



T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
T İP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**AKUT İSHALLERDE *CAMPYLOBACTER JEJUNİ* VE DİĞER  
ETYOLOJİK AJANLARIN HIZLI TANISINDA MOLEKÜLER  
YÖNTEMLERİN DEĞERİ**

**DR. ESRA POLAT**

**UZMANLIK TEZİ**

**PROF.DR.FATİH KÖKSAL**

**ADANA-2008**



T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
T İP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**AKUT İSHALLERDE *CAMPYLOBACTER JEJUNİ* VE DİĞER  
ETYOLOJİK AJANLARIN HIZLI TANISINDA MOLEKÜLER  
YÖNTEMLERİN DEĞERİ**

**DR. ESRA POLAT**

**UZMANLIK TEZİ**

**PROF.DR.FATİH KÖKSAL**

**Bu çalışma TF2005LTP1 nolu proje olarak Çukurova Üniversitesi Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir.**

**ADANA-2008**

## **TEŞEKKÜR**

Eğitim sürem boyunca bilimsel desteklerini esirgemeyen, her konuda rahatlıkla ulaşp danıştığım, büyük desteklerini gördüğüm ve engin tecrübelerinden faydalandığım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fatih Köksal'a ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalındaki diğer hocalarıma, çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Arş.Gör.Dr. Beril Akçimen, Arş.Gör.Dr. Erkan Yula, Arş.Gör. Tülin Güven, Doktora öğrencisi Arzu Kipalev'e ve Yüksek Lisans öğrencilerinden Tuba Yüksel, Esra Zorluer ve Taner Bozkurt'a, başta bölüm sekreterimiz Suna Gökmen olmak üzere bütün çalışma arkadaşlarıma ve verdiği manevi destekten dolayı anneme, babama ve eşime saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

**Dr. Esra Polat**

## İÇİNDEKİLER

|                                                        | <u>Sayfa No</u> |
|--------------------------------------------------------|-----------------|
| TEŞEKKÜR                                               | i               |
| İÇİNDEKİLER                                            | iii             |
| TABLO LİSTESİ                                          | iv              |
| ŞEKİL LİSTESİ                                          | v               |
| KISALTMA LİSTESİ                                       | vi              |
| ÖZET-ANAHTAR SÖZCÜKLER                                 | viii            |
| ABSTRACT-KEYWORDS                                      | viii            |
| 1. GİRİŞ                                               | 1               |
| 2. GENEL BİLGİLER                                      | 4               |
| 2.1. Tarihçe                                           | 4               |
| 2.2. Sınıflandırma                                     | 6               |
| 2.3. Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri              | 9               |
| 2.3.1. Görünüm ve Boyanma                              | 9               |
| 2.3.2. Hücre Duvarı ve Antijenik Özellikleri           | 9               |
| 2.3.3. Genomik Özellikler                              | 10              |
| 2.4. Üreme ve Kültür özellikleri                       | 12              |
| 2.5. Biyokimyasal Özellikleri                          | 14              |
| 2.6. Fiziksel ve Kimyasal Etkenlere Duyarlılık         | 16              |
| 2.7. Kampilobakter Enfeksiyonları (Kampilobakteriozis) | 16              |
| 2.7.1. Enfeksiyonun Bulaşması                          | 17              |
| 2.7.2. Virulans Faktörleri ve Patogenez                | 18              |
| 2.7.3. Yaptığı Hastalıklar                             | 22              |
| 2.7.4. Kampilobakter Enfeksiyonlarında Tanı            | 24              |
| 2.7.4.1. Direkt Tanı Yöntemleri                        | 24              |
| 2.7.4.1.1. Örnek alınması                              | 24              |
| 2.7.4.1.2. Mikroskopik inceleme                        | 25              |
| 2.7.4.1.3. Kültür Ortamında İzolasyon                  | 26              |
| 2.7.4.1.4. Kampilobakterlerin İdentifikasyonu          | 30              |
| 2.7.4.1.5. Dışkıda Antijen Arayan Testler              | 31              |
| 2.7.4.1.6. Moleküler Tanı Yöntemleri                   | 32              |
| 2.7.4.2. İndirekt Tanı Yöntemleri                      | 35              |
| 2.7.5. Kampilobakter Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi | 35              |
| 2.7.5.1. Epidemiyolojik Açıdan Tiplendirme Yöntemleri  | 41              |
| 2.7.5.1.1. Fenotipik yöntemler                         | 41              |
| 2.7.5.1.2. Genotipik yöntemler                         | 44              |
| 2.7.6. Kampilobakter Enfeksiyonlarının Tedavisi        | 48              |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM                                     | 49              |
| 3.1 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri                   | 51              |
| 3.1.1 Taşıma besiyerleri                               | 51              |
| 3.1.1.1. Modifiye Carry-Blair Besiyeri                 | 51              |
| 3. 1. 2. Üretme Besiyerleri                            | 52              |

|                                                                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3. 1. 2.1. Skirrow Selektif Agar Besiyeri (SSA)                                                                            | 52  |
| 3.1.2.2. Modifiye Kampilobakter Blood- Free Selective<br>Agar = Modified Charcoal Cefoperazon<br>Deoxycholate agar (mCCDA) | 52  |
| 3.1.2.3. Sefaperazon, Amfoterisin B, Teikoplanin (CAT)<br>Suplementli mCCDA Besiyeri                                       | 53  |
| 3.1.2.4. Selenit–F sıvı Besiyeri                                                                                           | 53  |
| 3.1.2.5. XLD (Ksiloz Lizin Deoksikolat agar ) Besiyeri                                                                     | 53  |
| 3.1.2.6. Yersinia Selektif suplementli (CIN) Besiyeri                                                                      | 54  |
| 3.2. Dışkı Örneklerinin kampilobakterler için Seçici Besiyerlerine<br>Ekimi ve İnkübasyonu                                 | 54  |
| 3.3.Kampilobakter Suşlarının İdentifikasyonu                                                                               | 54  |
| 3.3.1. Oksidaz Testi                                                                                                       | 57  |
| 3.3.2. Katalaz Testi                                                                                                       | 57  |
| 3.3.3. Triple Sugar İron Agar (TSI)’ da H <sub>2</sub> S Oluşumunun<br>Değerlendirilmesi                                   | 57  |
| 3.3.4. Hippurat Hidroliz Testi                                                                                             | 58  |
| 3.3.5. Sefalotin ve Nalidiksik Asit Duyarlılık Testleri                                                                    | 59  |
| 3.3.6. Tuz Tolerans Testi                                                                                                  | 59  |
| 3.3.7. İdentifikasyon Testlerinin Yorumlanması                                                                             | 60  |
| 3.4. Diğer Enterik Patojenlerin İdentifikasyonu                                                                            | 60  |
| 3.5. PCR/RFLP Uygulamaları                                                                                                 | 60  |
| 3.5.1. DNA ekstraksiyonu                                                                                                   | 61  |
| 3.5.2. Termofilik bölgenin amplifikasyonu.                                                                                 | 63  |
| 3.5.3. Agaroz Jel Elektroforezinin uygulaması                                                                              | 64  |
| 3.5.4. RFLP uygulamaları                                                                                                   | 65  |
| 4. BULGULAR                                                                                                                | 69  |
| 5. TARTIŞMA                                                                                                                | 76  |
| 6. SONUÇ ve ÖNERİLER                                                                                                       | 96  |
| 7. KAYNAKLAR                                                                                                               | 98  |
| ÖZGEÇMİŞ                                                                                                                   | 109 |

## TABLO LİSTESİ

| <b><u>Tablo no</u></b>                                                                                                                                                               | <b><u>Sayfa no</u></b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| Tablo 1: Campylobacter'lerin sınıflandırılması                                                                                                                                       | 7                      |
| Tablo 2: Kampilobakter türlerinin fenotipik özelliklerine göre tanımlanmaları                                                                                                        | 15                     |
| Tablo 3: Kampilobakter jejuni izolasyonu için seçici besiyerlerinin formülleri                                                                                                       | 29                     |
| Tablo 4: Termofilik kampilobakter türlerinin identifikasyonu                                                                                                                         | 31                     |
| Tablo 5: Kampilobakter türlerinin konak tropizmi                                                                                                                                     | 39                     |
| Tablo 6: Dışkı örnekleri değerlendirilen hastaların cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılımı                                                                                         | 49                     |
| Tablo.7: PCR-RFLP fragment polimorfizmine göre kampilobakter tiplendirilme kriterleri                                                                                                | 68                     |
| Tablo 8: Dışkı örneklerinde kültür ve/veya PCR-RFLP yöntemleri ile kampilobakter varlığı tespit edilen hastaların yaş ve cinsiyet gruplarına göre dağılımı                           | 70                     |
| Tablo 9: Dışkı örneklerinden kampilobakter izolasyonu için kullanılan besiyerlerinde kampilobakter türü mikroorganizmaların üretilme oranları                                        | 70                     |
| Tablo 10: Kampilobakter izolatlarının seçici besiyeri kombinasyonlarında üreme oranları                                                                                              | 70                     |
| Tablo 11: Seçici Besiyerlerinden izole edilen kampilobakter izolatlarının fenotipik özellikleri                                                                                      | 71                     |
| Tablo12: PCR ile termofilik kampilobakter spesifik 491bp uzunluğunda fragment tespit edilen örneklerin, ekstraktın özelliğine göre dağılımı                                          | 72                     |
| Tablo13: <i>Alu I</i> ve <i>Tsp 509I</i> RE'lerinin kullanıldığı PCR-RFLP yöntemi ile değerlendirilen ekstraktlarda tespit edilen kampilobakter tiplerinin örneklerle göre dağılımı. | 73                     |
| Tablo 14: PCR-RFLP analizinde elde edilen fragment polimorfizmine göre tiplendirilen suşların fenotipik (Hippurat hidrolizi) yöntemlere göre aldıkları ön tanı                       | 75                     |

## ŞEKİL LİSTESİ

| <b><u>Şekil no</u></b>                                                                                                                          | <b><u>Sayfa no</u></b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| Şekil 1: <i>Campylobacter</i> genusu ve filogenetik olarak yakın olan genuslar                                                                  | 8                      |
| Şekil 2: Skirrow'un seçici besiyerinde üretilen kampilobakter kolonilerinin görünümü                                                            | 55                     |
| Şekil 3: Modifiye kampilobakter Blood- Free Selective Agar besiyerinde üretilen kampilobakter kolonilerinin görünümü.                           | 55                     |
| Şekil 4: Seçici besiyerinde üreyen , kampilobakter kolonilerinden hazırlanan Gram boyalı preparatların, X 100 büyütmedeki mikroskopik görüntüsü | 56                     |
| Şekil 5: Taze dışkı örneğinden hazırlanan Gram boyalı preparatların 100 X büyütmedeki mikroskopik görüntüsü                                     | 56                     |
| Şekil 6: Hippurat Hidroliz Testinin değerlendirilmesi                                                                                           | 59                     |
| Şekil 7: <i>Alu I</i> restriksiyon enziminin hedef aldığı baz dizisi ve kesim bölgesi                                                           | 66                     |
| Şekil 8: <i>Tsp 509I</i> restriksiyon enziminin hedef aldığı baz dizisi ve kesim bölgesi                                                        | 67                     |
| Şekil 9: PCR amplifikasyon ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü                                                                          | 72                     |
| Şekil 10: <i>Alu I</i> ve <i>Tsp 509I</i> RE'nin kullanıldığı PCR-RFLP yöntemi ile elde edilen fragmentlerin agaroz jeldeki polimorfizmi.       | 74                     |

