2 (12,5)	Safra
III **	2 (12,5)	Safra
IV	1 (6,3)	Safra
V ***	3 (18,8)	Safra
VI	1 (6,3)	Safra
VII-VIII**	4 (25,0)	Safra
IX-XI	3 (18,8)	Safra
XII	1 (4,5)	Rektal svap
XIII-XIV***	6 (27,3)	Rektal svap
XV-XVII	3 (13,6)	Rektal svap
XVIII**	2 (9,1)	Rektal svap
XIX	1 (4,5)	Rektal svap
XX-XXII**	6 (27,3)	Rektal svap
XXIII	1 (4,5)	Rektal svap
XXIV**	2 (9,1)	Rektal svap

\* Profillerin her biri sadece bir izolatta gözlemlendi.

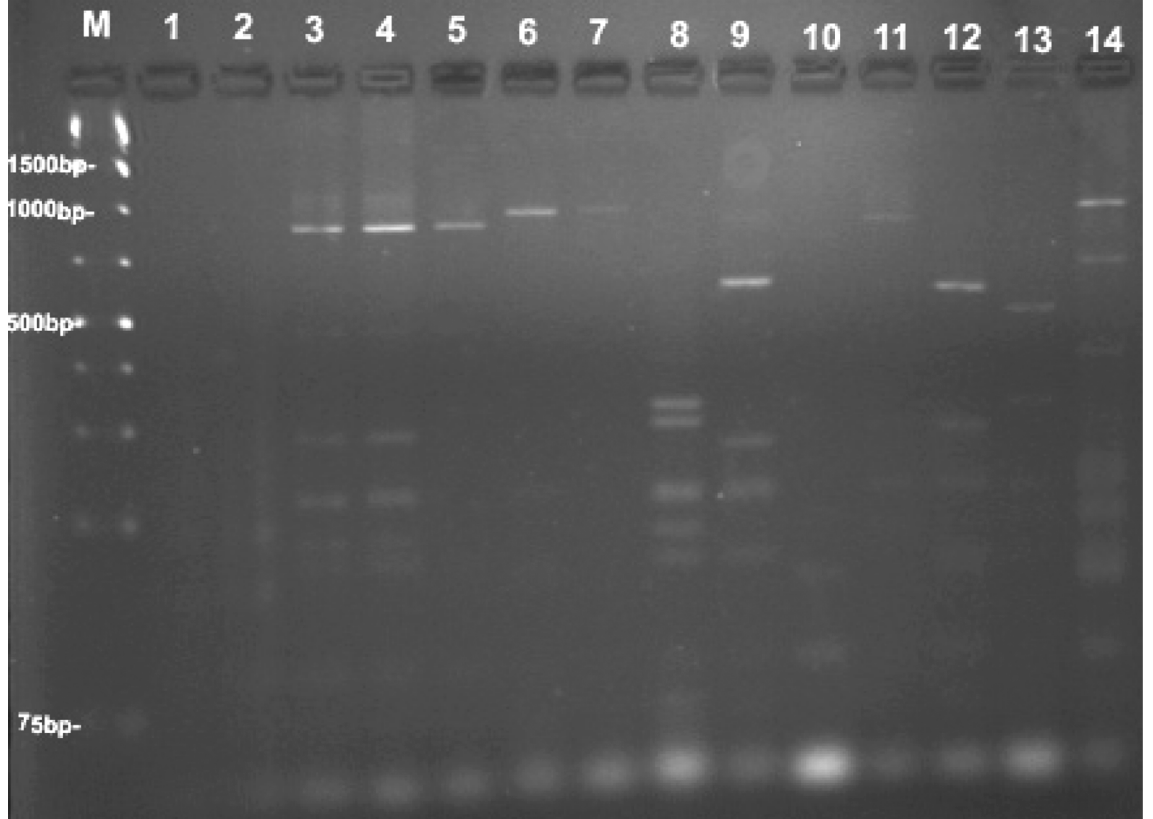
\*\* Profillerin her biri ikişer izolatta gözlemlendi.

\*\*\* Profillerin her biri üçer izolatta gözlemlendi.

### 3.3.2.2. Koyunlardan İzole Edilen *C. coli* İzolatlarının *FlaA* Tiplendirme Bulguları

Tür spesifik PCR ile *C. coli* olarak tanımlanan 49 rektal svap ve 2 safradan elde edilen toplam 51 izolatin *flaA* genine spesifik primerler ile PCR amplifikasyonuna tabi tutulması neticesinde tüm izolatlar 1700 bp uzunluğunda bantlar oluşturdu (Şekil 7).

*FlaA* geni yönünden pozitif PCR ürünlerinin *DdeI* restriksiyon enzimi ile yapılan RFLP analizi neticesinde toplam 16 farklı restriksiyon profili elde edildi. Rektal svap örneklerinden elde edilen *C. coli* izolatlarından 14 farklı profil (Şekil 12). Safra sıvısı örneklerinden elde edilen *C. coli* izolatlarından da 2 profil saptandı (Tablo 16).



**Şekil 12.** Koyunların rektal svap örneklerinden elde edilen *C. coli* izolatlarındaki *flaA* geninin *DdeI* ile muamele edilmiş PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jeldeki görünümü.

M: DNA Ladder Plus (1 Kp), 1-14: *C. coli flaA* geninin farklı restriksiyon profilleri. Kuyucuk no (Profil no); 1 (I), 2 (II), 3 (III), 4 (XV), 5 (IV), 6 (V), 7 (VI), 8 (VII), 9 (VIII), 10 (IX), 11 (X), 12 (XI), 13 (XII), 14 (XIII).

**Tablo 16.** Koyunlardan elde edilen *C. coli* izolatlarının *flaA* tiplendirme bulguları  
(n: 51)

<b>Profil No</b>	<b>İzolat sayısı (%)</b>	<b>Kaynak</b>
I	2 (4,1)	Rektal svap
II	5 (10,2)	Rektal svap
III	3 (6,1)	Rektal svap
	1 (50)	Safra
IV	7 (14,3)	Rektal svap
V-VII**	6 (12,3)	Rektal svap
VIII	5 (10,2)	Rektal svap
IX***	3 (6,1)	Rektal svap
X	8 (16,3)	Rektal svap
XI- XIII*	3 (6,1)	Rektal svap
XIV	7 (14,3)	Rektal svap
XVI	1 (50)	Safra

\* Profillerin her biri sadece bir izolatta gözlemlendi.

\*\* Profillerin her biri ikişer izolatta gözlemlendi.

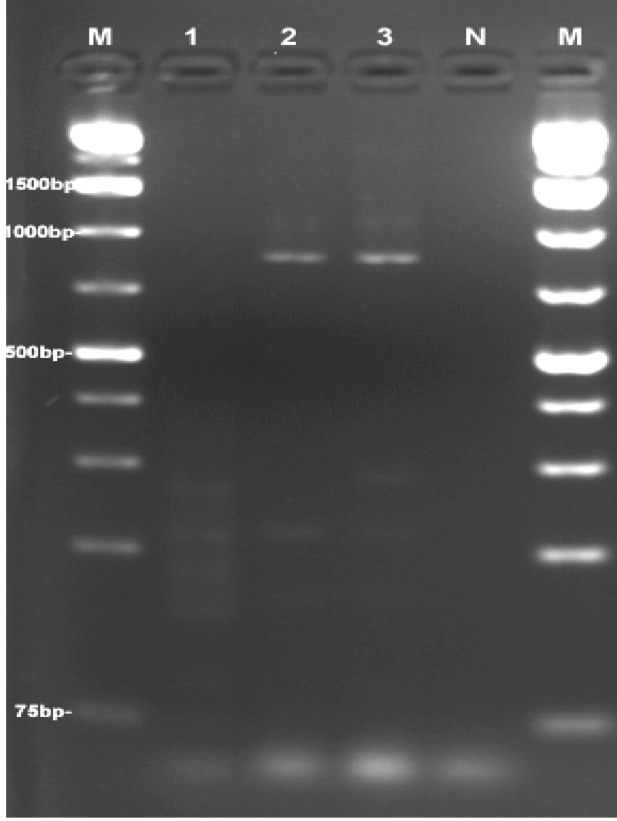
\*\*\* Profillerin her biri üçer izolatta gözlemlendi.

### 3.3.2.3. İnsanlardan İzole Edilen *C. jejuni* ve *C. coli* izolatlarının *FlaA* Tiplendirme Bulguları

Tür spesifik PCR ile dışkıdan *C. jejuni* (2) ve *C. coli* (1) olarak tanımlanmış toplam 3 izolatın *flaA* genine spesifik primerler ile PCR amplifikasyonuna tabi tutulması neticesinde tüm izolatlar 1700 bp uzunluğunda bantlar oluşturdu. *FlaA* geni yönünden pozitif PCR ürünlerinin *DdeI* restriksiyon enzimi ile yapılan RFLP analizi neticesinde toplam 3 farklı restriksiyon profili elde edildi. Dışkı örneklerinden elde edilen *C. jejuni* izolatlarından 2 farklı profil, *C. coli* izolatlarından da bir profil saptandı (Şekil 13) (Tablo 17). İnsan dışkısı örneklerinden elde edilen *C. jejuni* izolatlarına ait 2 profil ( II. ve III.), koyun safra örneklerinden elde edilen 2 profile benzerlik gösterdi (VII. ve VIII.).

**Tablo 17.** İnsanlardan elde edilen *C. jejuni* ve *C. coli* izolatlarının *flaA* tiplendirme bulguları (n:19)

Profil No	İzolat sayısı (%)	Kaynak
I	1 (33,3)	Dışkı
II	1 (33,3)	Dışkı
III	1 (33,3)	Dışkı



**Şekil 13.** İnsanların dışkı örneklerinden elde edilen *C. jejuni* ve *C. coli* izolatlarındaki *flaA* geninin *DdeI* ile muamele edilmiş PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jeldeki görünümü.

M: DNA Ladder Plus (1 Kp), 1-3: *C. jejuni* (2,3) ve *C. coli* (1) *flaA* geninin farklı restriksiyon profilleri. Kuyucuk no (Profil no); 1 (I), 2 (II), 3 (III)

#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kampilobakter türleri tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de hayvan ve insan sağlığı için ciddi bir sorun oluşturmakla birlikte iş gücü ve ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Kampilobakter infeksiyonları, konağın duyarlılığı, infeksiyona sebep olan mikroorganizmanın türü, sayısı ile virulans faktörlerine bağlı olarak kendi kendini sonlandıran, düşük mortalite oranına sahip, sekretuar tip ishalden, kanlı mukuslu dışkı çıkarımı ile karakterize dizanterik formda ishal oluşumuna kadar değişen klinik spektruma sahip tarzda seyretmekte, özellikle *C. fetus* subsp. *fetus* sığırlarda sporadik abortuslara neden olurken, koyunlarda epizootik abortuslara neden olabilmektedir. İnsanlarda ise Guillain-Barre sendromu, hemolitik üremik sendrom ve reaktif artrit gibi ciddi komplikasyonlara yol açabilmektedir (7, 62). Bu infeksiyonların epidemiyolojisinin kapsamlı bir biçimde ortaya konulması ve yaygın suşların ivedilikle tespit edilerek bunlara karşı eradikasyon planlarının kısa sürede hazırlanıp etkin koruyucu önlemler alınması, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki bu nedenle oluşan iş gücü ve ekonomik kayıpların azaltılmasına yardımcı olacaktır.

Bu çalışmada, insanlarda akut bakteriyel gastroenteritisin en yaygın etkenleri olarak bilinen *C. jejuni* ve *C. coli*'nin, klinik olarak sağlıklı sığır ve koyunların rektal svap, bağırsak içeriği ve safra örnekleri ile, gerek klinik olarak sağlıklı gerekse ishalleri insanların dışkı örneklerinden izolasyonu, mPCR ile identifikasyonu ve moleküler tiplendirilmesi amaçlandı. Bunun için öncelikle konvansiyonel kültür metotları kullanılarak alınan örneklerden *Campylobacter* spp.'lerin izolasyonu ve identifikasyonu gerçekleştirildi. Çalışmada materyal olarak Temmuz-Eylül 2009 tarihleri arasında Kars ilindeki bir mezbahada ve kombinada kesilen klinik olarak sağlıklı görünen toplam 300 sığırdan 150 safra sıvısı ve 150 bağırsak içeriği örneği toplandı ve sırasıyla % 26 ve % 18' inde *Campylobacter* spp. izole edildi. Dünyada ve ülkemizde sığırlarda yapılan çalışmalar sonunda *Campylobacter* spp. izolasyon oranının % 1 ile % 90 arasında değişiklik gösterdiği görülmektedir (4, 60, 178, 229, 251). Bu farklılığa neden olan faktörlerin başında numunelerin laboratuara taşınma koşulları, yaş, mevsim, incelenen hayvan sayısı, izolasyon metodu, kullanılan selektif besiyerlerinin niteliği, hijyen ve coğrafi yapının önemli rol oynayabileceğini ileri sürülmektedir (196). Araştırmacılar dışkı, bağırsak içeriği ve çevresel örneklerden *Campylobacter* spp. izolasyon oranını artırmak ve kontaminasyon olasılığını minimuma indirmek amacı ile selektif ilavelerle

zenginleştirme metoduna sıklıkla başvurmuşlardır (18, 37, 177). Garcia ve ark. sığırların bağırsak içeriği örneklerini materyal olarak kullandıkları bir çalışmada, direkt ekim yöntemi ile *Campylobacter* spp. izole edemezlerken, zenginleştirme metodu ile % 52 oranında izolasyon yaptıklarını rapor etmişlerdir (88). Aynı şekilde Atabay ve ark. değişik besiyerlerine direkt yaptıkları ekimlerde % 1-2.5 oranlarında izolasyon yaparken, zenginleştirme metodu ile yaptıkları ekimlerde % 51-55 oranlarında izolasyon yaptıklarını rapor etmişlerdir (18). Sığır safra örneklerinden direkt ekim ile Elazığ'da Muz ve ark. % 47 (178), Açık % 35 oranında (4), Aydın ve ark. Kayseri'de % 31,16 (19), bu çalışmada ise % 26 oranında *Campylobacter* spp. izole edilmiş olup safra örneklerinden elde edilen izolasyon oranı diğer çalışmalarla paralellik göstermiştir (4, 19, 178). Mevcut çalışmada safra içeriği örneklerinden *Campylobacter* spp. izolasyonu amacıyla direkt inokülasyon tekniği kullanılmış olup, bağırsak içeriği örneklerine ise zenginleştirme metodu uygulanmıştır. Bağırsak içeriğinden *Campylobacter* spp. izolasyonu amacıyla zenginleştirme metodu uygulanarak % 18 oranında izolasyon yapılmış olup bu oran; Açık ve Çetinkaya (3) Elazığ'da dışkı örneklerinden elde ettikleri % 44'lük *Campylobacter* spp. izolasyon oranından, yine Açık ve Çetinkaya (2) Elazığ'da sığır bağırsak içeriği ve dışkı örneklerinden elde ettikleri % 34,1'lik *C. jejuni* izolasyon oranından ve Arıkoğlu ve Aydın (13) Kars yöresinden elde ettikleri % 62'lik *C. jejuni* izolasyon oranından daha düşük olarak belirlenmiş olup, söz konusu farklılığın numunelerin laboratuara taşınma koşulları, yaş, mevsim, incelenen hayvan sayısı, hijyen ve coğrafi yapıdan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Dünyada ve ülkemizde koyunlarda yapılan çalışmalar sonunda *Campylobacter* spp. izolasyon oranının % 1,2 ile % 92 arasında değişiklik gösterdiği görülmektedir (4, 40, 71, 74, 149, 250). Stanley ve ark. İngiltere'de kuzularda % 92 (250), Lazou ve ark. Yunanistan'da koyun karkaslarında yaptıkları çalışmada % 72,7 oranında *Campylobacter* spp. (149), Elmalı Bitlis'te koyun kıyma ve karkaslarında sırasıyla % 4 ve % 6 oranlarında *C. jejuni* (71), Büyük ve ark. yöremizde koyunlardan aldıkları vajinal svap örneklerinde 11,42 oranında *Campylobacter* spp.(40) izole ederken, yine yöremizde Arıkoğlu ve Aydın koyunlardan aldıkları rektal svap örneklerinde % 56 oranında *C. jejuni* varlığı saptamışlardır (13). Yapılan araştırmalarda kesim amacı ile mezbahaya nakledilen hayvanlardaki *Campylobacter* spp. izolasyon oranının, stres gibi faktörlerden dolayı nakilden öncekine göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Wesley ve