## KISALTMALAR

AFLP: Amplified fragment length polymorphism analysis  
CadF : Campylobacter adesion to fibronectin  
CAT agar : Sefaperazon, amfoterisin B, teicoplanin agar  
CDC: Centers for Disease Control  
CFTR: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator  
Cfu: Colony forming units  
Cia: Campylobacter invasion antigen  
CLDT: Cytolethal distending toksin  
DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü.  
EagEC: Enteroaggregative *E.coli*  
EFSA: European Food Safety Authority  
EHEC: Enterohaemorrhagic *E. coli*  
ELISA: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay  
FAFLP: Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis  
GBS: Guillain-Barre Sendromu  
IL-1 $\beta$ : Interleukin-1 $\beta$   
JlpA: Jejuni lipoprotein A  
KBR: Kompleman birleşme reaksiyonu  
LOS: Lipooligosakkarit  
LPS :Lipopolisakkarid  
mCCDA : Modified charcoal cefoperazon deoxycholate agar  
MEE: Multilocus enzyme electrophoresis  
MIC: Minimum inhibitory concentration  
MLTS: Multilocus sequence typing  
NAA: Nükleik asit amplifikasyon  
NF- $\kappa$ B: Nuclear factor kappa B  
PCR: Polymerase chain reaction  
PEB1: Periplasmic binding protein  
PFGE: Pulsed-field jel elektroforez  
RAPD-PCR: Random amplification of polymorphic DNA-PCR  
RE:Restriksiyon endonükleazı.  
RFLP: Restriction fragment length polymorphism  
RSKK:Refik Saydam Kültür Koleksiyonu  
SSA: Skirrow selektif agar.  
TSI: Triple sugar iron agar  
VBNC: Viable but non-culturable  
XLD: Ksiloz lizin deoksikolat

## ÖZET

### Akut İshallerde *Campylobacter jejuni* ve Diğer Etyolojik Ajanların Hızlı Tanısında Moleküler Yöntemlerin Değeri

Termofilik kampilobakterler, gelişmekte olan ülkelerde özellikle 0-2 yaş arası çocuk ishallerinin en önemli etyolojik ajanlarından. Yüksek mortalite ile seyreden çocukluk dönemi ishallerinde; antibiyotik kullanımı için sınırlı endikasyonlar arasında yer alan kampilobakter enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı, hasta kayıplarının en aza indirilmesi ve etkili bir tedavi planının oluşturulması açısından önemlidir. İshalli hastaların dışkı örneklerinden kampilobakterlerin tanısında kullanılan klasik kültür bazlı izolasyon ve identifikasyon yöntemleri, uygulanması zor, pahalı, zaman alıcı, düşük duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. Bu sebeple son yıllarda klinik örneklerden kampilobakter tanısında, klasik kültür bazlı tanı yöntemlerinden daha yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olan Nükleik asit amplifikasyonu bazlı moleküler yöntemler kullanılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada ishallerle seyreden hastalıklarda, dışkı örneklerinden *C.jejuni* ve diğer termofilik kampilobakter türlerinin tanı ve tiplendirilmesinde, konvansiyonel kültür yöntemleri ile 23S rDNA bazlı PCR-RFLP yönteminin duyarlılığının tespiti amaçlanmıştır.

Bu çalışmaya, Haziran-2006 ile Ekim-2007 tarihleri arasında kalan toplam 15 aylık süre içerisinde ishallerle hastalardan alınan toplam 434 dışkı örneği dahil edilmiştir.

Dışkı örneklerinden kampilobakter izolasyonu için, koyun kanı içeren Skirrow selektif agar (SSA) besiyeri, Modifiye Kampilobakter Blood- Free Selective Agar (mCCDA agar) ve CAT supplement içeren CCDA besiyeri kullanıldı.

Dışkı örneklerinden QIA-Gen dışkı ekstraksiyon kiti ile elde edilen DNA ekstraktı ile seçici besiyerlerinde üreyen, kampilobakter kolonilerinden dondurup çözme” yöntemi kullanılarak elde edilen DNA ekstraktı, termofilik kampilobakter türlerinin 23S rDNA geninde yer alan 491 bp uzunluğundaki dizilerin tespiti amacı ile çoğaltıldı. Amplikonlar *Alu I* ve *Tsp 509I* restriksiyon enzimi ile kesildikten sonra, jel elektroforezinde gösterdikleri fragment profil polimorfizmine göre tür düzeyinde tanımlandı.

Çalışma sonunda bu yöntemlerden en az birisi ile; 13 (% 59)’ü kadın, 9 (% 41)’u da erkek hastalara ait olmak üzere 22 (% 5,1 ) örnekde kampilobakter pozitifliği tespit edildi. Örneklerin 16 (% 3,7)’sında mCCDA ve CAT besiyerlerinde, 13 (% 3 )’ünde de SSA besiyerinde üreme görüldü. PCR-RFLP ile dışkı örneklerinden 19 (% 4,5)’unda termofilik kampilobakter türleri için spesifik olan hedef dizilerin varlığı tespit edildi.

Seçici besiyerlerinde izole edilen 17 izolatın hippurat hidroliz testi sonuçlarına göre yapılan tiplendirilmesi sonucunda, en sık tanımlanan türün 13 (% 76,5 ) izolatla *C.jejuni* olduğu görüldü. Aynı izolatlar PCR-RFLP ile tiplendirildiğinde en sık tanımlanan türün 14 (% 82,4) izolat ile yine *C.jejuni* olduğu tesbit edildi.

Dışkıdan termofilik kampilobakterlerin tanısında ve tür düzeyinde identifikasyonunda moleküler yöntemlerin daha sensitif olduğu belirlendi.

**Anahtar Sözcük:** *Campylobacter* identifikasyon, *Campylobacter jejuni*; PCR-RFLP, *Campylobacter* seçici kültür.

## ABSTRACT

### **The Value of Molecular Methods in Rapid Diagnosis of *Campylobacter jejuni* and The Other Etiologic Agents in Acute Diarrhea**

Thermophilic *Campylobacters* are one of the most significant causes of diarrhea especially in children aged 0-2 in developing countries. Microbiological diagnosis of *Campylobacter* infections which are among limited indications for antibiotics, is important for decreasing the mortality rate and establishing an effective treatment plan against infections in childhood diarrhea with high mortality. The conventional culture based methods for isolation and identification of thermophilic *Campylobacter* species in patients's stool specimens are highly difficult, time-consuming, expensive, low sensitive and low specific. For these reasons, in last decade, nucleic acid amplification based methods which are more sensitive and specific than conventional based culture methods, have been using for diagnosis of *Campylobacters* in clinical specimens.

The aim of this study was to determine the sensitivity of selective culture methods and PCR-RFLP based on 23S rDNA for detecting and identifying *Campylobacter jejuni* and the other thermophilic *Campylobacter* species in patients with acute diarrhea.

In this study, a total of 434 faecal samples obtained from patients with acute diarrhea over a fifteen-month period from June 2006 to October 2007 were investigated by culture and PCR-RFLP.

The isolation of *Campylobacters* from faecal samples was carried out on Skirrow selective agar (SSA), modified *Campylobacter* blood free selective agar (mCCDA) and CCDA with CAT supplement medium.

Extraction of DNA was performed with Qia-Gen stool extraction kit from faecal samples and with freeze-boil method from colonies growth on selective medium. A fragment of 491 bp of the 23s rDNA gene was amplified for identification of thermotolerant *Campylobacters* and amplicons were digested with restriction enzymes *Alu I* and *Tsp 509I*. The restriction fragments were separated by gel electrophoresis giving a specific banding pattern for each one of *Campylobacter* species.

As a result, 22 (5,1 %) stool specimens (females 13(59 %); males 9(41 %)) were found *Campylobacter* positive in at least one of these method 16(3,7 %)specimen were positive on mCCDA and CCDA with CAT supplement medium and 13(3 %) specimen on SSA medium. 19(4,5 %) stool specimen were found PCR positive for thermophilic *Campylobacter* species.

The Hippurate hydrolysis test results showed that of 17 isolates growth on selective medium, 13 (76,5 %) were identified as *C.jejuni* as the most frequent species. 14 (82,4 %) isolates were identified as *C.jejuni* by PCR-RFLP.

These results also showed that molecular methods were more sensitive than phenotypical methods for detection and identification of *Campylobacter* species from faecal sample.

**Keywords:** *Campylobacter* selective culture, *C.jejun*; PCR-RFLP, *Campylobacter* spp identification

# 1. GİRİŞ

Kampilobakteriozis tüm dünyada yaygın bir zoonozdur. Etken, başta kanatlılar, ruminantlar ve domuzlar olmak üzere çeşitli hayvanların gastrointestinal ve genital sisteminde kommensal olarak bulunmakta, insanlara hayvan dışkıları ile kontamine olmuş et, süt ve suların tüketimi ile veya enfekte hayvanlarla temas sonucunda bulaşmaktadır<sup>1,2,3</sup>. Enfekte besi hayvanlarında *C.jejuni*'nin flora bakterisi gibi davranması ve kontamine gıdalarda da kontaminasyonu tanımlayan koku, renk değişikliği gibi makroskopik bulguların olmaması, enfeksiyonun gıda yolu ile yayılmasını kolaylaştırmaktadır. Besi hayvanlarının dışında çok daha seyrek olmak üzere ev hayvanları ile temas ve insandan insana bulaşta, Kampilobakter enfeksiyonlarının yayılım için önemli bir yoldur<sup>4</sup>.

Kampilobakter cinsi bakteriler insanlarda sıklıkla kendikendini sınırlandıran basit bir sekretuar ishale sebep olurken, bazen kanlı mukuslu dışkılamanın olduğu dizanteri formunda seyretmektedir<sup>4,5,6</sup>. Ayrıca hastanın yaşına ve suşun virulansına göre değişmek üzere 2-5 yaş arası çocuklarda periferik nöronlarda demiyelinizasyon ve güç kaybı ile seyreden Guillain-Barre sendromu ve Reaktif Artrit gibi sekellerin ortaya çıkışına yol açmaktadır<sup>7</sup>. *Salmonella enteritidis* ve alt türleri ile, gıda yolu ile bulaşan bir diğer önemli zoonoz olan EHEC/VTEC suşlarında olduğu gibi, kampilobakter enfeksiyonlarını önemli kılan bir diğer sebep, özellikle insanlarda ciddi enfeksiyonlarda kullanılan kinolonlar, beta-laktam gurubu antibiyotikler ve makrolidler gibi bir çok antibiyotiğe karşı Çoklu İlaç Direnci gösteren suşların giderek artan oranıdır<sup>8</sup>. Bu tür suşlarla oluşan enfeksiyonlar kadar, besi döneminde, tamamen et üretimindeki artışa katkı amaçlı olarak kullanılan antibiyotiklerin, gerek et ile düşük konsantrasyonlarda alınarak insan intestinal florasındaki bakterileri provoke etmesi, gerekse hayvan intestinal florasından direkt direnç geliştirmiş olarak alınan bakterilerin özellikle immunsistemi baskılanmış hastalarda oluşturacakları enfeksiyonlar, önemli bir tedavi problemi yaratmaktadır<sup>9</sup>. *C.jejuni* enfeksiyonlarına bağlı olarak gelişen antimikrobik direncinin bir başka sebebidir tanı konmamış ishalleri hastalarda irrasyonel antimikrobik kullanımıdır. Bütün bu gerekçeler kampilobakter enfeksiyonlarının önemini arttırmakta