ark. hindilerde yaptıkları bir araştırmada, kesimhaneye nakilden önce *Campylobacter* spp. prevalansının % 65, nakilden sonra % 90 olduğunu bildirmişlerdir (282). *Campylobacter* spp. izolasyon oranının, sahada toplanan örneklerin laboratuara taşınıp işlenmesi esnasında geçen süreden de etkilendiği bildirilmiştir. Ayrıca çevrenin *Campylobacter* spp. ile kontamine olmasında dışkı ile birlikte mezbahada kesilen hayvan akıntılarının yüzey sularına bulaşmasının da önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir. Bölgede Yaman ve ark. (289) göl (Çıldır gölü), akarsu (Kars çayı), işlem görmemiş içme suları ve anılan göl ve akarsulardan avlanan balıkların iç organlarında yaptıkları araştırmada, göl suyundan alınan örneklerde % 4.76, akarsudan alınan örneklerde % 14.28, içme sularından alınan örneklerde % 0 , incelenen balıkların iç organlarında ise % 2.66 oranında *C. jejuni* izole etmiş olmaları bu düşüncüyü desteklemektedir. Bu çalışmada klinik olarak sağlıklı görünen koyunlardan toplanan 350 örnekten ise % 34 oranında *Campylobacter* spp. izole ve tanımlanmıştır. Koyunlarda en yüksek izolasyon % 46,5 oranı ile rektal svap örneklerinden elde edildi. Çalışmada safra örneklerinden elde edilen *Campylobacter* spp. izolasyon oranı % 17,3 ile rektal svap örneklerine kıyasla daha düşük oranda bulundu. Bu çalışmada koyunlardan alınan örneklerden elde edilen izolasyon oranları Türkiye ve bölgemizde yapılan diğer çalışmalardan elde edilen izolasyon oranları ile benzerlik gösterirken, koyun rektal svap örneklerinden, safra örneklerine göre daha yüksek oranda *Campylobacter* spp. izolasyonu, bu etkenlerin hayvanlara bulaşmasında dışkı ile bulaşın rolünün olduğunu düşündürmektedir. Bu çalışmada, koyunlardan alınan örneklerden elde edilen % 34'lük *Campylobacter* spp. izolasyon oranı, bölgedeki Arıkoğlu ve Aydın'ın (13) koyunlardan elde ettiği izolasyon oranı (% 56)'ndan düşük, Büyük ve ark.(40) elde ettiği izolasyon oranının (% 11,42)'dan yüksek olarak bulunmuştur. Bu farklılığa neden olan faktörlerin başında numunelerin laboratuara taşınma koşulları, yaş, mevsim, incelenen hayvan sayısı, izolasyon metodu, kullanılan selektif besiyerlerinin türü, hijyen ve coğrafi yapının önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada koyunlardaki *Campylobacter* izolasyon oranının sığırlardakinden daha yüksek olduğu tespit edildi. Bu sonuç, ülkemizde önceki yıllarda yapılan çalışmalarda da gözlenmiştir. Diğer, incelediği 150 adet sığır ve koyun safra örneğinde sırasıyla % 35 ve % 57 oranında *Campylobacter* spp. izole etmiştir (59). Bu çalışmada, sığır ve koyun örneklerinde izolasyon amacı ile aynı metodoloji uygulanmasına rağmen

meydana gelen bu farklılıkta mevsimin de önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Ayrıca hayvanların yetiştirme şekli ve koşullarının etkisi söz konusu olabilir. Şöyle ki; mezbahada kesilen hayvanların orijinleri hakkında bilgi mevcut olmamakla birlikte ülkemizde özellikle de Doğu Anadolu'da koyunların sürüler halinde ve bir arada ekstansif bir yetiştiriciliğin yapılması, sığırların ise genellikle birkaç hayvandan ibaret küçük ahırlarda, bir anlamda daha izole yetiştirilmesi bu oranların elde edilmesinde etkili olabilir.

İnsanlarda ishalle seyreden hastalıkların genel olarak % 5-14'ünden sorumlu olan kampilobakter enfeksiyonlarının insidensi, gıda ve kişi hijyeninin daha yüksek olduğu Avrupa ülkelerinde % 1-5 oranında seyrederken, düşük hijyen şartlarına sahip, malnütrisyonun görüldüğü az gelişmiş Afrika ülkelerinde % 20'lerin üzerine çıkmaktadır. Ülkelerin gelişmişlik düzeyleri, enfeksiyonların insidensi kadar, ishalleri hastalıklardan izole edilen kampilobakterlerin tür düzeyinde dağılımını da etkilemektedir. Genel olarak insanlarda kampilobakterlerin sebep olduğu gastroenteritlerin yaklaşık olarak % 95'inden *C. jejuni* ve *C. coli* sorumlu olmakla birlikte, gelişmiş ülkelerde ishalleri olgulardan izole edilen kampilobakter suşlarının % 95'ini tek başına *C. jejuni* oluştururken gelişmekte olan ülkelerde olguların yaklaşık olarak % 50 sinden *C. coli* izole edilmektedir (192). İshalleri insanlardan alınan dışkı örnekleriyle yapılan çalışmalara ilişkin olarak, Fred ve ark. Kolombiya'da yaptıkları bir çalışmada, kampilobakterlerin prevalansının % 2,3 (84), Olesen ve ark. Danimarka'da prospektif vaka kontrol çalışmasında kampilobakter prevalansının % 3,3 olduğunu belirtmişlerdir (190). Yine ishalleri hastalarda Klein ve ark. ABD' de yaptıkları çalışmada, % 1,5 oranı bildirirken (138), İtalya'da Scarlata ve ark. yaptığı bir başka çalışmada kampilobakter türlerinin (% 6,5) en sık izole edilen enfeksiyöz ajan olduğu bildirilmiştir (236). Türkiye'de farklı bölgelerde ve farklı yaş gruplarındaki ishalleri hastalardan elde edilen dışkı örneği ile yapılmış değişik çalışmalarda, kampilobakter cinsi bakterilerin dışkı örneklerinden izolasyon sıklığının % 1-14,87 arasında olduğu bildirilmiştir (201). İshalleri hastalardan kampilobakter türlerinin izolasyon oranlarının belirlenmesine yönelik olarak yapılan diğer bazı çalışmalarda; Özkan ve ark. İzmir'de % 2 (205), Aşçı ve Yılmaz Elazığ'da % 14,87 (17), Gültekin ve ark. Sivas yöresinde % 5 (103), Yıldırım ve ark. Kayseri'de % 3 (293), Zarakolu ve ark. Ankara'da % 6 (295), Öngen ve ark. İstanbul'da % 1.2 (202), Taş ve Ardıç Ankara'da % 4 (257), Yılmaz ve

Tuğrul Edirne ve yöresinde % 4 olarak ortaya konmuştur (294). Bu çalışmada ishaller hastalardan alınan dışkı örneklerinde *Campylobacter* spp. izole edilememiş olması bu türlerin bölgedeki ishal etiyojisinde öneminin az olabileceği, infeksiyonun seyir şeklinin, etkenin saçılım özelliklerinin, örneklerin toplanması, saklanması ve işlenmesi sırasında oluşabilecek farklılıkların önemli faktör olabileceği düşünülmektedir. Sağlıklı görünüşteki insanlardan alınan dışkı örneklerinden ise kampilobakter izolasyon oranı % 2,5 olarak tespit edilmiş olup bu oran İzmir ve İstanbul'da elde edilen izolasyon oranlarından yüksek olup; Elazığ, Sivas, Kayseri, Ankara ve Edirne'den elde edilen izolasyon oranlarından daha düşük bulunmuştur. Ladron de Guevara ve ark., insan dışkı örneklerinde yaptıkları bir araştırmada, 4 °C'lik bir ortamda 24 saat süreyle saklanan örneklerde *Campylobacter* spp. izolasyon oranının % 16 oranında azaldığını rapor etmişlerdir (145). Bu çalışmada, insan dışkı örneklerinden elde edilen kampilobakter izolasyon oranı (% 2,5)'nin Türkiye'nin değişik bölgelerine (Elazığ, Sivas, Kayseri, Ankara ve Edirne) kıyasla daha düşük olmasının örneklerin toplanması, saklanması ve işlenmesi sırasında oluşabilecek farklılıkların yanı sıra yaş, ırk, genetik ve sosyal yapı gibi bireysel varyasyonlardan da kaynaklanması muhtemeldir (17, 103, 257, 293, 294).

Konvansiyonel kültür metotları ile *Campylobacter* spp. olarak tespit edilen izolatların tür spesifik primerlerle yapılan mPCR analizi neticesinde, sığır orijinli izolatların % 45,45'inde (30/66) *C. jejuni* ve %28,79'unda (19/66) *C. coli* olarak tanımlanmıştır. *C. jejuni*'nin *C. coli*'den daha yaygın olarak saptanması birçok çalışmada rapor edilmiştir (4, 23, 37, 110). Bae ve ark., inceledikleri 686 sığır rektal svap örneğinden % 34 oranında *C. jejuni* izole ederken, % 8 oranında *C. coli* izolasyonu bildirmişlerdir (23). Çalışmada mPCR ile *C. jejuni* ve *C. coli* olarak tanımlanamayan izolatlar selektif besiyerinde ve 42 °C'de mikroaerobik ortamda üreyebilmeleri, koloni morfolojileri ve mikroskopik görünümüne bakılarak diğer termofilik *Campylobacter* spp. olarak kabul edildi. *Campylobacter* spp. olarak kabul edilen bu izolatların ileriki çalışmalarda tür düzeyinde karakterizasyonu ve *C. jejuni* ve *C. coli* dışındaki termofilik kampilobakterlerin yaygınlığının belirlenmesi insan ve hayvan sağlığı açısından kampilobakterlerin bölgedeki epidemiyolojisini daha iyi anlamaya yardımcı olacaktır.

Koyunlarda, konvansiyonel kültür metotları ile *Campylobacter* spp. olarak tespit edilen izolatların tür spesifik primerlerle yapılan mPCR analizi neticesinde % 31,93'ü

(38/119) *C. jejuni* ve % 42,86'sı (51/119) *C. coli* olarak tanımlanmıştır. Bu oranlar, aynı bölgede Arıkoğlu ve Aydın'ın 50 adet koyun rektal svap örneği ile *C. jejuni* için elde ettikleri oran (% 56)'dan daha düşük olarak bulunmuştur (13). Bu farkın örnek alınan hayvan sayılarının, hayvanların yetiştirildiği lokasyonun ve izolasyonda kullanılan teknik ve besiyeri farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, ülkemizin farklı bölgelerinde koyunlarda yapılan çalışmalarda *C. jejuni* % 15- % 41, *C. coli* ise % 7- % 9 arasında değişen oranlarda izole edilmiştir (59, 60, 178). Yapılan bir araştırma, izolasyon amacı ile kullanılan Preston *Campylobacter* Selektif Agarın *C. coli* türünü, *C. jejuni*'ye kıyasla daha yüksek oranda tespit ettiği gösterilmiştir (171). Bu çalışmada, *C. coli*'nin ülkemizdeki diğer çalışmalardan daha yüksek oranda saptanmasında, birçok faktörün yanı sıra izolasyon amacıyla Preston *Campylobacter* Selektif Agarın kullanılmasının da rolü olması muhtemeldir. Robinson, süt amacıyla yetiştirilen hayvanlarda *C. jejuni*'nin dışkı ile sürekli olarak çevreye atılmadığını bildirmiştir (226). Buna karşılık *C. coli*'nin dışkı ile saçıldığı yapılan çalışmada ortaya konulmuştur (58). Ayrıca yapılan diğer bir çalışmada çevresel su kaynaklarında *C. coli*'nin *C. jejuni*'ye göre daha yüksek oranda tespit edilmesi de (37), *C. coli*'nin çevresel kontaminasyon potansiyelinin fazlalığını düşündürmekte ve bu çalışma da bu hipotezi desteklemektedir.

Bu çalışmada insanlarda konvansiyonel kültür metotları ile *Campylobacter* spp. olarak tespit edilen izolatların tür spesifik primerlerle yapılan mPCR analizi neticesinde % 1,67'si (2/120) *C. jejuni* ve % 0,83'ü (1/120) *C. coli* olarak tanımlanmıştır. Bu veriler Dünya genelinde ishaller hastalıklarında kampilobakterlerin görülme sıklığının tespitini amaçlayan çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldığında, ülkelerin ve ülkemizin gelişmişlik durumu da dikkate alındığında, çalışma sonuçlarının beklendiği şekilde çok yüksek olmayıp, gelişmiş ülkelerin sonuçları ile benzerlik gösterdiği görülmektedir. Nitekim gıda ve kişisel hijyenin uzun süredir sıkı denetlendiği A.B.D de Klein ve ark. % 1,5 gibi mevcut çalışmadaki orandan daha düşük bir izolasyon oranı bildirmişlerdir (138). Buna karşılık İtalya'dan Scarlata ve ark.'nın bildirdikleri % 6,5'lik (236), Portekiz'den Carbita ve ark.(42) bildirdikleri % 5,3'lük ve Danimarka'dan Olesen ve ark.(190) bildirdikleri % 3,3'lük izolasyon oranları mevcut çalışmadaki izolasyon oranlarıyla benzerdir. Bu çalışma verileri, insanlarda akut bakteriyel gastroenteritisin en yaygın sebeplerinden biri olan kampilobakter türlerinin

tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de sığır ve koyunlarda yüksek seviyede seyrettiğini göstermektedir. *C. jejuni*'nin çevreyi, karkasları ve diğer gıdaları kontaminasyonunda hem sığır hem de koyunlar önemli rol oynarken, *C. coli*'nin çevreyi kontaminasyonunda koyunların rolünün sığırlara göre daha yüksek potansiyelde olduğu düşünülmektedir. Kısaca sağlıklı sığır ve koyunların termofilik kampilobakterlerin çevresel saçılım kaynağı olabilecekleri ve gıda zincirini ve çevreyi kontamine etmede önemli role sahip olabilecekleri kanaatine varıldı.