ve *C. jejuni* enfeksiyonlarını daha duyarlı ve özgöl mikrobiyolojik tanıyı gerekli kılmaktadır. Kampilobakterlerin kapnofilik özellikleri ve dışkı florasında yer alan çok sayıdaki bakteri ile birlikte oluşları, bu bakterilerin uzun yıllar klasik kültür yöntemleri ile dışkı kültürlerinden izolasyonlarını engellemiştir. Skirrow ve arkadaşlarının 1980’li yıllarda selektif besiyerleri kullanarak mikroaerofilik şartlarda kampilobakter’leri izole etmeleri ile bu mikroorganizmaların taksonomik, patofizyolojik ve epidemiyolojik özellikleri ile ilgili çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Yaklaşık 20 yılı aşkın süredir geniş hasta grupları ile yapılan çalışmalar sonunda kampilobakterlerin, gerek gastrointestinal sistemde oluşturdukları primer enfeksiyonlar ve komplikasyonları, gerekse intestinal sistem dışı sekelleri hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir. Bu çalışmalarla özellikle hayvansal gıdaların tüketimi sonucu ortaya çıkan çoğu akut gastroenterit olgusunun kampilobakterler tarafından oluşturulduğu belirlenmiştir<sup>10</sup>. Ancak geçen bu süre içerisinde enfekte materyalden mikroorganizmanın izolasyonu ve identifikasyonunu sağlayacak yüksek duyarlılıkta ve hızlı sonuç üreten uygulanabilir, standart protokoller oluşturulmamıştır. Tanıda yaşanan bu yetersizlikler, kampilobakterlerin prevalansı ve insidansı, insan enfeksiyonlarındaki muhtemel bulaş yolları, özellikle kümes hayvanlarındaki asemptomatik enfeksiyonlara sebep olan mekanizmalar ve kümesler, ağıklar ve doğadaki persistansın sebebini tespiti yönelik gerek bölgesel, gerek ulusal, gerekse uluslararası çalışmalarda, tutarsız sonuçların alınmasına yol açmıştır.<sup>11,12</sup> Klinik materyalden *C.jejuni* izolasyon ve identifikasyonunda yaşanan güçlüklerin giderilmesi için seçici kültür tekniklerinin yanı sıra, son yıllarda mikroorganizmanın genomundaki 16S rDNA, 23S rDNA, GroEl, GTPase, CadF, Asp, CeuE, HipO ve GlyA proteinlerini kodlayan spesifik gen bölgelerinin amplifiye edildiği Nükleik Asit Amplifikasyon (NAA) teknikleri ile spesifik gen bölgelerinin restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucu elde edilen DNA fragmentlerinin sayı ve büyüklüklerini esas alan PCR-RFLP yöntemleri gibi moleküler yöntemlerde denenmiştir<sup>13</sup>. Ancak, mikroorganizmanın son derece değişken olan genetik yapısı sebebi ile moleküler yöntemlerin standardizasyonu ve istenen duyarlılık ve özgüllükte sonuçların üretilmesi mümkün olamamıştır. Ancak klinik örneklerden, insanlarda ishale seyreden hastalıklara sebep olan 4 major tipin identifikasyonunda 23S rDNA bazlı PCR-RFLP yönteminin, *C.jejuni*, ve *C.coli*’yi diğer kampilobakter türlerinden ayırt edebilen tek tüp multiplex-PCR’a göre ayırım gücünün,

özgüllük ve duyarlılığının daha yüksek olduğu birçok farklı merkezde yapılan çalışmalarda bildirilmiştir<sup>14</sup>.

Bu çalışma da; ishale seyreden hastalıklarda, *C.jejuni* ve diğer termofilik kampilobakter türlerinin bölgemizdeki görülme sıklığı ve dışkı örneklerinden termofilik kampilobakter türlerinin direkt tanısında, Konvansiyonel kültür yöntemleri ile 23S rDNA bazlı PCR-RFLP yönteminin duyarlılığının tespiti amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

*C.jejuni* ve diğer termofilik kampilobakterler özellikle 5 (0-8) yaş grubu çocuklarla ileri yaşlı hastalar ve immunsistemi baskılanmış kişilerde basit sekretuvar tip enteritten kanlı mukuslu gaita çıkarımı ile karakterize dizanterik formdaki enterokolitlere yol açabilen gıda ve su kökenli önemli bir patojendir. Kapnofilik bir mikroorganizma olan ve düşük metabolik aktivitesi sebebi ile in-vitro şartlarda üreme güçlüğü gösteren kampilobakterlerin, taksonomik ve fizyolojik özellikleri ile konakla olan ilişkileri hakkındaki bilgilerimiz, ilk izolasyondan günümüze kadar geçen yaklaşık 25 yıla rağmen, hala yetersizdir<sup>5</sup>.

### 2.1. Tarihçe

İnsanlarda kampilobakter enfeksiyonu ile ilgili ilk bilgiye, Theodor Escherich (1886) tarafından yazılan bir seri makalede rastlanmaktadır. Araştırmacı ‘Kolera infantum’ diye tanımladığı hastalıktan ölen bir grup çocuğun dışkısında vibrioya benzer spiral şekilli bakterileri gördüğünden bahsetmiş, ancak bu mikroorganizmayı katı besiyerinde üretmediği için hastalık etkeni olarak düşünmemiştir<sup>10</sup>.

Kampilobakterlerin hayvanlarda gebelik anomalileri ve ishale yol açtığı 20.yüzyılın başından beri bilinmektedir. İlk kez İngiliz veteriner hekimler, Mc Fadyean J ve Stockman S.(1909) 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<sup>16</sup>. Daha sonra benzer mikroorganizma Smith T.(1919) tarafından düşük yapmış sığır plasentasından da izole edilmiştir<sup>17</sup>.

Jones FS ve arkadaşları (1931), daha önce Smith’in tanımladığı vibrioları, dizanterili sığırların dışkısında tespit etmişler ve *Vibrio jejuni* olarak adlandırmışlardır.<sup>18</sup> Aynı yıl benzer vibriolar Doyle LP. tarafından dizanterili domuzlardanda izole edilmiş, ancak *Vibrio coli* olarak adlandırılmıştır<sup>19</sup>.

*V.jejuni*'ye benzer morfolojide bir mikroorganizma Illinois'te, süt kaynaklı bir salgından etkilenen 355 kişiden 31'inin dışkıсында, tespit edilmiş (1938) ancak hastalık etkeni olarak gösterilememiştir<sup>10</sup>.

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 R. ve arkadaşları (1947) tarafından gösterilmiştir<sup>10</sup>.

King E.O.(1957) adlı araştırmacı ise bu mikroorganizmaları, ishalleri çocukların kanında göstermiş, ancak klasik vibriolardan biyokimyasal ve antijenik yönden farklı olduğu için, bu vibrioları "related vibrio" olarak tanımlamıştır. Araştırmacı "related vibrio" ların ishal etkeni olduklarını; ancak yavaş üredikleri için dışkı örneklerinden izole edilemediğini ileri sürmüştür.<sup>20</sup> Selektif kültür yönteminin geliştirildiği 1972 yılına kadar ancak 12 "related vibrio" olgusu bildirilmiştir<sup>21</sup>.

Sebald M. ve Veron M. (1963), 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. *Campylobacter fetus*'un yer aldığı Kampilobakter cinsi içerisinde daha sonra *Vibrio jejuni* ve *Vibrio coli*' de dahil edilmiştir<sup>10</sup>.

*C.jejuni* ilk defa Dekeyser P. ve arkadaşları (1968 ) tarafından Brüksel'de bulunan St Peter Üniversitesi Hastanesi' ne ateş ve şiddetli ishal yakınması ile gelen bir kadının önce kanında, sonra dışkıında membran filtrasyon tekniği kullanılarak, izole edilmiştir. Aynı hastanın örnekleri, Butzler JP (1973) ve arkadaşları tarafından aynı yöntemle çalışılmış ve Dekeyser P. ve arkadaşları'nın sonuçları doğrulanmıştır. Bu olgu Dekeyser P. ve Butzler JP. adlı araştırmacıların ortak çalışmalarının başlangıcı olmuştur. Araştırmacılar filtrasyon yöntemi ile 3800 ishalleri çocuğun %5,3'ü ile, 7200 sağlıklı bireyin %1,6'sının dışkılarından kampilobakter türü mikroorganizma izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmaya paralel olarak *C.jejuni* ve *C.coli* suşlarına karşı geliştirilen aniserumların kullanıldığı kompleman fiksasyon ve aglütinasyon testleri ile *C.jejuni* izolatları antijenik olarak tiplendirilmiştir. İnsanlardan izole edilen kampilobakter izolatları ile tavuk, koyun ve domuz gibi hayvanlardan izole edilen kampilobakter izolatları arasındaki antijenik benzerlikler ortaya konulmuştur. Ayrıca kampilobakterlerin neden olduğu ishallerin pato-fizyolojisi ile ilgili çalışmalar da ivme

kazanmış, *C.jejuni*' suşlarının invaziv yetenekte olduğu kümes hayvanları üzerinde gösterilmiştir. Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda *C.jejuni* suşlarının kümes hayvanlarında, intestinal sistemde gerek lümende gerek mukus tabakası ve epitel yüzeyindeki kolonizasyonları sonrasında, hücreye invaze olmadıkları, bir flora bakterisi gibi davranıp, ancak desmosomların tahribi halinde parasellüler yolla laminapropria'ya göç ettikleri gösterilmiştir<sup>21,22</sup>.

Skirrow M.B (1977) filtrasyon tekniğini kullanmadan, kampilobakterler'in dışkıdan kolayca izolasyonunu sağlayan selektif kültür yöntemini geliştirmiştir. Bu gelişme ile birlikte kampilobakter türlerine yönelik çalışmalar hız kazanmış, tüm dünyada klinik ve çevresel örneklerden çok sayıda yeni kampilobakter türleri izole edilmiş, genusa ait çok sayıda türün genomik haritası çıkarılmıştır<sup>22</sup>.

## 2.2. Sınıflandırma

On SLW'ye göre kampilobakterlerle ilgili ilk sınıflandırma, bu mikroorganizmaların vibriolardan farklı bir tür olduklarını söyleyen, Sebald M ve Veron M (1963) tarafından yapılmıştır. Sebald M. ve Veron M., bu mikroorganizmaları fenotipik özelliklerini dikkate alarak *Spirillaceae* familyası içerisinde *C.fetus* ve *C.bubulus* (şimdiki adı *C.sputorum*) olarak adlandırdıkları 2 cinsi içerisine yerleştirmişlerdir.<sup>23</sup> Bu sınıflamadan on yıl sonra biyokimyasal ve immünolojik 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.<sup>24</sup> Klinik ve çevre örneklerinden yeni kampilobakter türlerinin izole edilmesi ile cins içerisine çok sayıda yeni tür ve alt tür ilave edilmiştir. İnsanlarda gastrik mukozaya kolonize olarak non-ülser dispepsiden gastrik adenokarsinomalara kadar değişen gastroduodenal patolojilerden sorumlu olan *H.pylori*, ilk tanımlandığı 1983 yılında *Campylobacter* cinsi içerisinde sınıflandırılarak, *C. pylori* olarak adlandırılmış, ancak hücre duvarı yağ asitleri, DNA zincir yapısı ve enzimatik aktivitelerindeki farklılıklar sebebi ile diğer helikobakter türleri ile birlikte 1989 yılında "*Helicobacter*" cinsi içerisinde yeniden sınıflandırılmıştır<sup>25</sup>.

Bakterilerin son sınıflandırmasında fenotipik özelliklerden çok, bakteri genomundaki (DNA) yüksek derecede korunmuş dizilerin, özellikle doğal evrimsel gelişimi gösteren 16S rDNA dizilerinin baz olarak alındığı genotipik yöntemler

kullanılmaktadır. *Campylobacter*ler, *Campylobacter*'lerle ilişkili diğer bakterileri ve isimlendirilemeyen *Campylobacter* benzeri mikroorganizmalar, Vandamme ve Ley (1991) tarafından, DNA-RNA hibridizasyon yöntemi, 16 S ribozomal RNA sekans analizleri ve immün tiplendirme teknikleri kullanılarak *Proteobacteria* takımı içerisinde "rDNA superfamily VI" adlı yeni bir filogenetik gruba dahil edilmiştir. Aynı araştırmacılar, Superfamily VI içerisindeki bakterileri, gösterdikleri filogenetik heterojeniteye göre, kendi aralarında üç RNA homoloji gurubuna ayırmışlardır. RNA homoloji I'de gerçek *Campylobacter*ler ve *Bacteroides ureolyticus*, rDNA homoloji II'de *Arcobacter* cinsi, rDNA homoloji III' de *Helicobacter* cinsi ve *Wollinella succinogenes* yer almaktadır. rDNA homoloji grup I ve II içerisindeki bakteriler filogenetik olarak yakın ilişkili olduklarından *Campylobacteraceae* familyası içerisinde yer almaktadır<sup>26</sup>.