Çalışmada tür spesifik PCR sonucunda *C. jejuni* ve *C. coli* olarak tanımlanmış izolatlar arasındaki genetik polimorfizm *fla* tiplendirme metodu kullanılarak araştırıldı. Kampilobakter türlerinin PCR-RFLP analizi için en sık tercih edilen gen hedeflerinden biri flagella genleridir (4, 8, 26, 38, 183, 198). *Campylobacter* spp.'deki *flaA* geni önemli bir sekans heterojenitesi gösterir ve dolayısıyla moleküler analizler için iyi bir epidemiyolojik marker olarak kullanılır. Ancak son yıllarda *flaA* tiplendirme ve diğer moleküler yöntemlerin, genetik instabilitenin varlığından dolayı kampilobakterlerin tiplendirilmesinde yetersiz olabileceği ortaya konmuştur (279). Son yıllardaki çalışmalarda, kampilobakterlerin flagella gen bölgesinde rekombinasyonların varlığı kanıtlanmıştır (217, 277). Bununla beraber *fla* tiplendirme, diğer metotlara göre hızlı, pratik, daha az maliyetli olması ve termal döndürücü dışında spesifik bir ekipmana ihtiyaç duymaması nedeni ile bu çalışmada tercih edilmiştir ve başarı ile kullanılmıştır. Bu yöntemin ileriki çalışmalarda başka genotiplendirme yöntemleri ile desteklenmesi ve karşılaştırılması daha güvenli sonuçlara ve çıkarımlara ışık tutacaktır.

Çalışmada sığırların safra ve bağırsak içeriği örneklerinden elde edilen *C. jejuni* ve *C. coli* izolatları *flaA* tiplendirmesi sonucunda toplam 19 *flaA* profili elde edildi. Sığır orijinli kampilobakter türlerinin *flaA* tiplendirilmesi amacı ile farklı restriksiyon enzimleri kullanılarak yapılan önceki çalışmalarda dokuz ile 35 arasında *flaA* profili tespit edildiği bildirilmiştir (81, 156). Kampilobakter türlerinden elde edilen *flaA* profil sayısındaki farklılıkta; kullanılan primerler, laboratuvar koşulları ve izolatların coğrafik dağılımının etkisinin olduğu rapor edilmiştir (22, 182). Bu çalışmada, bağırsak içeriği izolatlarından elde edilen bir profil, safra sıvısında gözlenen profillerle benzerlik gösterdi. Safrada gözlenen profil (I); bağırsak içeriğinde gözlenen profillerden birisi ile, koyun rektal svap örneklerinde gözlenen profillerden birisi ile (III), koyun safra örneklerinde gözlenen profillerden birisi ile (XV) benzerlik gösterdi. Bağırsak içeriği

izolatlarından elde edilen bir profil (VII) aynı zamanda koyun safra sıvısında gözlenen profillerle (V) benzerlik gösterdi. Profiller arasındaki bu konservasyon örneklerin benzer özelliklerdeki coğrafi bölgelerden toplanması ile ilişkili olabilir. Bazı *flaA* profilleri yüksek oranda tespit edilirken, bazıları da sadece birer izolatta gözlemlendi. Örneğin; sığırların safra örneklerinden elde edilen *C. jejuni* izolatlarında en yaygın olarak bulunan profil % 41,2'lik bir oranla temsil edilirken bağırsak içeriği örneklerinden elde edilen *C. jejuni* izolatlarında en yaygın olarak bulunan profil % 23,1'lik bir oranla temsil edildi. Sığırların safra örneklerinden elde edilen *C. coli* izolatlarında en yaygın olarak bulunan profil % 88,8'lik bir oranla temsil edilirken, bağırsak içeriği örneklerinden elde edilen *C. coli* izolatlarında en yaygın olarak bulunan profil % 30'luk bir oranla temsil edildi. Bu veriler ışığında sığırlarda bazı suşların diğer suşlara oranla daha yaygın olarak bulunduğu, yaygın suşların tespit edilmesi, koruyucu önlemler alınması, kampilobakterlerin ekoloji ve epidemiyolojilerini daha iyi anlamaya yardımcı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca, çalışmada birçok farklı profilin belirlenmesi kampilobakterlerin genetik olarak heterojen olduğunu bir kez daha göstermektedir.

Kars ve yöresinde yapılan çalışmalarda Arıkoğlu ve Aydın (13), incelemiş olduğu 270 örneğin 186'sında (% 68,8) *C. jejuni* izole etmiş olup bu oranlar, koyunlarda % 56 (28/50), köpeklerde % 37,5 (3/8), sığırlarda % 62 (31/50), kazlarda % 89,6 (52/58), martılarda % 100 (10/10), kargalarda % 100 (10/10), ördeklerde % 86,6 (13/15), tavuklarda % 87,5 (28/32), atlarda % 0 (0/5), buzağılarda % 25 (3/12), güvercinlerde % 10 (1/10) ve kuzularda % 70 (7/10) şeklindedir. Aydın ve ark., 40 evcil kazın klaokasından aldıkları svap örneklerinin tamamında *C. jejuni*, 2 örnekte de (% 5) *C. coli* izole etmişlerdir (21). Büyük ve ark., koyunlardan aldıkları vajinal svap örneklerinde % 11,42 (4/35) *C. coli* izole etmişlerdir (40). Yaman ve ark.(290) göl, akarsu, işlem görmemiş içme suları ve anılan göl ve akarsulardan avlanan balıkların iç organlarında yaptıkları araştırmada, göl suyundan alınan örneklerde % 4.76, akarsudan alınan örneklerde % 14.28, içme sularından alınan örneklerde % 0, incelenen balıkların iç organlarında ise % 2.66 oranında *C. jejuni* izole etmişlerdir (289). Gülmez ve Güven araştırdıkları 80 adet peynir örneğinde % 5 (2/80) oranında *C. jejuni* izole etmişlerdir (102). Yaman ve ark., Kars ve Ardahan'dan topladıkları 120 adet işlenmemiş süt örneğinde % 5 (6/120) oranında *C. jejuni* izole etmişlerdir (290). Kars ve yöresinde yapılan tüm bu çalışmalar, kampilobakterlerin hayvan atıkları ile dışkıları ve bunlarla

kontamine sular ile gıdalarda değişen oranlarda bulunabileceğini, dolayısıyla insan ve hayvan sağlığını doğrudan tehdit etme potansiyelinde olduğunu göstermektedir. Yörede birçok farklı kaynaktan ve mevcut çalışmada sığır ve koyunların gaita örneklerinden kampilobakterlerin izole edilmesi, bu etkenin saçılım kaynağı olarak sığır ve koyunların önemli bir potansiyele sahip olabileceklerini göstermektedir. Ancak, detaylı epidemiyolojik çıkarımlar için bölgedeki gıdalardan, çevresel örneklerden ve farklı hayvan türlerinden elde edilecek izolatlarla geniş bir tiplendirme çalışması gereklidir.

Koyun orijinli kampilobakter izolatları arasındaki genetik heterojenitenin araştırılmasına yönelik çalışmalar oldukça sınırlıdır. Fitzgerald ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, *flaA* tiplendirme yöntemi ile 71 koyun izolatından 14 farklı profil elde edilmiştir (81). Koyun abortlarından elde edilen 25 *C. jejuni* izolatının PFGE analizinde, 10 farklı profil elde edildiği ve predominant profillerin izolatların % 66'sında gözlemlendiği bildirilmiştir (157). Bu çalışmada koyun örneklerinden izole edilen *C. jejuni* ve *C. coli*'lerin *flaA* tiplendirilmesi neticesinde toplam 40 farklı profil elde edildi. Bazı *flaA* profilleri yüksek oranda tespit edilirken, bazıları da sadece birer izolatta gözlemlendi. Örneğin; koyun safra örneklerinden elde edilen *C. jejuni* izolatlarında en yaygın olarak bulunan profil % 25'lik bir oranla temsil edilirken, rektal svap örneklerinden elde edilen *C. jejuni* izolatlarında en yaygın olarak bulunan profil % 27,3'lük bir oranla temsil edildi. Koyunların safra örneklerinden elde edilen *C. coli* izolatlarında en yaygın olarak bulunan profil % 50'lik bir oranla temsil edilirken, rektal svap örneklerinden elde edilen *C. coli* izolatlarında en yaygın olarak bulunan profil % 14,3'lük bir oranla temsil edildi. Rektal svap izolatlarından elde edilen bir profil (XXIII), farklı bir hayvandan alınan safra sıvısında gözlenen profillerle (X) benzerlik gösterdi. Ayrıca koyunlardan alınan safralardan elde edilen profillerden biri (VII), insan dışkılarından elde edilen izolatlardan birine (II), koyunlardan alınan safralardan elde edilen profillerden diğer biri (VIII) ise yine insan dışkısından elde edilen diğer bir izolata (III) benzerlik gösterdi. Sığırlarda olduğu gibi, koyunlarda da bazı suşların diğer suşlara oranla daha yaygın olarak bulunduğu, yaygın suşların tespit edilerek koruyucu önlemler alınmasına yardımcı olacağı, bu etkenlerin epidemiyolojilerini belirlemede faydalı olacağı düşünölmektedir. Sığır izolatlarında olduğu gibi koyun suşları arasında da birçok farklı profilin mevcut olması kampilobakterlerin genetik olarak heterojen olduğu bilgisini desteklemektedir. İnsan dışkısı örneklerinden elde

edilen *C. jejuni* profilleri ile koyun safra örneklerinden elde edilen profillerin benzerlik göstermesi, sağlıklı sığır ve koyunların termofilik kampilobakterleri saçmak suretiyle gıda zincirini ve çevreyi kontamine ederek ve özellikle hayvanlarla direk teması olanlar olmak üzere insanlara bulaşta önemli bir rol oynayabileceklerini ortaya koymuştur.

Bu çalışmada elde edilen *flaA* profillerinin bir kısmının diğer profillerle kıyaslandığında daha dominant olduğu gözlemlendi. Örneğin; sığırların safra örneklerinden elde edilen *C. jejuni* izolatlarında en yaygın olarak bulunan profiller % 41,2'lik bir oran ile, koyun safra örneklerinden elde edilen *C. coli* izolatlarında ise en yaygın olarak bulunan profiller % 27,3'lük bir oranla temsil edildi. Çalışmada, sığırlardaki bağırsak içeriği izolatlarından elde edilen bir profil, safra sıvısında gözlenen profillerle benzerlik gösterdi. Sığır bağırsak içeriği izolatlarından elde edilen bir profil (VII), aynı zamanda koyun safra sıvısında gözlenen profillerle (V) benzerlik gösterdi. Sığır safrasında gözlenen profil (I); bağırsak içeriğinde gözlenen profillerden birisi ile, koyun rektal svap örneklerinde gözlenen profillerden birisi ile (III), koyun safra örneklerinde gözlenen profillerden birisi ile (XV) benzerlik gösterdi. Koyun rektal svap izolatlarından elde edilen bir profil (XXIII), koyun safra sıvısında gözlenen profillerle (X) benzerlik gösterdi. Ayrıca koyunlardan alınan safralardan elde edilen profillerden biri (VII), insan dışkılarından elde edilen izolatlardan birine (II), diğer biri (VIII) ise yine insan dışkısından elde edilen diğer bir izolata (III) benzerlik gösterdi. Ayrıca *flaA* tiplendirme neticesinde koyun orijinli termofilik *Campylobacter* izolatları arasındaki genetik heterojenitenin sığır izolatları ile kıyaslandığında daha yüksek olduğu tespit edildi. Örneğin; sığır orijinli *C. coli* izolatlarının *flaA* tiplendirmesi neticesinde 6 farklı restriksiyon profili elde edilirken, koyun orijinli izolatlarda 16 farklı profil saptandı. *FlaA* tiplendirme neticesinde hem sığır hem de koyun izolatlarından elde edilen profillerden bazılarının diğer profillere kıyasla daha yüksek oranda bulunduğu saptandı. Bu bulguların ışığında kampilobakterlere karşı koruma çalışmalarında, saha suşları arasındaki genetik heterojenitenin araştırılması ve dominant izolatların mutlaka göz önünde bulundurulmasının gerek uzun vadede başarılı sonuç elde etmek için gerekse de insan sağlığı için büyük önem taşıdığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak; sığır, koyun ve insan orijinli *C. jejuni* ve *C. coli* suşları arasındaki genetik heterojeniteyi tespit etmeye yönelik olarak *flaA* tiplendirme yönteminin güvenilir bir şekilde kullanılabileceği görüldü. Bununla birlikte ulaşılan verilerin farklı



moleküler tiplendirme metotları ile (MLST, AFLP, PFGE) desteklenmesi gerektiği düşünüldü. Ayrıca, saf izolasyonun zor olabileceği rektal svap ve bağırsak içeriği gibi örneklerden elde edilen izolatların tiplendirilmesinde, spesifik gen bölgesi amplifikasyonuna dayandığı için *flaA* tiplendirmenin kullanışlı olabileceği kanısına varıldı. Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler ışığında, *C. jejuni* ve *C. coli*'nin çevreyi ve gıda zincirini kontamine etmesinde sığır ve koyunların önemli role sahip olduklarını, insanlara bulaşı sağladıklarını ve bu hayvanların *Campylobacter* epidemiyolojisinin incelenmesinde mutlaka göz önünde bulundurulması gerektiği düşünüldü. *C. jejuni*'nin kaynağı olarak sığır ve koyunların her ikisi de önemli role sahip iken, *C. coli*'nin çevreye yayılmasında özellikle koyunların daha önemli rol oynadığı saptandı. Ayrıca yapılan tiplendirme neticesinde, koyun ve sığır orijinli izolatlar arasında yüksek bir genetik heterojenitenin mevcut olduğu ve bazı bant profillerinin diğer profillere göre daha dominant olduğu gözlemlendi. Sığır ve koyunların, insanlarda görülen kampilobakter infeksiyonlarındaki rolünü ortaya koymak ve bu infeksiyonun epidemiyolojisini daha iyi anlayabilmek için, bu hayvanların yanı sıra başta kanatlılar olmak üzere, farklı hayvan türleriyle beraber özellikle mezbahane atık suyu gibi çevresel kaynaklardan alınacak örneklerin ayırım gücü ve standardizasyonu daha yüksek olan moleküler tiplendirme yöntemleri ile incelenmesini hedefleyen geniş ölçekli araştırmalara gereksinim olduğu düşünüldü.

## 5.ÖZET

Bu çalışmada, insanlarda akut bakteriyel gastroenteritisin en yaygın etkenleri olarak bilinen *C. jejuni* ve *C. coli*'nin, klinik olarak sağlıklı sığır ve koyunlar ile sağlıklı ve ishalleri insanların dışkılarından multipleks zincirleme polimeraz reaksiyonu (mPCR) ile araştırılması ve izolatlar arasındaki genetik heterojenite düzeyinin Flagellin A (*flaA*) tiplendirme metodu ile belirlenmesi amaçlandı.

Toplam 300 sağlıklı sığırdan elde edilen bağırsak içeriği ve safra sıvısı örnekleri Preston Zenginleştirme Buyyonu ve Preston Selektif Agara ekildi. İncelenen sığır örneklerinin 66 (%22) adedi konvansiyonel kültür metotları ile *Campylobacter* spp. pozitif olarak saptandı. mPCR ile incelenen izolatların % 45,45 (30/66)'i *C. jejuni* ve % 28,79 (19/66)'u *C. coli* olarak tanımlandı. *C. jejuni* ve *C. coli* olarak tanımlanan izolatlar, *flaA* geninin 1,7 kb ampikon bölgesinin Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analizi (*flaA* tiplendirme) ile tiplendirildi. Sığırlarda, *flaA* tiplendirme metodu ile 19 adet DNA profili tanımlandı.

Bu çalışmada 350 sağlıklı koyundan toplanan rektal svap örnekleri de *C. jejuni* ve *C. coli* yönünden incelendi. Konvansiyonel kültür metotları neticesinde incelenen koyun örneklerinin 119 (%34)'unda *Campylobacter* spp. izolasyonu gerçekleştirildi. mPCR analizi neticesinde izolatların % 31,93 (38/119)'ü *C. jejuni* ve % 42,86 (51/119)'sı *C. coli* olarak tanımlandı. *C. jejuni* ve *C. coli* olarak tanımlanan izolatlar, *flaA* tiplendirme yöntemi ile başarılı bir şekilde tiplendirildi ve 25 adet DNA profili elde edildi.

Kasap, mezbahane çalışanları ve ishalleri hastalardan alınan toplam 120 insan dışkı örneği *C. jejuni* ve *C. coli* yönünden incelendi. Konvansiyonel kültür metotları neticesinde incelenen örneklerin 3 (%2,5)'ünde *Campylobacter* spp. izolasyonu gerçekleştirildi. mPCR analizi neticesinde izolatların % 1,67 (2/120)'si *C. jejuni* ve % 0,83 (1/120)'ü *C. coli* olarak tanımlandı. *C. jejuni* ve *C. coli* olarak tanımlanan izolatlar, *flaA* tiplendirme yöntemi ile başarılı bir şekilde tiplendirildi ve 3 farklı DNA profili elde edildi.

Sonuç olarak, sığır ve koyunlardan elde edilen *C. jejuni* ve *C. coli* izolatları arasında yüksek bir genetik heterojenitenin mevcut olduğu ve bazı DNA profillerinin diğer profillere göre daha dominant olduğu gözlemlendi. Ayrıca bu çalışmadan elde edilen veriler, *C. jejuni* ve *C. coli*'nin çevreyi ve gıda zincirini kontamine etmesinde sığır,

koyun ve insanların önemli role sahip olduklarını ve bu durumun *Campylobacter* infeksiyonlarının epidemiyolojinde göz önünde bulundurulması gerektiğini ortaya çıkarmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Sığır, koyun, insan, *C. jejuni*, *C. coli*, mPCR, PCR-RFLP, *flaA* tiplendirme.

## 6. SUMMARY

The objectives of this study were to isolate *C. jejuni* and *C. coli*, which are recognized as the major agents of bacterial gastroenteritis in humans, from faecal samples of clinically healthy cattle and sheep and clinically healthy and diarrhoeic humans and to identify the isolates by multiplex Polymerase Chain Reaction (mPCR). In addition, the degree of genetic heterogeneity among these isolates was determined by using Flagellin A (*flaA*) typing assay.

Intestinal content, gall bladder and rectal swab samples collected from a total number of 300 clinically healthy cattle were inoculated onto Preston Enrichment broth and Preston *Campylobacter* Selective agar. Of the cattle samples, 66 (22 %) were determined to be positive for *Campylobacter* spp. by conventional culture methods. In the analysis of the isolates by mPCR assay, *C. jejuni* and *C. coli* were identified from 45,45 % (30/66) and 28,79 % (19/66), respectively. The isolates identified as *C. jejuni* or *C. coli* were genotyped by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis (*flaA* typing) of 1.7 kb amplicon portion of the *flaA* gene. The total number of DNA patterns defined by *flaA* typing were 19 in the isolates from cattle.

The rectal swab samples collected from a total number of 350 clinically healthy sheep were examined for the presence of *C. jejuni* and *C. coli* strains. Of the sheep samples, 119 (34 %) were determined to be positive for *Campylobacter* spp. by conventional culture methods. In the analysis of the isolates by mPCR assay, *C. jejuni* and *C. coli* were identified from 31,93 % (38/119) and 42,86 % (51/119), respectively. All the isolates identified as *C. jejuni* or *C. coli* were successfully genotyped by *flaA* typing assay. The total number of DNA patterns defined by *flaA* typing were 25 in the isolates from sheep.

The fecal samples collected from a total number of 120 clinically healthy butcher, slaughterhouse worker and diarrhoeic humans were examined for the presence of *C. jejuni* and *C. coli* strains. Of the these samples, 3 (2,5 %) were determined to be positive for *Campylobacter* spp. by conventional culture methods. In the analysis of the isolates by mPCR assay, *C. jejuni* and *C. coli* were identified from 1,67 % (2/120) and 0,83 % (1/120), respectively. All the isolates identified as *C. jejuni* or *C. coli* were successfully subtyped by *flaA* typing assay. The total number different of DNA patterns defined by *flaA* typing were 3 in the isolates from human.

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

**Key Words:** Cattle, sheep, human, *C. jejuni*, *C. coli*, multiplex PCR, PCR-RFLP, *flaA* typing.

## 7. KAYNAKLAR

1. Aık, M.N., etinkaya, B.: Random amplified polymorphic DNA analysis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from healthy cattle and sheep. J. Med. Microbiol. 55: 331–334, 2006.
2. Aık, M.N. ve etinkaya, B.: Heterogeneity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from healthy sheep. Vet. Microbiol. 115: 370–375, 2006.
3. Aık, M.N. ve etinkaya, B.: The heterogeneity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from healthy cattle. Lett. App. Microbiol. 41: 397–403, 2005.
4. Açık, M.N.: Sığır ve koyun orijinli *C. jejuni* ve *C. coli*'nin moleküler tiplendirilmesi. Doktora tezi, Elazığ, 2006.
5. Adesiyun, A.A., Kaminjolo, J.S., Loregnard, R., Kitson-Piggott, W. : *Campylobacter* Infections in Calves, Piglets, Lambs and Kids in Trinidad. Br. Vet. J. 148:547-556, 1992.
6. Aktaş, O., Tuncel, E.: Diyareli hastalarda *Campylobacter jejuni* yönünden bir araştırma. Mikrobiyol. Bült. 21: 79-85, 1987.
7. Allos, B.M. : *Campylobacter jejuni* Infections: Update on Emerging Issues and Trends. Clin. Infect. Dis. 32:1201-1206, 2001.
8. Alm, R.A., Guerry, P., Trust, T.J. : Distribution and Polymorphism of the Flagellin Genes from Isolates of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. J. Bacteriol. 175: 3051-3057, 1993.
9. Altekruse, S.F., Swerdlow, D.L., Stern, N.J. : Microbial Food Borne Pathogens. *Campylobacter jejuni*. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 14: 31-40, 1998.
10. Arda, M.: Biyoteknoloji; Bazı Temel İlkeler. Kükem Derneği Bilimsel Yayınları No:2, İkinci Baskı, 1994.
11. Arda, M.: Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi 2.Baskı 46: 498. Ankara, 2000.
12. Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N., Kahraman, M., Akay, Ö., Ilgaz, A., İzgür, M., Diker, K.S. : Özel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi:26, Dördüncü Baskı, 1999.

13. Arıkoğlu, ., Aydın, F.: Kars y6resinde evcil ve yabani hayvanlarda *C. jejuni*'nin prevalansı. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fak6ltesi Dergisi. 3(2):73-180, 1996.
14. Aspinall, G.O., McDonald, A.G., Pang, H., Kurjanczyk, L.A., Penner, J.L. : Lipopolysaccharides of *Campylobacter jejuni* Serotype O:19 Structures of Core Oligosaccharide Regions from the Serostrain and Two Bacterial Isolates From Patients with the Guillain-Barr6 Syndrome. Biochem. 33:241-249, 1994.
15. Aspinall. S.T., Wareing, D.R., Hayward, P.G., Hutchinson, D.N. : Selective Medium for Thermophilic *Campylobacters* including *Campylobacter upsaliensis*. J. Clin. Pathol. 46: 829-831, 1993.
16. Aspinall, G.O., Mc Donald, A.G., Raju, T.S., Pang, H., Mills, S.D.,Kurjanczyk, L.A., Penner, J. L.: Serological Diversity and Chemical Structures of *C. jejuni* Low-Molecular-Weight Lipopolysaccharides. J. Bacteriol. 174(4): 1324-1332,1992.
17. Aşçı, Z., Yılmaz, M., Ay, S.: Gastroenteritli olgularda *Campylobacter jejuni* araştırması [6zet]. XXV. T6rk Mikrobiyoloji Kongresi (8-11 Eyl6l 1992,Bursa) Kongre Kitabı'nda. İstanbul: T6rk Mikrobiyoloji Cemiyeti, Sayfa: 96, 1992.
18. Atabay, H.I., Corry, J.E. : The Isolation and Prevalence of *Campylobacters* from Dairy Cattle using a Variety of Methods. J. Appl. Microbiol. 84: 733-740, 1998.
19. Aydın, F., G6m6şsoy, K.S., İa, T., Semerkant, B., Eşel, D., Akan, M., 6zdemir, A.: The Prevalence of *Campylobacter jejuni* in Various Sources in Kayseri, Turkey, and Molecular Analysis of Isolated Strains by PCR-RFLP. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 31(1): 13-19, 2005.
20. Aydın, N. ve Paracıkoğlu, J. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar).İlke-Emek yayınları. B6l6m 27, s: 237-249. ISBN: 975-6268-06-9.
21. Aydın, F., Atabay, H. and Akan, M. The isolation and characterization of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* from domestic geese (*Anser anser*). J. Appl. Microbiol, 90: 637–642, 2001.
22. Ayling, R.D., Woodward, M.J., Evans, S., Newell, D.G. : Restriction Fragment Length Polymorphism of Polymerase Chain Reaction Products Applied to the Differentiation of Poultry *Campylobacters* for Epidemiological Investigations. Res. Vet. Sci. 60: 168-172, 1996.

23. Bae, W., Kaya, K.N., Hancock, D.D., Call, D.R., Park, Y.H., Besser, T.E. : Prevalence and Antimicrobial Resistance of Thermophilic *Campylobacter* spp. from Cattle Farms in Washington State. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 169-174, 2005.
24. Barros-Velazquez, J., Jimenez, A., Villa, T.G. : Isolation and Typing Methods for the Epidemiologic Investigation of Thermotolerant *Campylobacters*. *Int. Microbiol.* 2: 217-226, 1999.
25. Belkum, A.van: DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR: a literature review. *Clin Microbiol Rev.* 7: 174-184, 1994.
26. Birkenhead, D. P., Hawkey, M., Heritage, J., Gascoyne-Binzi, D. M. and Kite, P. : PCR for the detection and typing of *Campylobacters*. *Lett. Appl. Microbiol.* 17: 235-237, 1993.
27. Black, R.E., Levine, M.M., Clements, M.L., Hughes, T.P., Blaser, M.J. : Experimental *Campylobacter jejuni* Infection in Humans. *J. Infect. Dis.* 157: 472-479, 1988.
28. Blakelock, R.T., Beasley, S.W.: Infection and the gut. *Semin. Pediatr. Surg.* 12: 265-274, 2003.
29. Blaser, M.J. : Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. *J. Infect. Dis.* 176:103-105, 1997.
30. Blaser, M.J., Berkowitz, I.D., LaForce, M., Cravens, J., Reller, L.B., Wang, W.L. : *Campylobacter* enteritis: Clinical and Epidemiologic Features. *Ann. Intern. Med.* 91: 179-185, 1979.
31. Blaser, M.J., Hardesty, H.L., Powers, B., Wang, W.L. : Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in Biological Milieus. *J. Clin. Microbiol.* 11: 309-313, 1980.
32. Blaser, M., Hardesty, H., Powers, B., Wang, W. : Extra intestinal *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections: host factors and strain characteristics. *J. Infect. Dis.* 153: 552-559, 1986.
33. Bolton, F.J., Hutchinson, D.N., Coates, D. : Blood-Free Selective Medium for Isolation of *Campylobacter jejuni* from Feces. *J. Clin. Microbiol.* 19: 169-171, 1984.



34. Bolton, F.J., Robertson, L. : A Selective Medium for Isolating *Campylobacter jejuni/coli*. J. Clin. Pathol. 35: 462-467, 1982.
35. Bolton, F.J., Coates, D., Hinchliffe, P.M., Robertson, L. : Comparison of selective media for isolation of *Campylobacter jejuni/coli*. J. Clin. Pathol. 36(1): 78-83, 1983.
36. Broman, T., Bergström, S., Sellin, M., Waldenström, J., Danielsson-Tham, M.L., Olsen, B : *Campylobacter jejuni* in Black-Headed Gulls (*Larus ridibundus*): Prevalence, Genotypes, and Influence on *C. jejuni* Epidemiology. J. Clin. Microbiol, 40( 12 ), 4594-4602, 2002.
37. Brown, P.E., Christensen, O.F., Clough, H.E., Diggle, P.J., Hart, C.A., Hazel, S., Kemp, R., Leatherbarrow, A.J., Moore, A., Sutherst, J., Turner, J., Williams, N.J., Wright, E.J., French, N.P. : Frequency and Spatial Distribution of Environmental *Campylobacter* spp. Appl. Environ. Microbiol. 70: 6501-6511, 2004.
38. Burnens, A.P., Wagner, J., Lior, H., Nicolet, J., Frey, J. : Restriction Fragment Length Polymorphism among the Flagellar Genes of the Lior Heat-Labile Serogroup Reference Strains and Field Strains of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. Epidemiol. Infect. 114: 423-431, 1995.
39. Butzler, J.P., Dekeyser, P., Detrain, M., Dehaen, F. : Related Vibrio in Stools. J. Pediatr. 82: 493-495, 1973.
40. Büyük, F., Çelebi, Ö., Şahin, M., Ünver, A., Tazegül, E. İki Farklı Koyun ve Keçi Sürüsünde Brucella ve *Campylobacter* Ortak Enfeksiyonu. <http://vetdergi.kafkas.edu.tr/inpress/buyuk.pdf> Erişim Tarihi: 20.01.2011.
41. Cabrita, J., Rodrigues, J., Braganca, F., Morgado, C., Pires, I., Goncalves, A.P. : Prevalence, Biotypes, Plasmid Profile and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* Isolated from Wild and Domestic Animals from Northeast Portugal. J. Appl. Bacteriol. 73: 279-285, 1992.
42. Cabrita, J., Pires, I., Vlaes, L.: *Campylobacter* Enteritis in Portugal: Epidemiological Features and Biological Markers. Eur. J. Epidemiol. 8(1): 22-26, 1992.