Son olarak 2007 yılında revize edilen sınıflandırmaya göre *Campylobacter*ler tek bir genus içerisinde yerleştirilmiş olup genus 17 tür ve 8 alt tür içermektedir<sup>27</sup> (Tablo: 1)

**Tablo 1: *Campylobacter*'lerin sınıflandırılması<sup>27</sup>**

Domain: *Bacteria*

Phylum: *Proteobacteria*

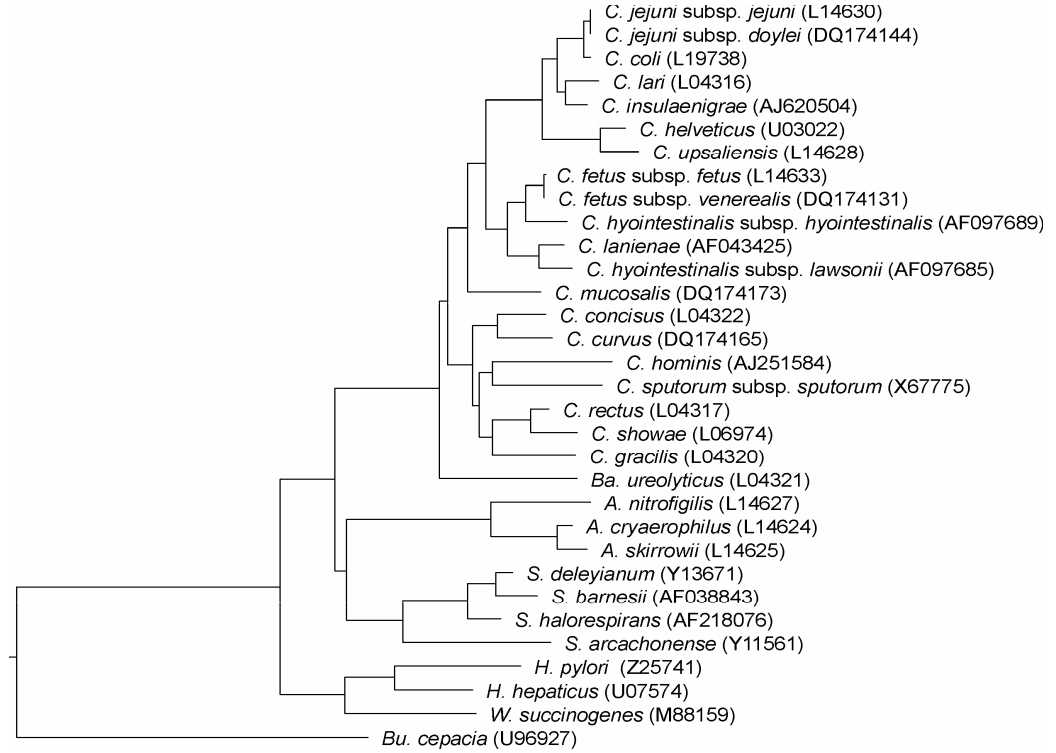
Class: *Epsilonproteobacteria*

Order: *Campylobacterales*

Family: *Campylobacteraceae*

Genus: *Campylobacter*

*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. (Şekil1)



Şekil 1: *Campylobacter* genusu ve filogenetik olarak yakın olan genuslar; *Arcobacter* (A), *Sulfurospirillum* (S), jenerik olarak yanlış sınıflandırılan türlerden *Bacteroides* (Ba) *ureolyticus* ile bazı *Helicobacter*, (H), *Burkholderia* (Bu), *Wolinella* (W) ve *Vibrio* (V) türlerinin 16S rDNA gen analizine göre filogenetik ilişkisi.<sup>27</sup>

Kampilobakter genusu içerisinde 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 türlerde yer almaktadır (Şekil 1).

Yine insanlardan ve hayvanlardan izole edilen *C.helveticus*, *C.hominis*, *C. insulaenigrae*, *C.lanienae*, *C. mucosalis* ve *C. sputorum* biovar *faecalis* türlerinin ise, henüz patojen olup olmadığı belirlenememiştir (Şekil 1).

## 2.3. Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri

### 2.3.1. Görünüm ve Boyanma

Kampilobakterler, 0.5-5 mikrometre uzunluğunda, 0.2-0.8 mikrometre genişliğinde, ince uzun, kıvrık, virgül veya spiral şeklinde gram negatif sporsuz basillerdir. Enfekte materyalden hazırlanan preparatlarda virgül, S veya birden çok bakterinin yan yana gelmesi sonucu oluşan uçan martı şeklinde görülebilirler. Katı besiyerinde üretilen yeni kolonilerden hazırlanan preparatlarda spiral veya flemantöz şekil daha belirgin iken, eskimiş kültürde veya yüksek oksijenli ortamda kokoid şekle “Dormand” dönüşebilirler. Polar veya bazı türlerde bipolar olabilen kılıfsız flajellaları ile oldukça hızlı hareketlidirler. Taze preparatlarda faz-kontrast veya karanık alan mikroskopunda tirbüşon tarzında hızlı hareketleri tipiktir<sup>28,29</sup>.

Kampilobakterler son derece fleksible olup 0,65 ve 0.45  $\mu\text{m}$ 'lik membran filtrelerden geçebilirler. Aside dirençsizdirler, alkalen-metilen mavisi, kristal viyole ve karbol fuksinle iyi boyanırlar. DNA 'larının G+C oranı termofilik türlerde % 30-36 diğer türlerde % 29-46'dır<sup>26,28</sup>.

### 2.3.2. Hücre Duvarı ve Antijenik Özellikleri

Kampilobakterlerin hücre duvarı diğer gram negatif bakterilerde olduğu gibi dışta lipoprotein tabaka, ortada lipopolisakkarit tabaka ve içte mukopeptid tabakadan oluşur. Dış membranda yer alan, fosforile glikolipitlerden oluşan Lipopolisakkarit (LPS) ya da Lipooligosakkarit (LOS) yapı, kampilobakter türlerinin, majör yüzey antijenlerini içermektedir. LPS tabakada yer alan ve tekrarlayan oligosakkarit ünitlerinin lineer birleşmesinden oluşan O-polisakkarit zinciri, anomerik konfügurasyonunda ve tekrarlayan şeker ünitelerinde değişiklikler göstererek O-antijenine özgünlüğünü kazandırmaktadır<sup>30</sup>. Ancak, klinik ve çevresel örneklerden elde edilen *C.jejuni*' suşlarının üçte ikisinde, hücre duvarında LPS yerine O-polisakkarit zinciri içermeyen, kor-oligosakkarit ve lipid A' dan oluşan ve bu nedenle daha düşük moleküler ağırlığa sahip olduğu bildirilen Lipooligosakkarid (LOS) yapı bulunur. Hem LPS hemde LOS un yapısında yer alan ve kısa hetero-şeker dizilerinden oluşan kor oligosakkaritleride antijenik varyasyonlar göstermektedir. Ayrıca, *C.jejuni*'nin bazı suşlarında kor oligosakkariti, diğer prokaryotlarda bulunmayan, insanda özellikle periferik sinir sisteminde GM1, GM1b, GD1a, GalNAc-GD1a ve GQ1b gibi

gangliositlerin yüzeyinde bulunan D- galaktoza bağlı N-asetil nöraminik asit (sialik asit) rezidüleri içermektedir. kampilobakter enfeksiyonu sırasında bakteriye ait bu antijenik determinantlara karşı gelişen antikor cevabı, sinir hücresi myelin tabakasındaki ganglioizid reseptörlerinin tahribine sebep olur. Böylece, Guillain-Barre sendromu (GBS) ve Miller-Fisher sendromu olarak tanımlanan periferik sinir hücrelerinde myelin kaybına bağlı olarak gelişen nörolojik komplikasyonlar ortaya çıkar<sup>31</sup>.

Kampilobakterlerin flagellasını oluşturan Flagelin adı verilen protein bir diğer önemli yüzey antijenidir. Kampilobakter enfeksiyonları sırasında, flageline karşı intestinal (IgA) ve serum (IgM, IgG) antikorlarının oluştuğu bildirilmektedir. Flagelline karşı gelişen immün cevabın kampilobakter enfeksiyonlarının önlenmesindeki önemi araştırılmaktadır<sup>32,33</sup>.

Kampilobakterlerin genomu üzerinde yapılan çalışmalarda, bazı *C.jejuni* suşlarının genomunda, *E.coli*'nin kapsül sentezinden sorumlu gen bölgesi (*kps*) ile benzer nükleotid dizilerinin yer aldığı gösterilmiştir. Bu benzerlik daha önce bilinenin aksine *C.jejuni*'nin kapsüllü olabileceğini düşündürmüştür. Daha sonra yapılan araştırmalarda fosfolipid ve tekrarlayan oligosakkarit ünitelerinden oluşan ve hücre yüzeyine zayıfça bağlanmış *C.jejuni* kapsülünün varlığı gösterilmiştir. Ayrıca *C.jejuni* kapsülünün farklı antijenik determinantlar içerdiği ve hatta daha önce hücre duvarında yer aldığı düşünülen ve Penner yöntemi ile belirlenen LPS yapıdaki ısıya dirençli antijenlerinde *C.jejuni* kapsülünde yer aldığı belirlenmiştir. Kampilobakter kapsülü antijenik özelliğin dışında bakteri için önemli bir virülans faktörüdür<sup>3,34</sup>.

*C.fetus* suşlarında diğer kampilobakter türlerinden farklı olarak, hücre yüzeyini kafes şeklinde örten, S-tabaka veya mikrokapsül olarak tanımlanan protein kapsül bulunur. Bu protein kapsül, kompleman C3b' ye bağlanmayı zayıflatarak, defektif fagositoza ve serum direncine yol açmaktadır<sup>35</sup>.

### 2.3.3 Genomik Özellikler

İlk olarak Parkhil ve arkadaşları tarafından, 2000 yılında, *C.jejuni* NCTC 11168 suşunun ardından RM 12-21 ve *C.jejuni* 81-176 suşlarının tam genom analizleri yapılmıştır. Daha kolay ve daha hızlı sonuç üreten DNA sekans analiz tekniklerinin ve multilocus sequence typing (MLTS) gibi çok sayıda gen bölgesini aynı anda belirleyebilen, yeni tekniklerin kullanılmaya başlaması ile klinik ve çevresel örnekten

elde edilen çok sayıda izolatin genomik farklılıklarının ortaya konması mümkün olmuştur. Bu çalışmalar kampilobakter genomunun, lateral gen transferleri ve homolog rekombinasyonlar sebebi ile son derece dinamik bir yapıya sahip olduğunu göstermiştir<sup>30,36</sup>.

Oldukça kompleks bir yapıya sahip olduğu belirlenen *C.jejuni* 'nin NCTC 11168' suşunun genomu 1,641,481 bp' uzunluğundadır ve 1654 açık okuma bölgesi (ORF) içermektedir. Genomun G+C ortalaması % 29±47'dir. Lipooligoosakkarit ve ekstraselüler polisakkarit (EPS) sentezinden sorumlu gen bölgelerinin G+C oranı ise nisbeten daha düşüktür<sup>36</sup>.