43. Caldwell, M.B., Guerry, P., Lee, E.C., Burans, J.P., Walker, R.I. : Reversible Expression of Flagella in *Campylobacter jejuni*. Infect. Immun. 50: 941-943, 1985.
44. Callicott, K.A., Stern, N.J., Hiatt, K.L. : Isolation of DNA for PCR Assays from Noncultivable *Campylobacter jejuni* Isolates. Poult. Sci. 84: 1530-1532, 2005.
45. Cappelier, J.M., Minet, J., Magras, C., Colwell, R., Federighi, R.M. : Recovery in embryonated eggs of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni* cells and maintenance of ability to adhere to hela cells after resuscitation. Appl. Environ. Microbiol. 65: 5154-5157, 1999.
46. Carvalho, A. C. T., Ruiz-Palacios, G. M., Cervantes,P.R., Cervantes,L.E., Jiang, X., Pickering L.K.: Molecular Characterization of Invasive and Noninvasive *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolates. J. Clin. Microbiol, 39( 4 ), 1353-1359, 2001.
47. Champion O.L., Best, E.L., Frost, J.A.: Comparison of pulsedfield gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism techniques for investigating outbreaks of enteritis due to *Campylobacters*. J. Clin Microbiol. 40: 2263–2265, 2002.
48. Chowdhury, M.N.H., Bact, D., Youssef, A.: *Campylobacter* Gastroenteritis in Children in Riyadh, Saudi Arabia J. Tropical Pediatrics. 38(4):158-161, 1992.
49. Comi, G., Ferroni, P., Cocolin, L., Cantoni, C., Manzano, M. : Detection and Identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by Two-Step Polymerase Chain Reaction. Mol. Biotechnol. 3: 266-268, 1995.
50. Cornelius, A.J., Nicol, C., Hudson, J.A. : *Campylobacter* spp. in New Zealand Raw Sheep Liver and Human *Campylobacteriosis* Cases. Int. J. Food Microbiol. 99: 99-105, 2005.
51. Corry, J.E., Atabay, H.I. : Comparison of the Productivity of Cefoperazone Amphotericin Teicoplanin (CAT) Agar and Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate (mCCD) Agar for Various Strains of *Campylobacter*, *Arcobacter* and *Helicobacter pullorum*. Int. J. Food Microbiol. 38: 201-209, 1997.
52. Corry, J.E., Atabay, H.I. : Poultry as a Source of *Campylobacter* and Related Organisms. Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol. 30: 96-114, 2001.

53. Cotruvo, J.A., Dufour A., Rees G., Bartram J., Carr R., Cliver D.O., Craun G.F., Fayer R. and Gannon V.P.J.: Waterborne zoonoses: identification, cases and control. Erişim:[[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/diseases/zoonoses/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/zoonoses/en/)]. Erişim tarihi: 21.12.2010.
54. De Boer, P., Duim, B., Rigter, A., van der Plas, P.J., Jacobs-Reitsma, W.F., Wagenaar J.A.: Computer-assisted analysis and epidemiological value of genotyping methods for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J Clin Microbiol. 38: 1940-1946, 2000.
55. Dekeyser, P., Gossuin-Detrain, M., Butzler, J.P., Sternon, J. : Acute Enteritis due to Related Vibrio: First Positive Stool Cultures. J. Infect. Dis. 125: 390-392, 1972.
56. De La Puente-Redondo, V.A.: Comparasion of different PCR approaches for typing of *Franciella tularensis* strains. J. Clin. Microbiol. 38: 1016-1022, 2000.
57. Denes, A.S., Lutze-Wallace, C.L., Cormier, M.L., Garcia, M.M.: DNA Fingerprinting of *Campylobacter fetus* Using Cloned Constructs of Ribosomal RNA and Surface Array Protein Genes. Vet. Microbiol. 54: 185-193, 1997.
58. Devane, M.L., Nicol, C., Ball, A., Klena, J.D., Scholes, P., Hudson, J.A., Baker, M.G., Gilpin, B.J., Garrett, N., Savill, M.G. : The Occurrence of *Campylobacter* Subtypes in Environmental Reservoirs and Potential Transmission Routes. J. Appl. Microbiol. 98: 980-990, 2005.
59. Diker, K.S. : Studies on the Identification of *Campylobacter* Species Isolated from Sheep and Cattle. Doğa Bil. Derg. 9: 232-240, 1985.
60. Diker, K.S. : *Campylobacter* Türlerinin Çeşitli Hayvanlardan İzolasyonu ve Zoonotik Yönlerinin Değerlendirilmesi. Mikrobiol. Bült. 21: 268-273, 1987.
61. Diker, K.S. : In Vitro Susceptibility of *Campylobacters* Isolated from Poultry to Enrofloxacin and Ciprofloxacin. Acta. Gastroenterol. 56: 36, 1993.
62. Diker, S. Epidemiyoloji, A.Ü. Veteriner Fakóltesi Öęrenci Ders Notu, Ankara, sayfa no:107-113, 1994.
63. Dilmeç F, Matur, A., Alhan, E., Aksaray, N.: Çukurova Bölgesi Visseral *Leishmania* Etkenlerinde Total DNA Restriksiyon Endonükleaz Profilleri. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakóltesi Dergisi, 4(24): 158-164, 1999.

64. Dingle, K.E., Colles, F.M., Wareing, D.R.A., Ure, R., Fox, A.J., Bolton, F.E.: Multilocus Sequence Typing System for *Campylobacter jejuni*. J. Clin. Microbiol. 39: 14-23, 2001.
65. Doig, P., Yao, R., Burr, D.H., Guerry, P., Trust, T.J. : An Environmentally Regulated Pilus-Like Appendage Involved in *Campylobacter* Pathogenesis. Mol. Microbiol. 20: 885-894, 1996.
66. Doyle, L.P.: The Etiology of Swine Dysentery. Am. J. Vet. Res. 9: 50, 1948.
67. Duim, B., Wassenaar, T.M., Rigter, A. and Wagenaar, J.: High-Resolution Genotyping of *Campylobacter* Strains Isolated from Poultry and Humans with Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting. Appl. Env. Microbiol. 65(6): 2369-2375, 1999.
68. Duim, B. Godschalk, P.C.R., van den Braak, N., Dingle, K.E., Dijkstra, J.R., Leyde, E., van der Plas, J., Colles, F.M., Endtz, H.P., Wagenaar, J.A., Maiden, M.C.J., van Belkum, A.: Molecular Evidence for Dissemination of Unique *C. jejuni* Clones in Curacao, Netherlands Antilles. J. Clin. Microbiol. 41(12): 5593-5597, 2003.
69. Durmaz, R. : Moleküler Epidemiyoloji Neden Gerekli, Başlarken Nelere Dikkat Edilmelidir? 3. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara, Sayfa:52-59, 2004.
70. Durmaz, R.: Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Nobel Tıp Kitap Evleri. 149-160, 2001.
71. Elmalı, M.: Presence of *C. jejuni* in carcass and ground meat marketed in Bitlis. <http://veteriner.istanbul.edu.tr/vetfakdergi/yayinlar/2004-2/makale-1.pdf>. Erişim Tarihi: 20.01.2011.
72. Endtz, H. P., Ang, C.W., van den Braak, N., Duim, B., Rigter, A., Price, L.J., Woodward, D.L., Rodgers, F.G., Johnson, W.M., Wagenaar, A.J., Jacobs, B.C., Verbrugh, H.A., van Belkum, A.: Molecular Characterization of *C. jejuni* from Patients with Guillain-Barre´ and Miller Fisher Syndromes. J. Clin. Microbiol. 38( 6 ): 2297-2301, 2000.
73. Endtz, H.P., Ruijs, G.J., Van Klingerren, B., Jansen, W.H., Van Der Reyden, T., Mouton, R.P. : Quinolone Resistance in *Campylobacter* Isolated from Man and

- Poultry Following the Introduction of Fluoroquinolones in Veterinary Medicine. *J. Antimicrob. Chemother.* 27: 199-208, 1991.
74. Ertas, H.B., Ozbey, G., Kilic, A., Muz, A. : Isolation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from the Gall Bladder Samples of Sheep and Identification by Polymerase Chain Reaction. *J. Vet. Med. B.* 50: 294-297, 2003.
75. Ertaş, H. B., Çetinkaya, B., Muz, A., Öngör, H.: Tavuk Orijinli *C. coli* ve *C. jejuni*'nin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile İdentifikasyonu. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 26: 1447-1452, 2002.
76. Eastwood, K., Schuster, H., Gascoyne-Binzi, D. : Comparison of real-time PCR and direct culture for the detection of *Campylobacter* spp. from human faecal samples. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 17th. Eur. Con. Clin. Microbiol. Infect. Dis. ICC, Munich, Germany: Abstract number: 17339, 2007.
77. Fayos, A., Owen, R.J., Desai, M., Hernandez, J. : Ribosomal RNA Gene Restriction Fragment Diversity amongst Lior Biotypes and Penner Serotypes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 74: 87-93, 1992.
78. Fields, P.I., Swerdlow, D.L. : *Campylobacter jejuni*. *Clin. Lab. Med.* 19: 489-504, 1999.
79. Fitzgerald, C., Helsel, L.O., Nicholson, M.A., Olsen, S.J., Swerdlow, D.L., Flahart, R., Sexton, J., Fields, P.I.: Evaluation of Methods for Subtyping *Campylobacter jejuni* during an Outbreak Involving a Food Handler. *J. Clin. Microbiol.* 39(7): 2386-2390, 2001.
80. Fitzgerald, C., Owen, R.J., Stanley, J. : Comprehensive Ribotyping Scheme for Heat-Stable Serotypes of *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 34: 265-269, 1996.
81. Fitzgerald, C., Stanley, K., Andrew, S., Jones, K. : Use of Pulsed Field Gel Electrophoresis and Flagellin Gene Typing in Identifying Clonal Groups of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Farm and Clin. Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1429-1436, 2001.

82. Florin, I., Antillon, F. : Production of Enterotoxin and Cytotoxin in *Campylobacter jejuni* Strains Isolated in Costa Rica. J. Med. Microbiol. 37: 22-29, 1992.
83. Fouts, D. E.: Major Structural Differences and Novel Potential Virulence Mechanisms from the Genomes of Multiple *Campylobacter* Species. Plos Biol. 3(1): 15, 2005.([www.plosbiology.org](http://www.plosbiology.org) 20.12.2011)
84. Fred, G., Abril, M., Billon, D., Tigne, Y., et al.: Diarrhoea-causing agents in children aged less than five in Tunja, Colombia Rev. Salud pública. 8, 2006.
85. Friedman, C.R., Neimann, J., Wegener, H.C., Tauxe, R.V. : Epidemiology of *Campylobacter jejuni* Infections in the United States and Other Industrialized Nations. In: *Campylobacter*, 2nd edition. I. Nachamking ve M.J. Blaser (Editörler). ASM Press, Washington, D.C. p:121-138, 2000.
86. Frost, J.A., Oza, A.N., Thwaites, R.T., Rowe, B.: Serotyping Scheme for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Based on Direct Agglutination of Heat-Stable Antigens. J. Clin. Microbiol. 36 (2): 335-339, 1998.
87. Fujimoto, S., Umene, K., Saito, M., Horikawa, K., Blaser, M.J.: Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Using Random Chromosomal Gene Probes for Epidemiological Analysis of *Campylobacter jejuni* Infections. J. Clin Microbiol.38(4), 1664-1667, 2000.
88. Garcia, M.M., Lior, H., Stewart, R.B., Ruckerbauer, G.M., Trudel, J.R., Skljarevski, A. : Isolation, Characterization, and Serotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Slaughter Cattle. Appl. Environ. Microbiol. 49: 667-672, 1985.
89. Giacoboni, G.I., Itoh, K., Hirayama, K., Takahashi, E., Mitsuoka, T.: Comparison of Fecal *Campylobacter* in Calves and Cattle of Different Ages and Areas in Japan. J. Vet. Med. Sci. 55: 555-559, 1993.
90. Gibson, J.R., Fitzgerald, C., Owen, R.J. : Comparison of PFGE, Ribotyping and Phage- Typing in the Epidemiological Analysis of *Campylobacter jejuni* Serotype HS2 Infections. Epidemiol. Infect. 115: 215-225, 1995.
91. Gibson, J. R., Sutherland, K. and Owen, R. J.: Inhibition of DNase activity in PFGE analysis of DNA from *Campylobacter jejuni*. Lett. Appl. Microbiol. 19: 357-358, 1994.

92. Gibson, J.R.: Use of amplified fragment length polymorphism technique to fingerprint and differentiate isolated *Helicobacter pylori*. J. Clin Microbiol. 36: 2580-2585, 1998.
93. Gilbert, M., Godschalk, P.C. R., Karwaski, M.F., Ang, C. W., van Belkum, A., Li, J., Wakarchuk, W. W. and Endtz, H. P.: Evidence for Acquisition of the Lipooligosaccharide Biosynthesis Locus in *Campylobacter jejuni* GB11, a Strain Isolated from a Patient with Guillain-Barre' Syndrome, by Horizontal Exchange. Inf. Immun. 72 ( 2 ): 1162-1165, 2004.
94. Gisendorf, B.A.J., Van Belkum, A., Koeken, A., Stegeman, H., Henkens, M.H.C., Van Der Plas, J., Goossens, H., Niester, H.G.M., Quint, W.G.V.: Development of Species-Specific DNA Probes for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lari* by Polymerase Chain Reaction Fingerprinting. J. Clin. Microbiol. 31: 1541-1546, 1993.
95. Godschalk, P.C.R. Heikema, A.P., Gilbert, M., Komagamine, T., Ang, C.W., Glerum, J., Brochu, D., Li, J., Yuki, N., Jacobs, B.C., van Belkum, A., Endtz, H.P.:The crucial role of *Campylobacter jejuni* genes in anti-ganglioside antibody induction in Guillain-Barré syndrome. The J. Clin. Investigation (<http://www.jci.org>)114: 11, 2004.
96. Godschalk, P.C.R.: Identification of DNA sequence variation in *Campylobacter jejuni* strains associated with the Guillain-Barré syndrome by high-throughput AFLP analysis. BMC Microbiol.6: 32, 2006.
97. Gonzalez, I., Grant, K.A., Richardson, P.T., Park, S.F. and Collins, M.D.: Specific Identification of the Enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by Using a PCR Test Based on the *ceuE* Gene Encoding a Putative Virulence Determinant. J. Clin. Microbiol. 35(3): 759-763, 1997.
98. Goossens, H., Butzler, J.P. : Isolation and Identification of *Campylobacter* spp. I. Nachamkin, MJ Blaser ve LS Tompkins (Editörler). *Campylobacter jejuni*: Current Status and Future Trends. ASM Press, Washington, D.C. Sayfa:93, 1992.
99. Grau, F.H. :. *Campylobacter jejuni/coli*. In: Foodborne Microorganisms of Public Health Significance, 4th edn. KA Buckle (Editör). AIFST (NSW Branch): Food Microbiology Group. Sayfa:136-151, 1991.