Dorell N. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada microarray yöntemi ile çevresel örneklerde elde edilen 11 *C.jejuni* suşunun genomu ile *C.jejuni* NCTC 11168 suşunun genomu karşılaştırılmıştır. Araştırmacılar incelenen 1654 gen bölgesinden 1300 nün tüm serotiplerde ortak olan tür spesifik genler-house keeping- olduğunu, 354 gen bölgesinin ise suş spesifik olup bir veya birden fazla serotipte bulunmadığını belirlemişlerdir. Aynı çalışmada tür spesifik genlerin biyosentetik ve metabolik işlemleri düzenleyen proteinleri ayrıca; flagellanın yapısal proteini, fosfolipaz A, PEB antijenik yüzey proteini, CiaB, CadF ve CheY proteinlerinin de aralarında bulunduğu önemli virulans faktörlerini kodladığı, suş spesifik genlerin ise flagella, LOS ve kapsül gibi yüzey lokalize yapıların modifikasyon sistemlerini kodladığı belirlenmiştir<sup>37</sup>. Leonard ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise yine benzer sonuçlar elde edilmiş, kampilobakter genomundaki majör varyasyonların, flagella, LOS ve kapsül gibi yüzey lokalize yapılarla, şeker transport ve modifikasyon sistemlerini kodlayan gen bölgelerinde olduğu gösterilmiştir<sup>38</sup>.

Başka bir genom çalışmasında ise *C.jejuni* NCTC 11168, *C.jejuni* RM 12-21 *C.jejuni* 81-176 referans suşlarının genom dizisi karşılaştırılmış, üç referans suşun hepsinin genomunda, Tip III sekresyon sistem (TTSS) komponentlerini kodlayan gen dizisi ile homolog nükleotid dizilerine rastlandığı, farklı olarak 81-176 suşunun Tip IV sekresyon sistemi ile homolog gen dizisi içeren ekstrakromozomal plazmit taşıdığı bildirilmiştir. Ayrıca, referans suşların, tekrarlayan DNA dizileri ve inserted sequence element (IS)'lerin varlığı yönündende farklılık içerdiği belirlenmiştir. Repetitive DNA dizileri ve inserted sequence elementler (IS) *C. jejuni* RM 12-21 ve *C. jejuni* 81-176

suşlarının genomunda tesbit edildiği halde *C.jejuni* NCTC 11168 suşunda gösterilememiştir<sup>30</sup>.

#### 2.4. Üreme ve Kültür Özellikleri

Kampilobakterler kapnofilik, mikroaerofilik mikroorganizmalar olup, en iyi 37°C'de % 5-10 CO<sub>2</sub>, % 5 H<sub>2</sub> ve % 85 N<sub>2</sub> içeren atmosferde, 48-72 saate ürerler. Atmosferdeki CO<sub>2</sub> miktarı türler arasında üremenin optimizasyonu için önemlidir. DNA sentezinde görevli oksijen bağımlı ribonükleotid redüktaz enziminin aktivasyonu için, % 5-15 O<sub>2</sub> konsantrasyonunda oksijene ihtiyaç duyan *C.jejuni* ortamdaki yüksek oksijen yoğunluğunda veya strik anaerop şartlarda üreyemez. Buna karşılık, *C.fetus*, *C.sputorum*, *C.concisu* ve *C.mucosalis* gibi bazı kampilobakter türleri, fumarat, aspartat veya nitrat gibi elektron akseptörlerinin varlığında, anaerop ortamda da üreyebilirler. Mikroaerofilik ortam desikatör içerisine mum yerleştirilmesi, anaerobik jarların havası alınıp yerine % 5 O<sub>2</sub>, % 10 CO<sub>2</sub> ve % 85 N<sub>2</sub> gaz karışımlarının verilmesi ya da günümüzde daha çok tercih edilen yöntem olan Campy-Pack, Campy-Gen v.d. gibi ticari olarak üretilen, kullanıma hazır, gaz üreten iyon zarflarının yerleştirilmesi ile sağlanır<sup>28</sup>.

*C.jejuni*, *C.coli* ve *C.lari* gibi insanlarda ishal oluşturan türler hem 37°C'de hem de 42°C'de üreyebilirler ve bu termofilik özellikleri sebebi ile diğer türlerden ayırt edilirler. Termofilik türlerin 35°C altında üremeleri oldukça yavaşlamaktadır. Mesela *C.jejuni* logaritmik üreme fazını 34°C'de 12 saatte, 30-34°C'de ise 48 saatte tamamlamaktadır<sup>39</sup>. Kampilobakterlerin neden olduğu enteritlerinin neredeyse tamamından termofilik türler sorumludur. Kültür plaklarının 42°C'de inkübasyonu ile dışkıda bulunan diğer kampilobakterler ve flora bakterilerinin üremesi baskılanırken termofilik türlerin izolasyonu kolaylaşmaktadır. Ancak, termofilik olmayan türlerinde izolasyonu isteniyorsa, örnekler iki besiyerine ekilip biri 37°C'de, diğeri 42°C'de mikroaerofilik ortamda inkübe edilmelidir<sup>40</sup>.

Kampilobakterlerin genomunun diğer bakterilere oranla daha küçük olması sebebi ile metabolik aktiviteleri, daha yavaş ve seçicidir. Kampilobakterler güçlü oksidaz aktivitesine sahip olmalarına rağmen, hegzoz şekerlerinin glikolizinde anahtar role sahip olan 6 -fosfofruktokinaz enzimleri yoktur. Bu sebeple, karbonhidratları oksidatif veya fermentatif yolla metabolize edemezler. Üreme için gerekli olan enerjiyi

trikarboksilik asit siklusundan elde ederler. Siklusa dahil ettikleri karbon ve nitrojeni aminoasitlerden ve atmosferdeki CO<sub>2</sub>'den sağlarlar. Trikarboksilik asit siklusu tamamlandığında hem biyosentetik bileşenlerin oluşumu hem de elektron transport zincirine elektron sağlanması gerçekleşir. Karbon metabolizmasının son ürünleri asetat, format ve laktattır<sup>41</sup>. Kampilobakter türleri arasında, trikarboksilik asit siklusunun tam ya da kısmi olarak gerçekleşmesi bakımından farklılıklar vardır. Metabolik defekt sebebi ile in vitro şartlarda adi besiyerlerinde üretilmeleri son derece zordur. Üremenin optimizasyonu için besiyerine 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 sodyum 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<sup>42,43</sup>.

Dışkı gibi polimikrobiyal floraya sahip örneklerden kampilobakterleri izole ederken, metabolik aktiviteleri yüksek olduğu için daha hızlı ve bol miktarda üreyen diğer bağırsak bakterilerinin varlığı sebebi ile, üretme besiyerlerinin sadece metabolik yönden optimizasyonu yeterli olmaz. Örnekdeki istenmeyen flora bakterileri, örneğin ya 0.45 ve 0.25µm çaplı membran filtrelerden süzülmesi ile veya üretme besiyerlerinin içerisine Basitrasin, Sefalotin, Sefazolin, Kolistin, Novobiosin, Polymiksin, Rifampisin, Trimethoprim ve Vankomisin gibi kampilobakterlerin dirençli, diğer bağırsak bakterilerin ise duyarlı oldukları antimikrobik veya antimikrobikkarışımları ilave edilerek, örnekten uzaklaştırılır<sup>40</sup>.

Kan ve steril vücut sıvıları gibi florası olmayan örneklerden kampilobakterlerin izolasyonu için seçici besiyerine gerek yoktur. Bu amaçla kan kültür şişeleri, kanlı besiyeri ya da çukulatamsı besiyeri kullanılabilir<sup>44</sup>.

Örnekler uygun besiyerlerine ekildikten sonra besiyerleri 24-48 saat mikroaerofilik atmosferde inkübasyona bırakılır. Süre sonunda mukoid, saydam, hemoliz yapmayan, birbirine karışma eğilimindeki kampilobakter kolonileri gözle görülür hale gelmektedir. Ancak, besiyerlerinin özellikleri koloni morfolojisini

etkilemektedir. Nem oranı düşük besiyerlerinde 1-2 mm çapında, düzgün, granüler tarzda, gri veya kahverengi renkte, parlak koloniler oluşurken, nem oranı yüksek besiyerlerinde, çapı 10 mm'ye kadar ulaşabilen, basık, yaygın, düzensiz kenarlı ve gri renkte koloniler oluşmaktadır. Kan kültür şişelerinde, kampilobakterlerin üremesine bağlı bulanıklık grlemeyebileceğinden, mikroskopik değerlendirme yapılmadan kültürde üreme olmadığına dair rapor verilmemelidir. Ayrıca, şüpheli olgularda, inkübasyon süresi iki haftaya kadar uzatılmalıdır<sup>28,44</sup>.

Kampilobakterler besin yetersizliği, yüksek ya da düşük sıcaklık ve aerop ortam gibi olumsuz şartlarda, mikroskopta kokoid şekilde görülen canlı fakat kültüre edilemeyen VBNC (Viable but non-culturable) formuna dönüşmektedir. *C.jejuni* evreye adaptasyonunu sağlayan VBNC formuna, *C.coli*'ye göre de daha hızlı dönüşmekte ve bu formda, yüzey sularında uzun süre bulunabilmektedir. Ancak, kültür plağındaki kampilobakterlerin tümü kokoidal forma dönüştüğünde, pasajlandıklarında retilenmemektedir. Ancak, 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<sup>45</sup>.

## 2.5 Biyokimyasal zellikleri

*C.gracilis* hariç, kampilobakter'lerin tamamı oksidaz pozitifdir. Yine katalaz negatif ya da zayıf katalaz reaksiyonu gösteren *C. upsaliensis* hariç, hepsi katalaz pozitifdir. Kampilobakterler jelatini ve üreyi hidroliz etmezler. Lipaz aktiviteleri yoktur. Karbonhidratları kullanamadıkları için Voges proskauer ve metil red testleri negatiftir. Diğer enterik bakterilerin çoğunda olduğu gibi nitratları redükte ederler. Pigment üretmezler<sup>28</sup>.

Kampilobakterlerin identifikasyonunda % 1 glisin ve % 3,5 NaCl varlığında üreyebilme, TSI agarda H<sub>2</sub>S oluşturma, nitrat redüksiyonu, hippuratın hidrolizi ve ısı tölerans testleri gibi sınırlı sayıdaki fenotipik özellikten yararlanılmaktadır<sup>46</sup> ( Tablo 2).

**Tablo 2: Kampilobakter türlerinin fenotipik özelliklerine göre tanımlanmaları** <sup>28</sup>

| Mikroorganizma                            | Katalaz  | Nitrat | H <sub>2</sub> S (TSD) agar | Ureaz | İndoksil asetat | Hipurat hidrolizi | Üreme |       |       |           |            | Duyarlılık |            |                 |           |
|-------------------------------------------|----------|--------|-----------------------------|-------|-----------------|-------------------|-------|-------|-------|-----------|------------|------------|------------|-----------------|-----------|
|                                           |          |        |                             |       |                 |                   | 25° C | 37° C | 42° C | MacConkey | % 0.1 TMAO | % 1.5 NaCl | % 1 Glisin | Nalidiksik asit | Sefalotin |
| <i>C. coli</i>                            | +        | +      | -                           | -     | +               | -                 | -     | +     | +     | +         | -          | -          | +          | S               | D         |
| <i>C. concisus</i>                        | -        | +      | +                           | -     | -               | -                 | -     | +     | +     | +         | -          | +          | +          | R               | R         |
| <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>       | +        | +      | -                           | -     | -               | -                 | +     | +     | d     | +         | -          | d          | +          | R               | S         |
| <i>C. fetus</i> subsp. <i>veneralis</i>   | +        | +      | -                           | -     | -               | -                 | +     | +     | -     | +         | -          | -          | -          | R               | S         |
| <i>C. hyointestinalis</i>                 | +        | +      | +                           | -     | -               | -                 | +     | +     | +     | +         | +          | -          | +          | R               | S         |
| <i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>     | +        | +      | -                           | -     | +               | +                 | -     | +     | +     | +         | -          | -          | +          | S               | R         |
| <i>C. fetus</i> subsp. <i>doylei</i>      | +        | -      | -                           | -     | +               | +                 | -     | +     | w     | N A       | -          | -          | +          | S               | S         |
| <i>C. lari</i>                            | +        | +      | -                           | -     | -               | -                 | -     | +     | +     | +         | +          | +          | +          | R               | R         |
| <i>C. mucosalis</i>                       | -        | +      | +                           | -     | -               | -                 | +     | +     | +     | +         | C          | -          | +          | D               | S         |
| <i>C. sputorum</i> biovar <i>bubulus</i>  | -        | +      | +                           | -     | -               | -                 | -     | +     | +     | -         | +          | +          | +          | D               | S         |
| <i>C. sputorum</i> biovar <i>fecalis</i>  | +        | +      | +                           | -     | -               | -                 | -     | +     | +     | +         | +          | +          | +          | R               | S         |
| <i>C. sputorum</i> biovar <i>sputorum</i> | -        | +      | d                           | -     | -               | -                 | -     | +     | +     | +         | C          | d          | +          | D               | S         |
| <i>C. upsaliensis</i>                     | w veya - | +      | -                           | -     | +               | -                 | d     | +     | +     | -         | -          | -          | d          | S               | S         |

+= % 90 ve daha fazlası pozitif; -=% 90 ve daha fazlası negatif; d= % 11-89'u pozitif; ++= Güçlü pozitif reaksiyon; w= zayıf reaksiyon; NA= veri yok; C= literatürlerde çelişkili raporlar; R= dirençli; S= duyarlı; TMAO= trimethylamine oksit.

## 2.6. Fiziksel ve Kimyasal Etkenlere Duyarlılık

Kampilobakterler diğer gram negatif bakterilere göre fiziksel ve kimyasal ajanlara karşı son derece duyarlıdır. Doğrudan güneş ışınları ile maruziyet, serbest oksijen konsantrasyonu, kuruluk ve ısı değişimleri gibi fiziki olumsuzluklar ile, yüksek ve düşük pH ( $pH > 7.8$  veya  $pH < 4.5$ ), % 1 lik, Sodyum hipoklorit, % 70'lik ethanol, %0,5'lik gluteraldehit, % 2'lik formaldehit, % 0,5 lik iyot ve % 0,5'in üzerindeki NaCl gibi, kimyasal ajanların düşük konsantrasyonları mikroorganizmayı kısa sürede inaktive eder. Her ne kadar termofilik kampilobakter suşları 30°C altında üreyemezlerse de güneş ışığı ile direkt temasın olmadığı ve kimyasal dezenfektan içermeyen sularda ve gıda örneklerinde 4°C'de bir hafta, - 20 °C' de üç ay, piliç etinde -18C'de 2 ay,-20 C'de 12 hafta, -15 C'de 30 hafta canlılıklarını korurlar. Kampilobakterlerin büyük baş hayvanların yaşadıkları bataklıklarda 4°C'de 41 gün, 37°C'de 7 gün canlı kaldıkları bildirilmiştir.<sup>47</sup> Kampilobakterlerin düşük ısıya duyarlı olmalarına rağmen, doğal sularda uzun süre yaşayabilmeleri, bu sulardaki diğer fermentatif mikroorganizmaların ürünü olan format ve maleat'ı solunumlarında, substrat olarak kullanabilmeleri ile açıklanmıştır. Bu bağlamda, kampilobakterlerin doğal sulardaki yaşam süreleri, düşük redoks potansiyeli, moleküler oksijen miktarı, suyun sıcaklığı ve UV ışınlarından etkilenmektedir. Yüksek ısıya son derece duyarlı olan kampilobakterler katı ve sıvı gıdalar içerisinde 60 °C de kısa sürede inaktif hale gelirler. Yine standart şartlarda klorlanan içme suyu ve pastörize edilmiş süt içerisindeki kampilobakterler hızla ölürler<sup>48</sup>.

Kampilobakterler, makrolidler ve kinolon grubu antimikrobiklere genellikle duyarlı, sefalothin, sefaperazon, sefazolin gibi sefalosporin grubu antimikrobiklerle trimethoprim karşı dirençlidirler. *C.lari* suşlarında nalidiksik asite de direnç tanı koydurucu olup onun diğer termofilik türlerden ayırt edilmesinde kullanılır<sup>49</sup>.

Ancak, biyofilm içerisindeki kampilobakterler olumsuz çevre şartları, antimikrobik ve dezenfektanlardan korunurlar. *C. jejuni*'nin biyofilm içerisinde dormant "VBNC" formunda bulunabileceği bildirilmiştir<sup>50</sup>.

## 2.7. Kampilobakter Enfeksiyonları (Kampilobakteriozis)

Kampilobakteriozis, insanlarda termofilik kampilobakter türlerinin sıklıkla fekal oral yolla bulaşı sonucu ortaya çıkan ve basit sekretuar tip bir ishalden kanlı, mukuslu

gaita çıkarımı ile karakterize bazen fatal seyreden dizanterik formda ishaller kadar değişen klinik formlarda seyreden bir enfeksiyon hastalığıdır<sup>51</sup>.

### 2.7.1. Enfeksiyonun Bulaşması

Kampilobakter enfeksiyonları fekal oral yolla bulaşır. Enfeksiyonun kaynağı % 80-85 oranında enfekte hayvanların et, yumurta ve süt gibi enfekte ürünleri ile bu hayvanlara ait intestinal çıkartılar ile kontamine olmuş gıda ve sulardır. Ev içi yakın temas ile hayvandan insana direkt ya da özellikle asemptomatik taşıyıcılığın yüksek olduğu tropikal bölgelerde insandan insana fekal- oral yoldan bulaş da bildirilmiştir<sup>52</sup>. Tüm yiyecekler içinde özellikle tavuk eti bulaşmadan en çok sorumlu tutulan gıdadır. Enfeksiyon kampilobakterle kontamine az pişmiş etin yenmesi ve çiğ ete temas eden ellerin ağıza götürülmesi ile bulaşabilmektedir. Amerika’da, marketlerde satılan kullanıma hazır tavuk etlerinin % 95’inin, İngilterede % 83’ünün, İsveç’te ise tamamının *C.jejuni* ile kontamine olduğu bildirilmiştir<sup>53,54</sup>. Ayrıca çiğ etle aynı ortamda bulunan ve çapraz olarak kontamine olmuş salata, ekmek gibi besinlerde enfeksiyon kaynağı olabilmektedir<sup>55</sup>.

Düşük metabolik aktivitelerinden dolayı kampilobakterlerin diğer gıda kaynaklı gastroenterit etkenleri gibi yiyecekler içerisinde kolay üreyemediği bu nedenle salgınlardan çok sporadik enfeksiyonlara yol açtığı bildirilmektedir. Salgınlar genellikle bahar aylarında kontamine su ve süt tüketimi ile ortaya çıkmakta, sıklıkla aile içi seyretmekte, nadiren büyük toplulukları etkilemektedir.

Süte genellikle sağıım esnasında kontamine dışkıdan, nadiren eroze olmuş mastitli memeden bulaşan kampilobakter türü mikroorganizmalar, insanlara kontamine sütlerin çiğ olarak ya da iyi pastörize edilmeden tüketilmesi sonucu bulaşmaktadır. Son yıllarda, tüm dünyada, süt kaynaklı çok sayıda kampilobakter salgını bildirilmiştir<sup>56</sup>.

Kampilobakterin sebep olduğu ishal salgınlarında diğer bir kaynak kampilobakterle kontamine içme sularıdır. Son yıllarda içme sularından kaynaklanan çok sayıda kampilobakterlere bağlı ishal salgınları bildirilmektedir. Bu salgınlara atık su borularının içme suyu borularına yakın olması, içme sularının klorlama işleminin hatalı yapılması veya klorlama işleminin yapılmaması sebep olmaktadır. Nitekim yeraltı sularının işlenmeden tüketiminin çok olduğu İsveç, Norveç ve Finlandiya gibi kuzey

Avrupa ülkelerinde, su kaynaklı *C.jejuni* enfeksiyonlarının daha sık görüldüğü bildirilmektedir<sup>57</sup>.

DSÖ, kampilobakter salgınları ile ilgili yaptığı bir araştırmada; 1978 ile 2003 yılları arasında ortaya çıkan kampilobakterlere bağlı salgınları, literatürler ve Uluslar arası halk sağlığı kurumlarının verileri ışığında değerlendirmiştir. Toplam 907 kampilobakter salgınının belirlendiği bu araştırmada, salgınlar, kaynağına göre; kümes hayvanları ve ürünleri, sığır veya domuz eti, et ürünleri, deniz ürünleri, süt, su, hazır gıdalar, kaynağı belirlenemeyen salgınlar olmak üzere belirli başlıklar altında kategorize edilmiştir. Bu salgınların % 60'ında salgının kaynağı belirlenememiş, kaynağı belirlenen salgınlar içerisinde ise en sık olarak süt ve su kaynaklı salgınların görüldüğü tesbit edilmiştir<sup>58</sup>.

### **2.7.2. Virulans Faktörleri ve Patogenez**

En önemli insan patojeni olan *C.jejuni*'nin NCTC 11168 suşunun tam genom analizi yapılmış olmasına rağmen kampilobakterlere ait virulans faktörleri ile kampilobakter enfeksiyonlarının patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır. Kampilobakter türlerinin genomik yapılarının, yüksek düzeyde tür içi varyasyonlar göstermesi ve uygun hayvan modellerinin olmayışı virulansla ilgili faktörlerin tespitini zorlaştırmaktadır<sup>59</sup>. Fekal oral yolla bulaşan kampilobakterler duyarlı kişilerde öncelikli olarak ileum ve jejunum epiteli olmak üzere bağırsak epiteline kolonize olarak, akut lokalize inflamatuvar cevaba yol açmaktadır. Sekretuar tip ishal tablosuna yol açan inflamatuvar cevap, uzayan enfeksiyonlarda, epitel hasarının da tabloya eklenmesi ile hastanın kliniğini dizanterik forma dönüştürebilmektedir. Hastalığın prognozu, kampilobakter suşunun virülansı kadar konağın duyarlılığından da etkilenmektedir<sup>60</sup>.

Fekal oral yolla alınan kampilobakterlerin mideden enfeksiyon oluşturacakları intestinal sisteme geçişleri, midenin düşük pH'sı ve içerikteki nitroze edilebilen aminler tarafından engellenir. Kampilobakterlerin mide asitine diğer bağırsak patojenlerinden daha duyarlı olduğu, duyarlılık oranının da suşlar arasında farklılık gösterdiği in-vitro şartlarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Murphy ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada klinik örneklerden izole ettikleri bazı *C.jejuni* suşlarının, referans suş olan *C.jejuni* 81116 ve *C.jejuni* NCTC 11351 suşlarına göre düşük pH'ya karşı daha dirençli olduklarını göstermişlerdir<sup>61</sup>. *C.jejuni* ve diğer kampilobakter türlerinin mideden

intestinal sisteme geçişine engel olan bir diğer bakterisidal maddede nitrik oksittir. Gıda yolu ile alınan proteinlerdeki aminler düşük mide pH'ında nitroze edilebilen aminlere dönüşerek nitrik oksid radikalleri oluşturular. Kampilobakterler metabolik yolla oluşan bu nitrostativ strese hızla ölürler. Ancak, bazı *C.jejuni* ve *C.coli* suşlarının, nitrik oksit varlığında sentezlenen ve mikroorganizmanın nitrostativ strese karşı direncini artıran single domain globulinlerle homolog, Cgb, proteinlerine sahip olduğu, *cgb* mutanları suşların nitrik okside duyarlı oldukları gösterilmiştir<sup>62</sup>. Böylece suşların mide asidine karşı direnç farklılıkları ve Cgb üretebilme yetenekleri kampilobakter enfeksiyonlarının prognozunu belirleyen en önemli iki faktördür. Nitekim, fekal-oral yolla bulaştan sonra enfeksiyon gelişimi için 450-500 cfu mikroorganizmanın yeterli olduğu bildirilmiş olmakla birlikte, bu sayının mideden duodenuma geçen bakteri sayısını gösterdiği, enfeksiyon oluşumu için gerekli olan bakteri sayısının en az 10.000 cfu bakteri olması gerektiği farklı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir<sup>61</sup>.