100. Guerrant, R.L., Wanke, C.A., Pennie, R.A., Barrett, L.J., Lima, A.A.M., O'Brien, A.D. : Production of a Unique Cytotoxin by *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 55: 2526- 2530, 1987.
101. Gun, M., Rennie, J.R.P., Thornley, J., Richardson, H.H.R., Hodge, D., Lynch, J.: Laboratory and clinical evaluation of media for *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 25: 2274-2277, 1987.
102. Gülmez, M. ve Güven, A.: Beyaz ve Çeçil peynirlerde *Campylobacter*, *Salmonella* ve *Listeria* türlerinin araştırılması. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Dergisi* 7(2): 155-161, 2001.
103. Gültekin, A., Gökalp, A., Bakıcı, M.Z., Oğuz, A., Sağnak, G.: Sivas yöresinde ishal etkenleri. *İnfek. Derg.* 1: 239-246, 1987.
104. Hanninen, M.L., Hakkinen, M., Rautelin, H: Stability of Related Human and Chicken *Campylobacter jejuni* Genotypes after Passage through Chick Intestine Studied by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(5): 2272-2275, 1999.
105. Hanninen, M.L., Hänninen, M.L., Perko-Mäkelä, P., Pitkälä, A., Rautelin, H.: A Three-Year Study of *C. jejuni* Genotypes Humans with Domestically Acquired Infections and in Chicken Samples from the Helsinki Area. *J. Clin. Microbiol.* 38(5), 1998-2000, 2000.
106. Hanninen, M.L., Makela, P. P., Rautelin, H., Duim, B., Wagenaar, J. A.: Genomic Relatedness within Five Common Finnish *C. jejuni* Pulsed-Field Gel Electrophoresis Genotypes Studied by Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis, Ribotyping, and Serotyping. *App. Environ. Microbiol.* 67(4), 1581-1586, 2001.
107. Hanninen, M.L., Haajanen, H., Pummi, T., Wermundsen, K., Katila, M.L., Sarkkinen, H., Miettinen, I., Rautelin, H. Detection and Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and Analysis of Indicator Organisms in Three Waterborne Outbreaks in Finland. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(3): 1391-1396, 2003.
108. Hansson, I.: Bacteriological and Epidemiological Studies of *Campylobacter* spp. in Swedish Broilers. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2007.



109. Hani, E. K. and Chan, V. L.: Expression and Characterization of *C. jejuni* Benzoylglycine Amidohydrolase (Hippuricase) Gene in *Escherichia coli*. American Society for Microbiol. J. Bacteriol. 177(9): 2396-2402, 1995
110. Harvey, R.B., Droleskey, R.E., Sheffield, C.L., Edrington, T.S., Callaway, T.R., Anderson, R.C., Drinnon, D.L., Ziprin, R.L., Scott, H.M., Nisbet, D.J. : *Campylobacter* Prevalence in Lactating Dairy Cows in the United States. J. Food Prot. 67: 1476-1479, 2004.
111. Hazeleger, W.C., Beumer, R.R., Rombouts, F.M. : The Use of Latex Agglutination Tests for Determining *Campylobacter* Species. Lett. Appl. Microbiol. 14: 181-184, 1992.
112. Hernandez, J., Fayos, A., Alonso, J.L., Owen, R.J. : Ribotypes and AP-PCR Fingerprints of Thermophilic *Campylobacters* from Marine Recreational Waters. J. Appl. Bacteriol. 80: 157-164, 1996.
113. Hernandez, J., Fayos, A., Ferrus, M.A., Owen, R.J. : Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* Isolated from Human Faeces, Seawater and Poultry Products. Res. Microbiol. 146: 685-696, 1995.
114. Hickey, T.E., Baqar, S., Bourgeois, A.L., Ewing, C.P., Guerry, P.: *Campylobacter jejuni*- Stimulated Secretion of Interleukin-8 by INT407 Cells. Infect. Immun. 67: 88-93, 1999.
115. Hoar, B.R., Atwill, E.R., Elmi, C., Utterback, W.W., Edmondson, A.J.: Comparison of Fecal Samples Collected Per Rectum and off the Ground for Estimation of Environmental Contamination Attributable to Beef Cattle. Am. J. Vet. Res. 60: 1352-1356, 1999.
116. Hoge, C.W., Gambel, J.M., Srijan, A., Pitarangsi, C., Echeverria, P. : Trends in Antibiotic Resistance among Diarrheal Pathogens Isolated in Thailand over 15 years. Clin. Infect. Dis. 26: 341-345, 1998.
117. Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.
118. Hong, Y., Berrang, M.E., Liu, T., Hofacre, C.L., Sanchez, S., Wang, L., Maurer, J.J. : Rapid Detection of *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, and *Salmonella*

- enterica* on Poultry Carcasses by Using PCR Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3492-3499, 2003.
119. Hooper, D.C. : Clinical Applications of Quinolones. *Biochim. Biophys. Acta.* 1400: 45-61, 1998.
120. Hooper, D.C. : Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance. *Drug Resist. Updates* 2: 38-55, 1999.
121. Hopkins, K. L. et al. Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism Genotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Strains and Its Relationship with Host Specificity, Serotyping, and Phage Typing. *J. Clin. Microbiol.* 42(1): 229-235, 2004.
122. Houg, H.S., Sethabutr, O., Nirdnoy, W., Katz, D.E., Pang, L.W.: Development of a *ceuE*-based multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for direct detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Thailand. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 40(1-2): 11-9, 2001.
123. Hutchison, M.L., Walters, L.D., Avery, S.M., Munro, F., Moore, A. : Analyses of Livestock Production, Waste Storage, and Pathogen Levels and Prevalences in Farm Manures. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1231-1236, 2005.
124. Hutchinson, D.N., Bolton, F.J. : Improved blood free selective medium for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faecal specimens. *J. Clin. Pathol.* 37: 956-957, 1984.
125. Jin, S., Song, Y.C., Emili, A., Sherman, P.M., Chan, V.L. : *JlpA* of *Campylobacter jejuni* interacts with surface-exposed heat shock protein 90alpha and triggers signalling pathways leading to the activation of NF-kappaB and p38 MAP kinase in epithelial cells. *Cell Microbiol.* 5: 165-174, 2003.
126. Johnson, W.M., Lior, H. : A New Heat-Labile Cytolethal Distending Toxin (CLDT) Produced by *Campylobacter* spp. *Microbiol. Path.* 4: 115-126, 1988.
127. Jones, F.S., Orcutt, M., Little, R.B. : Vibriosis (*Vibrio jejuni*, n. Sp.) Associated with Intestinal Disorders of Cows and Calves. *J. Exp. Med.* 53: 853, 1931.
128. Kaldor, J., Speed, B.R. : Guillain-Barré Syndrome and *Campylobacter jejuni*: a Serological Study. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)*. 288: 1867-1870, 1984.

129. Karmali, M.A., Simor, A.E., Roscoe, M., Fleming, P.C., Smith, S.S., Lane, J. : Evaluation of a Blood-Free, Charcoal-Based, Selective Medium for the Isolation of *Campylobacter* Organisms from Feces. *J. Clin. Microbiol.* 23: 456-459, 1986.
130. Kendell, E.J., Tanner, E.I. : *Campylobacter* enteritis in general practice. *J. Hyg.* 88: 155-63, 1982.
131. Ketley, J.M.: Pathogenesis of Enteric Infection by *Campylobacter*. *Microbiol.* 143: 5-21, 1997.
132. Ketley, M.J., Konkel, M.E.: *Campylobacter* Molecular and Cellular Biology. 1th ed Norfolk: Horizon Bioscience, 2005.
133. Khakhria, R., Lior, H. : Extended phage-typing scheme for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Epidemiol. Infect.* 108: 403-414, 1992.
134. Kinana, A.D. Cardinale, E.; Tall, F.; Bahsoun, I.; Sire, J.M.; Garin, B.; Breurec, S.: Genetic Diversity and Quinolone Resistance in *Campylobacter jejuni* Isolates from Poultry in Senegal. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(5): 3309-3313, 2006.
135. King, E.O.: Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related vibrio. *J. Infect. Dis.* 101: 119-128, 1957.
136. King, V. and Clayton, C. L.: Genomic investigation of phenotypic variation in *Campylobacter jejuni* flagellin. *FEMS Microbiol. Lett.* 84: 107- 112, 1991.
137. Kita, E., Oku, D., Hammuro, A., Nishikawa, F., Emoto, M., Yagyu, Y., Katsui, N., Kashiba, S. : Hepatotoxic Activity of *Campylobacter jejuni*. *J. Med. Microbiol.* 33: 171-183, 1990.
138. Klein, E.J., Boster, D.R., Stapp, J.R., Wells, J.G., et al.: Diarrhea Etiology in a Children's Hospital Emergency Department: A Prospective Cohort Study. *Clin. Infect. Dis.* 43: 807-813, 2006.
139. Kokotovic, B., On, S.L.W.: High-resolution genomic fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by analysis of amplified fragment length polymorphisms. *Fems Microbiol. Lett.* 173 (1): 77-84, 1999.
140. Konkel, M.E., Cieplak, W. : Altered Synthetic Response of *Campylobacter jejuni* to Cocultivation with Human Epithelial Cells is Associated with Enhanced Internalization. *Infect. Immun.* 60: 4945-4949, 1992.

141. Konkel, M.E., Garvis, S.G., Tipton, S.L., Erson, D.E., Cieplak, W.: Identification and Molecular Cloning of a Gene Encoding a Fibronectin Binding Protein (*CadF*) from *Campylobacter jejuni*. *Mol. Microbiol.* 24: 953-963, 1997.
142. Köksal, F.: Moleküler biyolojik tiplendirme yöntemlerinin hastane infeksiyonlarında kullanımı. *Hastane infeksiyonları dergisi.* 3: 189-195, 1999.
143. Kramer, J.M., Frost, J.A., Bolton, F.J., Wareing, D.R.: *Campylobacter* Contamination of Raw Meat and Poultry at Retail Sale Identification of Multiple Types and Comparison with Isolates from Human Infection. *J. Food Prot.* 63: 1654-1659, 2000.
144. Kulkarni, S.P., Lever, S., Logan, J. M .J., Lawson, A.J., Stanley, J., Shafi, M.S.: Detection of *Campylobacter* species: a comparison of culture and polymerase chain reaction based methods *J. Clin.Pathol.* 55: 749-753, 2002.
145. Ladron de Guevara, C., Perez-Pomata M.T., Agulla, A., Merino, F.J., Villasante, P.A., Velasco, A.C.: Recovery of *Campylobacter* from Human Faeces Stored at 4 Degrees C. *Epidemiol. Infect.* 102: 281-285, 1989.
146. Larkin, C., Van Donkersgoed, C., Mahdi, A., Johnson, P., McNab, B., Odumeru, J. : Antibiotic Resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolated from Hog, Beef, and Chicken Carcass Samples from Provincially Inspected Abattoirs in Ontario. *J. Food Prot.* 69: 22-26, 2006.
147. Lastovica, A.J.: Molecular Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Clin. Microbiol.* 41(3): 1349-1350, 2003.
148. Lawson, A.J., Shafi, M.S., Pathak, K., Stanley, J.: Detection of *Campylobacter* in gastroenteritis : comparison of direct PCR assay of faecal samples with selective culture. *Epidemiol. Infect.* 121: 547-553, 1998.
149. Lazou, T., Soultos, N., Hatzopoulou, E.B., Lossifidou, E.: Prevalence Of *Campylobacter* spp. In Sheep And Goats At The Abattoir In Northern Greece ([http://www.foodmicro2008.org/fm08/resources/374/1143/pdf/FM2008\\_0427.pdf](http://www.foodmicro2008.org/fm08/resources/374/1143/pdf/FM2008_0427.pdf) Erişim Tarihi: 20.01.2011).
150. Lee, L. H., Burg, E., Baqar, S., Bourgeois, A. L., Burr, D. H., Ewing, C. P., Trust, T. J. and Guerry, P.: Evaluation of a Truncated Recombinant Flagellin Subunit Vaccine against *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 67(11): 5799-5805, 1999.

151. Lin, J., Sahin, O., Michel, L.O., Zhang, Q. : Critical role of multidrug efflux pump CmeABC in bile resistance and in vivo colonization of *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 71 (8): 4250-4300, 2003.
152. Lin, J., Cagliero, C., Baoqing, G., Yi-Wen, B., Marie-Christine, M., Sophie P., and Qijing Z.: Bile Salts Modulate Expression of the CmeABC Multidrug Efflux Pump in *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.*: 187(21): 7417-7424, 2005.
153. Linton, D., Lawson, A. J., Owen, R. J. and Stanley, J. : PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2568-2572, 1997.
154. Lior, H., Woodward, D.L., Edgar, J.A., Laroche, L.J., Gill, P.: Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. *J. Clin. Microbiol.* 15: 761-768, 1982.
155. Logan, J.M., Burnens, A., Linton, D., Lawson, A.J., Stanley, J.: *Campylobacter lanienae* a New Species Isolated from Workers in an Abattoir. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2: 865-872, 2000.
156. Madden, R.H., Moran, L., Scates, P.: Frequency of Occurrence of *Campylobacter* spp. in Red Meats and Poultry in Northern Ireland and Their Subsequent Subtyping Using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism and the Random Amplified Polymorphic DNA Method. *J. Appl. Microbiol.* 84: 703-708, 1998.
157. Mannering, S.A., West, D.M., Fenwick, S.G., Marchant, R.M., O'connell, K.: Pulsed-Field Gel Electrophoresis of *Campylobacter jejuni* Sheep Abortion Isolates. *Vet. Microbiol.* 115: 237-242, 2006.
158. Manser, P.A., Dalziel, R.W.: A Survey of *Campylobacter* in Animals. *J. Hyg. (Lond).* 95: 15-21, 1985.
159. Maslow, J.N., Slutsky A.M., Arbeit, R.D.: Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ. *Diagnostic Molecular Microbiol.: Principles and applications.* ASM, Washington D.C.563-572, 1993.

160. Matsuda, M.: Characterization of Urease-Positive Thermophilic *Campylobacter* Subspecies by Multilocus Enzyme Electrophoresis Typing. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(6): 3308-3310, 2003.
161. McFadyean, J., Stockman, S.: Report of the Departmental Committee appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to inquire into Epizootic Abortion. III. Abortion in Sheep London: HMSO, 1913.
162. McSweegan, E., Walker, R.I. : Identification and Characterization of Two *Campylobacter jejuni* Adhesins for Cellular and Mucous Substrates. *Infect. Immun.* 53: 141-148, 1986.
163. Miller, G., Dunn, M.: Does age acquired immunity confer selective protection to common serotypes of *Campylobacter jejuni*. *BMC Infect. Dis.* 5: 66, 2005.
164. Miller, W.G., Bates, A.H., Horn, S.T., Brandl, M.T., Wachtel, M.R. and Mandrell, R.E.: Detection on Surfaces and in Caco-2 Cells of *Campylobacter jejuni* Cells Transformed with New gfp, yfp, and cfp Marker Plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(12): 5426-5436, 2000.
165. Mills, S.D. Mills, S. D., Bradbury, W. C. and Penner, J. L. : Basis for Serological Heterogeneity of Thermostable Antigens of *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.*50(1): 284-291, 1985.
166. Misawa, N., Kawashima, K., Kawamoto, H., Kondo, F. : Development of a Combined Filtration-Enrichment Culture Followed by a One-Step Duplex PCR Technique for the Rapid Detection of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in Human Faecal Samples. *J. Med. Microbiol.* 51: 86-89, 2002.
167. Mohran, Z. S. P., Guerry, H. Lior, J. R. Murphy, A. M. El-Gendy, M. M. Mikhail, and Oyofu, B. A. : Restriction fragment length polymorphism of flagellin genes of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolated from Egypt. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1216–1219, 1996.
168. Mohran, Z. S., Arthur, R.R. , Oyofu, B. A. , Peruski, L. F. , Wasfy, M. O., Ismail, T. F. and Murphy, J. R.: Differentiation of *Campylobacter* Isolates on the Basis of Sensitivity to Boiling in Water as Measured by PCR-Detectable DNA. *Appl. Environ. Microbiol.*64(1): 363-365, 1998.