Mideden duodenuma geçen *C.jejuni* ' buradada oksijen yoğunluğu düşük, yüksek osmolariteli, sınırlı demir ve bakterisidal etkili safra tuzları içeren olumsuz şartlara maruz kalmaktadır. Ancak, *C.jejuni* ve *C.coli* 'nin bir çok suşunda, çoklu ilaç dirençli bakterilerde görülen, multidrug ABC (ATP Binding Casser) transporter sistemin homoloğu olan, Cme ABC multidrug efluks pump 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. Cme sekresyon sistemi proteinlerinin inhibisyonu halinde *C.jejuni* 'nin safraya duyarlılığının 4.000 kat arttığı gösterilmiştir<sup>63</sup>.

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 flajellası etkilidir. Flajellasını 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. CadF (Campylobacter adesion to fibronectin) kampilobakterlerin fibronectin reseptörlerine ( $\alpha 5\beta 1$  integrin) bağlanmasını sağlayan 37 k-Da'luk dış membran proteindir<sup>59,64</sup>.

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 Cad F'den başka henüz isimlendirilmemiş iki tane daha fibronectin bağlayan protein belirlenmiştir. Bir diğer adeziv protein olan periplasmic binding protein PEB1; gram negatif bakterilerdeki aminoasit transport proteinlerine benzeyen, 28 k-Da 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<sup>65</sup>. 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 azalttığı 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<sup>66</sup>.

*C.jejuni*'nin intestinal epitele adezyonunda adeziv proteinlerin yanı sıra, *C.jejuni* lipopolisakkarit tabakasının ve kapsülünde etkili olduğu, kapsül sentez geni mutasyona uğratılmış *C.jejuni* 81116 suşunun, intestinal epitele adezyonunun önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir. *C.jejuni*'nin kapsülü, adezyon görevi dışında, mukoza hücrelerinden salınan defensin 1 ve lizozim gibi antimikrobial peptidlere karşı mikroorganizmanın direncini de artırmaktadır<sup>30,67</sup>.

Kampilobakterlerin intestinal epitele adezyonu sonrasında intestinal epitelde inflamatuvar cevaba yol açması, epitelyum kesitlerinde lamina propriada bakterilerin gösterilmesi ve bakteriyeminin görülmesi, araştırmacılara bakterinin intestinal epitele invaze olduğunu düşündürmüştür. Bu gözlemler sonrasında *C.jejuni*'nin hücreye nasıl invaze olduğu ve invazyonu etkileyen bakteriye ve konağa ait faktörler hücre kültürü ve hayvan modelleri ile ortaya koyulmaya çalışılmıştır. Bu çalışmaların birçoğu Cia (Campylobacter invasion antigen) proteinleri olarak adlandırılan bir grup proteinin kampilobakterlerin hücreye invazyonu için gerekli olduğunu göstermiştir. Nitekim ilk

kez Konkel ve arkadaşları tarafından tanımlanan, 73.2 kDa'luk CiaB proteinin invazyon için gerekli olduğu, *ciaB* geninin mutasyonunda *C.jejuni*'nin hücreye invaze olamadığı tesbit edilmiştir<sup>30,67</sup>.

*C.jejuni* suşlarının intestinal hücreye invazyon yeteneği plazmidlerle kodlanan tam olarak tanımlanamamış bir dizi genetik faktör tarafından da etkilenmektedir. İlk defa çiğ süt kaynaklı salgın sırasında bir gurup çocuktan elde edilen *C.jejuni* 81-176 suşunun intestinal epitele invazyon yeteneği diğer türlerden daha fazla bulunmuştur. Bu suşun, avirulan *C. jejuni* NCTC 11168 suşunda olmayan pTed ve p Vir adlı iki büyük plazmit taşıdığı gösterilmiştir. Bu plazmidlerden pVir'in epitel hücreye invazyonda etkili olduğu in-vitro olarak ispatlanmıştır. Yapılan klinik çalışmalarda, gaita örneklerinden izole edilen *C.jejuni* suşlarının %19-53 oranında bu plazmiti taşıdığı ve pVir taşıyan suşlarla görülen intestinal kolonizasyonun daha yüksek oranda dizanteriye yol açtığı gösterilmiştir<sup>30</sup>.

Kampilobakterlerin patogeneğinde bakterinin enterotoksin üretimi önemli bir başka tartışma konusudur. İlk çalışmalarda, bazı *C.jejuni* suşlarının Shiga like toksin, *Vibrio cholerae* ve *E.coli*'nin Labil Toksinine (LT) benzer toksinler ürettikleri ileri sürülmüştür. Ancak, kampilobakter enteritlerinde bu toksinin ishal gelişimi üzerine etkisi tam olarak belirlenememiştir<sup>68</sup>. Daha önce, *Salmonella Helicobacter* ve *Escherichia coli*' türlerinde gösterilen ve ökaryot hücrelerde hücre siklusunu G2/M fazında inhibe ederek hücre ölümüne neden olan Cytolethal Distending toksinin (CLDT) *C.jejuni* suşları tarafından da üretildiği gösterilmiştir. CLDT'nin kolonik immatür kript hücrelerini yıkıma uğratarak kolon lümenine yoğun sıvı kaçışına yol açtığı bilinmektedir. *C.jejuni*'nin CLDT'i, CdtA, CdtB, CdtC subünitlerinden oluşur. Hücre membranına lokalize bu subünitlerin, *C.jejuni*'nin adezyonu ve intestinal epitelden salınan ve nötrofillerin inflamatuvar bölgeye göçünü indükleyen IL-8'in üretimi için gerekli olduğu gösterilmiştir. Diğer taraftan aktif subünit olan CdtB nin memeli hücrelerindeki DNase I ile homoloji gösterdiği bildirilmiştir. İntestinal epitel hücre protein kinazları tarafından algılanan CLDT ve hücre duvarı LPS'i IL-1 proβ'nın aktivasyonuna yol açmaktadır. IL-1 proβ proteazlar tarafından kesilerek IL-1β ya dönüşmekte ve NF-κB'yi uyarmaktadır. NF-κB ise nükleusda güçlü proinflamatuvar kemokin olan IL-8 sekresyonunu uyarak, iltahabi cevabı başlatır. İnflamasyon bölgesine toplanan inflamatuvar hücrelerin sekrete ettikleri sitokinler ve antikörlerle bir

tarafından mikroorganizma fagositozla yok edilmeye çalışılırken diğer taraftan hücreler arası desmosomlar kesilerek epitel bütünlüğü bozulur. Bunu takiben önce enterositlerin basolateral membranda yer alan Gangliosid (GM1) reseptörleri uyarılır, hücre içi cAMP konsantrasyonu artar, CFTR kanallar açılır ve Cl<sup>-</sup> ile birlikte inter/intrasellüler su lümene pompalanır ve sekretuvar tip ishal şekillenir. Daha sonra *Kampilobakter* türleri ya inflamasyona bağlı olarak açılan intersellüler aralıklardan "paraselüler" ya da invaze oldukları hücreyi lizis ile parçalayarak "transsellüler" yolla lamina propriaya transloke olurlar. Bu dönemde ishal dizanterik forma dönüşür. *C.jejuni* lamina propria'ya invaze olduktan sonra nadiren enteroportal yolla dissemine enfeksiyona yol açabilir<sup>30</sup>. Bakteriyemi sıklıkla *C.fetus* enfeksiyonları sonrasında görülür. *C.fetus* suşlarının yüzeyinde yer alan S-protein, mikroorganizmayı serumun bakterisidal etkisine karşı korumakta, bu nedenle *C.fetus* enfeksiyonlarında sonra bakteriyemi daha sık gelişmektedir<sup>28</sup>.

### 2.7.3.Yaptığı Hastalıklar

Hem hayvanlarda hem de insanlarda hastalık yapabilen *kampilobakter* cinsi bakteriler, insanlarda çoğu kez kendikendini sınırlayan, basit sekretuvar tip ishalla 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<sup>3</sup>. 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<sup>69</sup>. Genellikle sekretuvar tipde başlayan ishal vakaların yaklaşık olarak %30'unda kanlı ve mukuslu dizanterik forma dönüşebilmektedir. Bazı hastalarda günde 8 veya daha fazla dışkılama görülebilmektedir<sup>15</sup>. *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.<sup>70</sup> *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 ila bir ay süreyle dışkıdan atıldığı bildirilmektedir<sup>71</sup>. Kampilobakter enteritlerinin ardından, özellikle İmmün 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<sup>7</sup>.

Kampilobakter enfeksiyonlarından sonra Guillain Barre sendromu, hemolitik üremik sendrom, interstisyel nefrit, IgA nefropatisi, reaktif artrit, bursit, eritema nodozum gibi geç başlangıçlı, non enfeksiyöz komplikasyonlar da görülebilmektedir<sup>7</sup>.

Periferal polinöropatiler grubu içerisinde yer alan Guillain-Barre Sendromu (GBS), Periferik Sinir Sisteminin, Otonom Sinir Sisteminin ve Kranial Sinirlerin, akut başlangıçlı progresif seyirli, inflamatuvar hastalığıdır. 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'unu önemli bir halk sağlığı sorunu haline getirmektedir. GBS'nun periferik sinirlerin antijenik proteinlerine karşı antikor üretimi sonucu gelişen otoimmün bir hastalık olduğu, başta *Campylobacter jejuni* olmak üzere *Mycoplasma pneumoniae*, *Escherichia coli*, Cytomegalovirus, Epstein-Bar virus, Human immunodeficiency virus (HIV), Influenza virus, Cocksackie virus, Herpes simplex virus, Hepatit A ve C virus gibi enfeksiyon ajanların, aşılama ve cerrahi girişimlerin bu antikorların yapımını tetiklediği düşünülmektedir. Nitekim, GBS'lu olguların % 50-70'inde nörolojik semptomlar, gastroenterit, solunum yolu enfeksiyonu veya aşılamadan 2 ila 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<sup>72</sup>.

*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<sup>49</sup>.

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<sup>69</sup>.

#### **2.7.4. Kampilobakter Enfeksiyonlarında Tanı**

Gerek sekreter 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. Diğer taraftan makrolid grubu antibiyotiklere duyarlı olduğu bilinen kampilobakterlerde değişen antimikrobik duyarlılık paterninin izlenebilmesi içinde bakterinin klinik örneklerden izolasyonu gereklidir. Kampilobakter enfeksiyonlarının tanısı, ya dışkı örneklerinde, mikroorganizmanın izolasyonu, mikroorganizma genomuna ait spesifik dizilerinin ya da mikroorganizma antijenlerinin gösterildiği direkt yöntemlerle veya hasta serum ve sekresyonlarında *C.jejuni*-spesifik antikorların arandığı serolojik testlerle yani indirekt yöntemlerle konmaktadır<sup>49</sup>.

##### **2.7.4.1. Direkt Tanı Yöntemleri**

Amaç klinik materyallerde kampilobakterleri fresh veya boyalı preparatlarda göstermek, bakteriyi uygun besiyerlerinde izole ederek identifiye etmek ve bakteriye ait spesifik gen bölgeleri veya antijenleri göstermektir<sup>73</sup>.