169. Monteville, M.R., Yoon, J.E., Konkel M.E. : Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization. *Microbiol.*149: 153-165 , 2003.
170. Moore, J.E., Corcoran, D., Dooley, J.S., Fanning, S., Lucey, B., Matsuda, M., McDowell, D.A., Megraud, F., Millar, B.C., O'Mahony, R., O'Riordan, L., O'Rourke, M., Rao, J.R., Rooney, P.J., Sails, A., Whyte, P. : *Campylobacter*. *Vet. Res.* 36: 351-382, 2005.
171. Moore, J.E., Madden, R.H. : Occurrence of Thermophilic *Campylobacter* spp. in Porcine Liver in Northern Ireland. *J. Food Prot.* 61: 409-413, 1998.
172. Moore, J.E., Madden, R.H. : Comparison of Eight Phenotypic Methods for Subspecies Characterization of Thermophilic *Campylobacter* spp. Isolated from Pig Liver. *J. Food Prot.* 66: 1079-1084, 2003.
173. Moore, J.E., Matsuda, M. : The History of *Campylobacter*: Taxonomy and Nomenclature. *Irish Vet. J.* 10: 495-501, 2002.
174. Moore, J.E., O'Riordan, L., Wareing, D.R., Doyle, R., Lanser, J., Stanley, T., Matsuda, M., Matsui, T., Murphy, P.G. : Phenotypic and Genotypic Relationship between *Campylobacter* spp Isolated from Humans and Chickens in Northern Ireland-A Comparison of Three Phenotyping and Two Genotyping Schemes. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 206: 211-216, 2003.
175. Moore, M.A., Blaser, M.J., Perez-Perez, G.I., O'Brien, A.D. : Production of a Shiga-Like Cytotoxin by *Campylobacter*. *Microbiol. Path.* 4: 455-462, 1988.
176. Morgan, D., Gunneberg, C., Gunnell, D., Healing, T.D., Lamerton, S., Soltanpoor, N., Lewis, D.A., White, D.G. :. An Outbreak of *Campylobacter* Infection Associated with the Consumption of Unpasteurised Milk at a Large Festival in England. *Eur. J. Epidemiol.*10: 581-585, 1994.
177. Murinda, S.E., Nguyen, L.T., Oliver, S.P. : Problems in Isolation of *Campylobacter jejuni* from Frozen-Stored Raw Milk and Bovine Fecal Samples: Genetic Confirmation Using Multiplex PCR. *Foodborne Path. Dis.* 1: 166-171, 2004.
178. Muz, A., Ozcan, C., Gurcay, M., Angin, M. : Investigation on Aerobic, Anaerobic and Microaerophilic Bacteria in the Gall Bladders of Sheep and

- Cattle Slaughtered in Meat and Fish Organization in Elazig. F. U. Sag. Bil. Derg. 6: 98-104, 1992.
179. Nachamkin, I.: *Campylobacter* and Arcobacter. In: Manual of Clinical Microbiol.. PR Murry, EJ Baron ve MA pfaller (Editörler). ASM Press, Washington, D. C. Sayfa:483, 1995.
180. Nachamkin, I., Barbagallo, S. : Culture Confirmation of *Campylobacter* spp. by Latex Agglutination. J. Clin. Microbiol. 28: 817-818, 1990.
181. Nachamkin, I., Allos, M.B., Ho, T.: *Campylobacter* Species and Guillain-Barré Syndrome. Clin. Microbiol. Rev. 11: 555-567, 1998.
182. Nachamkin, I., Ung, H., Patton, C.M. :Analysis of HL and O Serotypes of *Campylobacter* Strains by the Flagellin Gene Typing System. J. Clin. Microbiol. 34: 277-281, 1996.
183. Nachamkin, I., Bohachick, K. and Patton, C. M.: Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. J. Clin. Microbiol. 31: 1531-1536, 1993.
184. Nachamkin, I., Panaro, N.J., Li, M., Ung, H., Yuen, P., Kricka, L.J., and Wilding, P.: Agilent 2100 Bioanalyzer for Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *Campylobacter jejuni* Flagellin Gene. J. Clin. Microbiol. 39(2): 754-757, 2001.
185. Nair, S.: M. Genotyping characterization of *Salmonella typhi* by amplified fragment lenght polymorphizim provides increased discrimination as compared to PFGE and ribotyping. J. Microbiol. Method; 41: 35-43, 2000.
186. Ng, L.K., Stiles, M.E., Taylor, D.E. : Inhibition of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by Antibiotics Used in Selective Growth Media. J. Clin. Microbiol. 22: 510-514, 1985.
187. Nielsen, E.M.: Occurrence and Strain Diversity of Thermophilic *Campylobacters* in Cattle of Different Age Groups in Dairy Herds. Lett. Appl. Microbiol. 35: 85-89, 2002.
188. Nielsen, E.M., Engberg, J., Fusing, V., Petersen, L., Brogren, C.H., On, S.L.: Evaluation of Phenotypic and Genotypic Methods for Subtyping *Campylobacter jejuni* Isolates from Humans, Poultry, and Cattle. J. Clin. Microbiol. 38: 3800-3810, 2000.



189. Nishimura, M., Nukina, M., Yuan, J. M., Shen, B. Q., Ma J. J., Ohta, M., Saida, T. and Uchiyama, T.: PCR-based restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis and serotyping of *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheic patients in China and Japan. FEMS Microbiol. Lett. 142: 133-138, 1996.
190. Olesen, B., Neimann, J., Bottiger, B., et al.: Etiology of Diarrhea in Young Children in Denmark: a Case-Control Stud. J. Clin. Microbiol. 8: 3636–3641, 2005.
191. Olive, D.M., Bean, P. : Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. J. Clin. Microbiol. 37: 1661-1669, 1999.
192. On, S.L.W. :Identification Methods for *Campylobacters*, *Helicobacters*, and Related Organisms. Clin. Microbiol. Rev. 9: 405-422, 1996.
193. On, S.L.W.: Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol. 90: 1-115, 2001.
194. On, S.L.W., Nielsen, E.M., Engberg, J., Madsen, M.: Validity of SmaI-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by SallI, KpnI, and BamHI polymorphisms:evidence of identical clones infecting humans, poultry, and cattle. S. Epidemiol. Infect. 120: 231-237, 1998.
195. On, S.L. W. and Jordan, P. J.; Evaluation of 11 PCR Assays for Species-Level Identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J. Clin. Microbiol; 41(1): 330–336, 2003.
196. Ono, K., Yamamoto, K. :Contamination of Meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama, Japan. Int. J. Food Microbiol. 47: 211-219, 1999.
197. Owen, R.J., Fitzgerald, C., Sutherland, K., Borman, P. : Flagellin Gene Polymorphism Analysis of *Campylobacter jejuni* Infecting Man and Other Hosts and Comparison with Biotyping and Somatic Antigen Serotyping. Epidemiol. Infect. 113: 221-234, 1994.
198. Owen, R. J., Fayos, A., Hernandez, J. and Lastovica, A. : PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis of DNA sequence diversity of flagellin genes of *Campylobacter jejuni* and allied species. Mol. Cell. Probes 7: 471-480, 1993.

199. Owen, R. J., Sutherland, K., Fitzgerald, C., Gibson, J., Borman, P., Stanley, J.: Molecular Subtyping Scheme for Serotypes HS1 and HS4 of *Campylobacter jejuni*. J. Clin. Microbiol., 33(4): 872-877, 1995.
200. Oyofe, B.A., Thornton, S.A., Burr, D.H., Trust, T.J., Pavlovskis, O.R., Guerry, P.: Specific Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by Using Polymerase Chain Reaction. J. Clin. Microbiol. 30: 2613-2619, 1992.
201. Öngen, B.: Türkiye'de ishal etkenleri. ANKEM Derg. 21(1): 37-41, 2007.
202. Öngen, B., Nazik, H., Kaya, I.: Rutin dışı kültürlerinde üretilen *Campylobacter* türleri ve Antibiyotik Duyarlılıkları: 5 Yıllık Sonuçların Değerlendirilmesi. Ankem dergisi. 21(1): 37-41, 2007.
203. Örmeci, E. ve Özdemir, H.: Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi. 05(1): 1-16, 2007.
204. Özen, N., Kaleli, İ., Şengül, M., Akşit, F.: Akut gastroenteritli olgularda *Campylobacter* sıklığının araştırılması. Mikrobiyol. Bülte; 33: 89-98, 1999.
205. Özkan, F. ve Günhan, C. Gastro-enteritlerin *Campylobacter* türleri yönünden incelenmesi. İnfek. Derg. 8: 27-30, 1994.
206. Öztürk, R., Midilli, K., Okyay, K.: Çocuk ve erişkin yaş grubu sürgün olgularında *Campylobacter jejuni* ve sıklığının araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg; 24: 42-5, 1994.
207. Park, S.F.: The use of hipO, encoding benzoylglucine amidohydrolase (hippuricase), as a reporter of gene expression in *Campylobacter coli*. Lett, Appl. Microbiol. 28: 285, 1999.
208. Payne, R. E. : Molecular Epidemiology of *Campylobacter jejuni* in Broiler Flocks Using Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR and 23S rRNA-PCR and Role of Litter in Its Transmission. Appl. Environ. Microbiol. 65(1): 260-263, 1999.
209. Pei, Z., Buruoa, C., Grignon, B., Baqar, S., Huang, X.Z., Kopecko, D.J., Bourgeois, A.L., Fauchere, J.L., Blaser, M.J.: Mutation in the peb1A Locus of *Campylobacter jejuni* Reduces Interactions with Epithelial Cells and Intestinal Colonization of Mice. Infect. Immun. 66: 938-943, 1998.

210. Pei, Z., Ellison, R.T., Blaser, M.J. : Identification, Purification and Characterization of Major Antigenic Proteins of *Campylobacter jejuni*. J. Biol. Chem. 266: 16363-16369, 1991.
211. Penner, J.L., Hennessy, J.N.: Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens. J. Clin. Microbiol. 12: 732-737, 1980.
212. Peres, S.Y., Marches, O., Daigle, F., Nougayrede, J.P., Herault, F., Tasco, C., DeRycke, J., Oswald, E.: A New Cytolethal Distending Toxin (CDT) from *Escherichia coli* Producing CNF2 Blocks HeLa Cell Division in G2/M Phase. Mol. Microbiol. 24: 1095-1107, 1997.
213. Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C., Thomas, J.W.: Principles and applications. Diagnostic Mol. Microbiol. ASM, Washington D.C. 1993.
214. Petersen, L., Nielsen, E.M., Engberg, J., On, S.L., Dietz, H.H. : Comparison of Genotypes and Serotypes of *Campylobacter jejuni* Isolated from Danish Wild Mammals and Birds and from Broiler Flocks and Humans. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3115-3121, 2001.
215. Pitt, T.L.: Bacterial Typing Systems: The Way Ahead. J. Med. Microbiol. 4: 1-2, 1994.
216. Priest, F., Austin, B. : Modern Bacterial Taxonomy, 2nd ed. Chapman & Hall, London, 1993.
217. Polat, E.: Akut ishallerde *C. jejuni* ve diger etyolojik ajanların hızlı tanısında moleküler yöntemlerin değeri. Uzmanlık tezi. Adana, 2008.
218. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B., Carter, G.B. : Moby-Year Europa Limited, Graphos-Spain, Clin. Vet. Microbiol. 1994.
219. Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J., Leonard, F.C.: Veterinary Microbiology and Microbial Diseases. Blackwell Science Ltd, Oxford, 2002.
220. Ragimbeau C., Salvat, G, Colin, P, Ermel, G.: Development of a multiplex PCR gene fingerprinting method using *gyrA* and *pflA* polymorphisms to identify genotypic relatedness within *Campylobacter jejuni* species. J. Appl. Microbiol, 85(5), 829-838, 1998.

221. Ralp, D., McClelland, M. : Arbitrarily primed PCR methods for studying bacterial diseases. In: N. Woodford, P. Johnson (eds). *Methods in Molecular Medicine, Vol:15: Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications*. Humana Pres Inc, N.J Totowa 60-75, 1998.
222. Ribot, E. M. , Fitzgerald, C. , Kubota, K. , Swaminathan, B. and Barrett, T. J.: Rapid Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocol for Subtyping of *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 39(5): 1889-1894, 2001.
223. Ribeiro, C.D., Thomas, M.T., Kembrey, D., Magee, J.T., North, Z.: Resistotyping of *Campylobacters*: Fulfilling a Need. *Epidemiol. Infect.* 116: 169-175, 1996.
224. Rees, J.H., Soudain, S.E., Gregson, N.A., Hughes, R.A.C.: A prospective case control study to investigate the relationship between *Campylobacter jejuni* infection and Guillain-Barre syndrome. *N. Engl. J. Med.* 333: 1374-1379, 1995.
225. Robinson, D.A.: Infective Dose of *Campylobacter jejuni* in Milk. *Br. Med. J. Clin. Res. Ed.* 282: 1584, 1981.
226. Robinson, D.A.: *Campylobacter* Infection in Milking Herds. In: *Epidemiology, Pathogenesis and Biochemistry*. DG Newell (Editor). Lancaster: MTP Press. p:274, 1982.
227. Roop, R.M., Smibert, R.M., Johnson, J.L., Krieg, N.R. : Differential Characteristics of Catalase-Positive *Campylobacters* Correlated with DNA Homology Groups. *Can. J. Microbiol.* 30: 938-951, 1984.
228. Roop, R.M., Smibert, R.M., Johnson, J.L., Krieg, N.R. : DNA Homology Studies of the Catalase-Negative *Campylobacters* and "*Campylobacter fecalis*," an Emended Description of *Campylobacter sputorum*, and Proposal of the Neotype Strain of *Campylobacter sputorum*. *Can. J. Microbiol.* 31: 823-831, 1985.
229. Rosef, D., Gondrosen, B., Kapperud, G., Underdal, B. : Isolation and Characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Domestic and Wild Mammals in Norway. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 855-859, 1983.

230. Russell, R.G., Odonoghue, M., Blake Jr, D.C., Zulty, J., De Tolla, L.J. : Early Colonic Damage and Invasion of *Campylobacter jejuni* in Experimentally Challenged Infant *Macaca mulatta*. J. Infect. Dis. 168: 210-215, 1993.
231. Sails, A. D., Swaminathan, B. and Fields, P. I.: Clonal Complexes of *Campylobacter jejuni* Identified by Multilocus Sequence Typing Correlate with Strain Associations Identified by Multilocus Enzyme Electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 41(9): 4058-4067, 2003.
232. Salama, S.M., Tabor, H., Richter, M. and Taylor, D. E. : Pulsed-field gel electrophoresis for epidemiologic studies of *Campylobacter hyointestinalis* isolates. J. Clin. Microbiol. 30: 1982-1984, 1992.
233. Sam, W.I., Lyons, M.M., Waghorn, D.J. : Increasing Rates of Ciprofloxacin Resistant *Campylobacter*. J. Clin. Pathol. 51(6): 487, 1999.
234. Savaşan, S., Çiftçi, A., Diker, K.S. : Emergence of Quinolone Resistance among Chicken Isolates of *Campylobacter* in Turkey. Turk J. Vet. Anim. Sci. 28: 391-397, 2004.
235. Sebald, M., Veron, M. : Teneur en Bases de L'ADN et Classification de Vibrions. Ann de l'Inst Pasteur. 105: 897-910, 1963.
236. Scarlata, F., Titone, L., Li Vecchi, V., Arena, R., Bruno, A., Merlino, F., Di Bernardo, F. : *Campylobacter* enteritis in Western Sicily. Remarks on 35 cases. Infez Med. 12 (4): 239-44, 2004.
237. Schouls, L. M. Reulen, S. , Duim, B. , Wagenaar, J. A. , Willems, R. J.L. , Dingle, K.E. , Colles, F. M. , DA Van Embden, J.: Comparative Genotyping of *C. jejuni* by Amplified Fragment Length Polymorphism, Multilocus Sequence Typing, and Short Repeat Sequencing: Strain Diversity, Host Range, and Recombination. J. Clin. Microbiol. 41(1): 15- 26, 2003.
238. Shahnaz Tahihra Ai Rashid: The mode of ceii division and characterization of the *ftsZ* gene of *Campylobacter jejuni* ATCC43431. Master of Science Graduate Department of Medical Genetics and Microbioiogy University of Toronto, 1998.
239. Shi, F., Chen, Y.Y., Wassenaar, T.M., Woods, W. H., Coloe, P. J. and Benjamin N. Fry. Development and Application of a New Scheme for Typing *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by PCR-Based Restriction

- Fragment Length Polymorphism Analysis. *J. Clin. Microbiol.* 40(5), 1791-1797, 2002.
240. Skirrow, M.B. : *Campylobacter* Enteritis: a "New" Disease. *BMJ.* 2: 9-11, 1977.
241. Skirrow, M.B. : Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Bacteria. *J. Comp. Pathol.* 111: 113-149, 1994.
242. Skirrow, M.B., Benjamin, J.: Differentiation of Enteropathogenic *Campylobacter*. *J. Clin. Pathol.* 33: 1122, 1980.
243. Slater E.R, Owen R.J. Restriction fragment length polymorphism analysis shows that the hippuricase gene of *Campylobacter jejuni* is highly conserved. *Lett. Appl. Microbiol.* 25(4): 274-8, 1997.
244. Smibert, R.M.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2th Ed. USA: Springer, 145-1165, 2005.
245. Snelling, W.j., Matsuda, M., Moore, J.E.: Under the Microscope *Campylobacter*ler *jejuni*. *J. Appl. Microbiol.* 41: 297-302, 2005.
246. Sorvillo, F.J., Lieb, L.E., Waterman, S.H. : Incidence of *Campylobacteriosis* among Patients with AIDS in Los Angeles County. *J. Acquir. Immun. Defic. Syndr.* 4: 598-602, 1991.
247. Spangler, B.D. : Structure and Function of Cholera Toxin and the Related *E. coli* Heat-Labile Enterotoxin. *Microbiol. Rev.* 56: 622-647, 1992.
248. Speijer, H. : Application of different genotyping methods of *Pseudomonas aeruginosa* in a setting of endemicity in an intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3654-3661, 1999.
249. Stanley, K., Jones, K. : Cattle and Sheep Farms as Reservoirs of *Campylobacter*. *J. Appl. Microbiol.* 94: 104-113, 2003.
250. Stanley, K.N., Wallace, J.S., Currie, J.E., Diggle, P.J., Jones, K. : Seasonal Variation of Thermophilic *Campylobacters* in Lambs at Slaughter. *J. Appl. Microbiol.* 84: 1111-1116, 1998.
251. Stanley, K.N., Wallace, J.S., Currie, J.E., Diggle, P.J., Jones, K. : The Seasonal Variation of Thermophilic *Campylobacters* in Beef Cattle, Dairy Cattle and Calves. *J. Appl. Microbiol.* 85: 472-480, 1998.

252. Stanley, K., Jones, K. : Cattle and sheep farms as reservoirs of *Campylobacter*. J. Appl. Microbiol. 94: 104-113, 2003.
253. Steele, T, McDermott S. N. : The use of membrane filters applied directly to the surface of agar plates for the isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. Pathology. 16: 263–265, 1984.
254. Steinhauserova, I., Či esřkova, J., Fojtikova, K. and Obrovská, I.: Identification of thermophilic *Campylobacter* spp. by phenotypic and molecular methods. J. Appl. Microbiol. 90: 470-475, 2001.
255. Takata, T., Fujimoto, S., Amako, K. : Isolation of Nonchemotactic Mutants of *Campylobacter jejuni* and Their Colonization of the Mouse Intestinal Tract. Infect. Immun. 60: 3596-3600, 1992.
256. Tang Y-W, Waddington M.G, Smith D.H.: Comparasion of protein A gene sequencing with pulsed-field gel electrophoresis and epidemiologic data for molecular typing of methicillin-resistand *Staphylococcus aureus* . J. Clin. Microbiol. 38: 1347-1351, 2000.
257. Taş, E., Ardiç, N.: Akut Gastroenteritli Olgularda Termofilik *Campylobacter*, *Escherichia coli* O157:H7 ve Rotavirus Sıklığı. Klimik Dergisi. 17(3): 186-190, 2004.
258. Tauxe, R.V. : Epidemiology of *Campylobacter jejuni* Infections in the United States and Other Industrialized Nations. In: *Campylobacter jejuni: Current Status and Future Trends*. I Nachamkin, MJ Blaser ve LS Tompkins (Editörler). ASM Press, Washington, D.C. Sayfa:9-16, 1992.
259. Tezcan, S. Epidemiyoloji. Tıbbi Araştırmaların Yöntem Bilimi. Hacettepe halk sağlığı vakfı, yayın no: 92/1, Ankara,. Sayfa: 243-244, 2009.
260. The Increasing Incidence of Human Campylobacteriosis. Report and Proceedings of a WHO Consultation of Experts Copenhagen, Denmark 21-25 November 2000.
261. Tolcin, R., LaSalvia, M.M., Kirkley, B.A., Vetter, E.A., Cockerill, F.R., Procop, G.W. : Evaluation of the Alexon-Trend ProSpecT *Campylobacter* Microplate Assay. J. Clin. Microbiol. 38: 3853-3855, 2000.
262. Topçu, A., Söyletir, G., Doğanay, M.: İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Matbacılık, 2. Baskı. 1638-1643, 2002.

263. Trachoo, N. : *Campylobacter jejuni*: An Emerging Pathogen. Songklanakarinn J. Sci. Technol. 25: 141-157, 2003.
264. Vandamme, P. : Taxonomy of the Family *Campylobacteriaceae* In: *Campylobacter*. I Nachamkin ve MJ Blaser (Editörler). ASM Press, Washington, D. C. Sayfa: 3-27, 2000.
265. Van Damme, P., De Ley, J. : Proposal for a new family, *Campylobacteraceae*. Int. J. Systematic Bacteriol. 41: 451-455, 1991.
266. Veron, M., Chatelain, R. : Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Veron and designation of the neotype strain for the type species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Veron. International J. Systematic Bacteriol. 23: 122-134, 1973.
267. Vogt, R.L., Sours, H.E., Barrett, T. : *Campylobacter* Enteritis Associated with Contaminated Water. Ann. Intern. Med. 96: 292-296, 1982.
268. Vliet van, A.H.M., Ketley, J.M. : Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. J. Appl. Microbiol. 90: 45-56, 2001.
269. Vuckovic, D., Abram, M., Bubonja, M., Wraber, B., Doric, M. : Host Resistance to Primary and Secondary *Campylobacter jejuni* Infections in C57Bl/6 Mice. Microb. Pathog. 40: 35-39, 2006.
270. Wain, M., Bang, D.D., Lund, M., Nordentoft, S., Andersen, J.S., Pedersen K. and Madsen, M.: Identification of *Campylobacter* isolated from Danish broilers by phenotypic tests and species-specific PCR assays. J. Appl. Microbiol. 95(5) : 649, 2003.
271. Walker, R.I., Caldwell, M.B., Lee, E.C., Guerry, P., Trust, T.J., Ruiz-Palacios, G.M. : Pathophysiology of *Campylobacter* Enteritis. Microbiol. Rev. 50: 81-94, 1986.
272. Wang, G., Clifford, G.: Colony Multiplex PCR Assay for Identification and Differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C.lari*, *C upsaliensis* and *C. fetus* subsp. *fetus*. J. Clin. Microbiol. 12: 4744-4747, 2002.
273. Wareing, D.R., Bolton, F.J., Fox, A.J., Wright P.A., Greenway, D.L. : Phenotypic Diversity of *Campylobacter* Isolates from Sporadic Cases of Human Enteritis in the UK. J. Appl. Microbiol. 92: 502-509, 2002.



274. Wassenaar, T.M.: Toxin Production by *Campylobacter* spp. Rev. Clin. Microbiol. 10: 466-476, 1997.
275. Wassenaar, T.M., Blaser, M.J. :Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* Infections of Humans. Microbes Infect. 1: 1023-1033, 1999.
276. Wassenaar, T.M., Bleumink-Pluym, N.M., Van Der Zeijst, B.A. : Inactivation of *Campylobacter jejuni* Flagellin Genes by Homologous Recombination Demonstrates That *FlaA* but not *FlaB* is Required for Invasion. Embo J. 10: 2055-2061, 1991.
277. Wassenaar, T.M., Fry, B.N., Van Der Zeijst, B.A.M. : Variation of the Flagellin Gene Locus of *Campylobacter jejuni* by Recombination and Horizontal Gene Transfer. Microbiol. 141: 95-101, 1995.
278. Wassenaar, T.M., Newell, D.G. : Genotyping of *Campylobacter* spp. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1-9, 2000.
279. Wassenaar, T.M., On, S.L.W, Meinersmann, R.J. : Genotyping and the Consequences of Genetic Instability. In: *Campylobacter*, 2nd edn. I Nachamkin ve MJ Blaser (Editörler). ASM Press, Washington, D.C. Sayfa: 369-380, 2000.
280. Wassenaar, T. M. Fry, B. N. , Lastovica, A. J. , Wagenaar, J. A. , Coloe, P. J. , Duim, B.: Genetic Characterization of *Campylobacter jejuni* O:41 Isolates in Relation with Guillain-Barre´ Syndrome. J. Clin. Microbiol. 38(2): 874-876, 2000.
281. Wassenaar, T. M., Geilhausen, B. and Newell, D.G. : Evidence of Genomic Instability in *Campylobacter jejuni* Isolated from Poultry. Appl. Environ. Microbiol. 64(5): 1816-1821, 1998.
282. Wesley, I.V., Muraoka, W.T., Trampel, D.W., Hurd, H.S. : Effect of Preslaughter Events on Prevalence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Market-Weight Turkeys. Appl. Environ. Microbiol. 71: 2824-2831, 2005.
283. Wesley, I.V., Wells, S.J., Harmon, K.M., Green, A., Schroeder-Tucker, L., Glover, M., Siddique, I. : Fecal Shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in Dairy Cattle. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1994-2000, 2000.
284. Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., Woods, G. Curved Gram negative bacilli and oxidase positive fermenters: *Campylobacteraceae* and *Vibrionaceae*. In: Color Atlas and Textbook of

- Diagnostic Microbiol. 6th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 321-361, 2006.
285. Wittwer, M., Keller, J., Wassenaar, T.M.: Genetic Diversity and Antibiotic Resistance Patterns in a *Campylobacter* Population Isolated from Poultry Farms in Switzerland. Appl. Environ. Microbiol. 1: 2840-2847, 2005.
286. Whitehouse, A., Balbo, P.B., Pesci, E.C., Cottle, D.L., Mirabito, P.M., Pickett, C.L. : *Campylobacter jejuni* Cytolethal Distending Toxin Causes a G2-Phase Cell Cycle Block. Infect. Immun. 66: 1934-1940, 1998.
287. Winters, D.K., O'Leary, A.E., Slavik, M.F. : Rapid PCR with Nested Primers for Direct Detection of *Campylobacter jejuni* in Chicken Washes. Mol. Cell Probes. 11: 267-271, 1997.
288. Wooldridge, K.G., Ketley, J.M. : *Campylobacter*-Host Cell Interactions. Trends Microbiol. 5: 96-102, 1997.
289. Yaman, H., Elmalı, M., Ulukanlı, Z., Atabay, H.İ., Tekinsel, K.K. Presence of *Campylobacter* (*C. jejuni*) in recreational, lake and stream water and fresh fish in Turkey. Archiv für Lebensmittelhygiene. 56(4) :83-86, 2005.
290. Yaman, H. ve Elmalı, M. Çiğ sütlerde termofilik *Campylobacter* (*C. jejuni*) varlığının araştırılması. Kafkas Üniv. Vet. Fak. Dergisi 10(1): 37-40, 2004.
291. Yao, R., Burr, D.H., Doig, P., Trust, T.J., Nlu, H., Guerry, P. : Isolation of Motile and Non-Motile Insertional Mutants of *Campylobacter jejuni*: the Role of Motility in Adherence and Invasion of Eukaryotic Cells. Mol. Microbiol. 14: 883-893, 1994.
292. Yao, R., Burr, D.H., Guerry, P. : CheY-Mediated Modulation of *Campylobacter jejuni* Virulence. Mol. Microbiol. 23: 1021-1031, 1997.
293. Yıldırım, M.S., Fazlı, Ş.A.: Kayseri ve yöresinde bakteriyolojik kültür için gönderilen dışkı örneklerinde *Campylobacter*'lerin izolasyonu ve identifikasyonu. İnfek. Derg. 12: 317-22, 1998.
294. Yılmaz, A., Tuğrul, M.: Edirne'de İshal Etkenleri arasında *Campylobacter* türlerinin yerinin ve antimikrobiklere duyarlılıklarının araştırılması. İnfeksiyon Dergisi (Turkish J. Infection); 19 (1):53-59, 2005.
295. Zarakolu, P., Akba, E., Levent, B., Gözalan, A.: İshalli çocuk hastalardan izole edilen bakteriyel patojenlerin dağılımı. Flora; 4(3): 190-4, 1999.

296. Zweifel, C., Zychowska, M.A., Stephan, R. : Prevalence and Characteristics of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. Isolated from Slaughtered Sheep in Switzerland. *Int. J. Food Microbiol.* 92: 45-53, 2004.

## **8. ÖZGEÇMİŞ**

1976 Ankara doğumluyum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Malatya'da tamamladım. 1999'da İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden mezun oldum. 1999'da Kars'a öğretmen olarak atandım. 2003'te Kafkas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji (Hidrobiyoloji) bölümünde Yüksek Lisansımı tamamladım. Halen Ankara Aydınlik Evler Anadolu Lisesinde Biyoloji Öğretmeni olarak çalışmaktayım. Evli ve 3 çocuk babasıyım.