##### **2.7.4.1.1. Örnek Alınması**

Kampilobakter gastroenteritlerinde klinik materyal dışkı veya rektal sürüntüdür. Ancak bakteriyemi halinde mikroorganizmanın kan kültüründe izolasyonu tanıya yardım eder. İshalli hastalardan klinik örnekler, antimikrobik tedavisine başlanmadan önce, özellikle dışkı örnekleri hastalığın başladığı ilk 4 gün içinde alınmalıdır. Klinik materyal dışkı

ise, taze dışkının kanlı mukuslu yerlerinden 2-3 gr kadar örnek alınmalıdır. Alınan örnekler 1-2 saat gibi kısa bir süre içerisinde değerlendirilecekse, dışkı örneği, temiz, deterjan ve dezenfektanla kontamine olmayan, geniş ağızlı, kapaklı ve sızdırmaz bir kap içerisine alınarak oda ısısında taşınmalıdır. Şayet klinik materyal olarak rektal sürüntü örnekleri kullanılacaksa, rektal sfinkterden 2-3 cm içeri sokulan eküviyon rotasyonel hareketler yaptırılarak kriptlerle temas ettirilmelidir. Daha sonra yine rotasyonel hareketlerle rektumdan çıkartılan eküviyon yukarıda tanımlanan taşıma kabı içerisinde laboratuvara ulaştırılmalıdır<sup>74</sup>.

Örneklerin laboratuvara transferi ve işlenmeleri 2 saatten daha uzun sürecektse, alınan örnekler modifiye Cary Blair taşıma besiyerine alınmalı ve laboratuvara ulaştırılincaya kadar 4°C’de korunmalıdır. Her ne kadar ilk bir iki günden sonra seçici besiyerine yapılan ekimlerde mikroorganizmanın izolasyon şansı büyük oranda azalmaktaysada kampilobakter türleri Carry-Blair taşıma besiyerinde +4°C’de 2 hafta canlı kalabilmektedir. Modifiye Carry blair besiyeri dışında, Amies besiyeri, Stuart besiyeri ya da kömür tozu içeren yarı katı besiyerleri de taşıma besiyeri olarak kullanılabilir. Kampilobakterle enfekte hastalar dışkılarında 10<sup>6</sup>-10<sup>9</sup> CFU/gram gibi yüksek miktarlarda mikroorganizma bulundurdıklarından genellikle ön zenginleştirme yöntemlerine gerek yoktur. Ancak, bakteri atılımının az olduğu akut dönemi geçirmiş hastalarda izolasyon şansını artırmak için Preston, Campy-thio gibi zenginleştirici besiyerlerinin kullanılması önerilmektedir<sup>73</sup>. Dışkı örneklerinden kampilobakter suşlarının izolasyon şansı örnekteki bakteri sayısı ve taşıma şartları kadar bir hastadan alınan örnek sayısına bağlı olarak da değişir. Çoklu örnek alımı kampilobakterlerin izolasyon şansını artırmaktadır<sup>49,74</sup>.

#### **2.7.4.1.2. Mikroskopik İnceleme**

Klinik materyal taze preparasyonlarla veya boyalı preparasyonlarla karakteristik kampilobakter hareket veya görünümünün tespiti açısından değerlendirilmelidir. Dışkı ve rektal sürüntü örneği alındıktan sonraki ilk iki saat içinde, karanlık alan mikroskobu veya faz-kontrast mikroskobunda incelenir. Bu incelemede kampilobakterlerin tirbuşon tarzında, hızla hareket eden ve batıp çıkan tarzdaki tipik hareketlerinin görülmesi tanıya yardım eder. Direkt mikroskobide bol eritosit ve nötrofillerin görülmeside dizanterik form için yardımcı bulgu olarak değerlendirilebilir. Bazı araştırmacılar tanı maliyetini

düşürmek için, direkt mikroskopik incelemede lökosit pozitifliği tesbit edilen gaita örneklerinin selektif kültürünün yapılmasını önermektedir. Ancak dışkıda lökositlerin varlığı kampilobakter enfeksiyonu ihtimalini artırmakla birlikte, lökositlerin olmaması hastalığı ekarte ettirememektedir. Diğer taraftan dışkının kanlı mukuslu bölgelerinden alınan materyalden hazırlanan ve alkolle tespit edilen preparatlar, Gram'ın boyası veya sadece % 1'lik bazik fuksin ile boyanarak; soluk pembe renkte, martı kanadı, S veya virgül şeklindeki tipik morfolojik özelliklere sahip kampilobakterlerin varlığı yönünden incelenir. Kampilobakter enfeksiyonlarında, direkt mikroskopiye ait yöntemlerin duyarlılığı çeşitli yayınlarda % 66-94 olarak bildirilmektedir<sup>49,75</sup>.

#### **2.7.4.1.3. Kültür Ortamında İzolasyon**

Kampilobakter türleri bağırsak flora elemanlarından daha geç ve güç ürer. Bu sebeple kolay üreyerek kültür plağına hâkim olan flora bakterilerinin kültür ortamından elimine edilmesi için örnekler ya direkt selektif besiyerine ekilmeli ya da membran filtrasyon yönteminde olduğu gibi 0.65 µm çaplı selüloz asetat filtrelerden süzildükten sonra süzütünün veya süzüntü 0.45-0.25 µm membran filtreden tekrar süzildükten sonra membranın uygun besiyerlerine koyulması sureti ile ekim yapılmalıdır<sup>76</sup>. Ancak dışkı florasında bulunan *Proteus* gibi hareketli bakterilerde filtreden kolayca geçtiğinden membran filtrasyon yöntemi ile kampilobakterlerin izolasyon şansı seçici kültür yöntemine göre daha düşüktür. Ancak bu yöntemde filtreden süzülen dışkı kanlı agar yerine seçici besiyerlerine ekildiğinde yöntemin başarısı artmaktadır<sup>77</sup>.

#### **I- Kampilobakter İzolasyonunda Kullanılan Besiyerleri**

Kampilobakterin dışkı ve rektal sürüntü gibi karışık floralı örneklerden izolasyonunda, Brucella Agar, Blood Agar Base No:2, Columbia Agar, Thiogycollate besiyeri, Campylobacter Agar Base gibi temel besiyerlerine antimikrobik kombinasyonları ve üremeyi arttırıcı çeşitli katkı maddeleri eklenerek hazırlanan seçici besiyerleri kullanılmaktadır (Tablo 3). Besiyerlerinin seçici aktivitesini; temel besiyerinin içeriği, ilave edilen üremeyi arttırıcı maddeler ve antimikrobik kombinasyonları belirlemektedir. İlk izolasyonlarda besiyerlerine %5-10 oranında defibrine koyun ya da at kanı ilavesi üremeyi arttırmaktadır<sup>78</sup>.

Katkı maddeleri içerisinde yer alan antibiyotiklerden sefalosporinler (sefalotin, sefaperazon) geniş spektrumludur. Enterobacteriaceae ailesine ait bakterilerin ve enterokok hariç gram pozitif bakterilerin çoğuna etkilidirler. trimethoprim ise özellikle proteus ve gram pozitif bakterilere karşı inhibitör aktivite gösterir. Ancak bakterilerde timin sentezini inhibe ederek etkisini gösteren trimethoprim'in, timidin içeren besiyerlerine etkinliği beklenenden daha düşük olmaktadır. Bu tür besiyerleri kullanıldığında, besiyerine trimethoprime sinerjik etkisi nedeni ile polimiksin B ilave edilmektedir. Besiyerlerine ilave edilen diğer antibiyotiklerden; vankomisin gram pozitiflere, rifampisin hem gram pozitif hem gram negatif bakterilere teicoplanin ise enterokoklara karşı etkilidir. Örneklerdeki muhtemel maya ve küf kontaminasyonuna karşı da besiyerine sikloheksimit, amfoterisin B ve nistatin, gibi antimikotiklerden birisi ilave edilmelidir<sup>79</sup>.

Kampilobakter türlerinin çoğu, besiyerine ilave edilen, önerilen konsantrasyondaki antibiyotiklere dirençlidir. Ancak, sefalotin, kolistin ve polimiksin B'nin *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus* subsp. *fetus*, *C. jejuni* subsp. *doylei* ve *C. upsaliensis*'in bazı suşlarının üremesini baskıladığı bildirilmektedir. Bu nedenle, son yıllarda seçici besiyerlerinde sefalotin yerine, dışkı florasını baskılama gücü daha iyi olan Sefaperazon'un kullanılması önerilmektedir. Nitekim Sefaperazonun dışkının normal florasında yer alan bakterilerin çoğu için belirlenen MIC değeri  $\leq 8$  mg/l' iken klinik örnekten izole edilen çok sayıda *C. jejuni* ve *C. coli* suşu için MIC değeri  $\geq 128$  mg/ dir. Ancak, *C. upsaliensis*'in bazı suşlarının, sefaperazon için MIC değerinin  $\geq 16$  mg/l olduğu, bu nedenle 32 mg/l Sefaperazon içeren mCCDA gibi seçici besiyerlerinde bu kampilobakter türünün üreyemeyeceği bildirilmektedir. Diğer termofilik türlerin yanı sıra *C. upsaliensis*'de izolasyonu için kullanılan, CAT (Sefaperazon, Amfoterisin B, Teicoplanin) gibi seçici besiyerine 8 mg/ ml sefaperazon ilavesi önerilmektedir<sup>80</sup>.

Kampilobakter izolasyonunda yaygın olarak kullanılan ve bazıları ticari olarak temin edilebilen besiyerlerinin etkinliğini karşılaştıran çok sayıda araştırma yapılmış ve merkezlere göre değişen farklı duyarlılık oranları bildirilmiştir. Bu çalışmalardan birisinde, 50 ishali hastanın dışkı örneği Skirrow, Butzler, Blaser, Campy-BAP, ve Preston besiyerine eken, Bolton F.J. ve arkadaşları bu besiyerlerinde sırası ile 13 (% 26), 10 (% 20), 12 (% 24), 5 (% 10), 15 (% 30) oranında kampilobakter pozitifliği bildirmişlerdir. Araştırmacıların çoğu önlenemeyen bakteriyel kontaminasyonun bütün

selektif besiyerlerinin ortak problemi olduğunu belirtmişlerdir.<sup>81</sup> Kan içeren besiyerlerinde kontaminasyon oranının daha yüksek olması sebebi ile seçici besiyerlerine, üretme faktörü olarak mümkün ise kan yerine hematin, demir tuzu, şarkoal, sodyum metabisüfit ve sodyum pruvat, antimikrobik olarakta, pseudomonas türlerine ve enterik bakterilerin çoğuna etkili olan Sefaperazon'un ilavesi önerilmektedir. Bu bağlamda Preston yada CCDA besiyerinde kan içermeyen *C. jejuni* izolasyonunun daha yüksek oranda gerçekleştiği gösterilmiştir<sup>82,83</sup>.

## II- Besiyerlerine Ekim ve İnkübasyon

İshalli hastalardan alınan dışkı örnekleri eküvyon ile selektif besiyerlerinin üst ¼'üne sürülür ve sürüntü materyali plakların geri kalan kısmına tek kullanımlık plastik öze kullanılarak azaltma yöntemi ile yayılır. Kültür için laboratuvar imkanları ve personelin tecrübesi dikkate alınarak seçilen bir seçici besiyerleri kullanılır. Ancak mümkün ise her örnekten birisi kanlı diğeri kan içermeyen en az 2 ayrı seçici besiyerine ekim yapılması başarı şansını artırır. Ekim sonrası besiyerleri % 5 O<sub>2</sub>, % 10 CO<sub>2</sub> ve % 85 N<sub>2</sub> içeren mikraerofil atmosferde 37°C'de inkübe edilir. İnsanlarda ishale yol açan kampilobakterlerin nerede ise tamamını termofilik türler oluşturmaktadır. Bu sebeple termofilik kampilobakterlerin daha kolay üretilebilmeleri ve daha basit identifiye edilebilmeleri için her örnek için en az 2 besiyerine ekim yapılmalı ve 2. besiyerleri yine mikraerofilik şartlarda 42°C'de inkübe edilmelidir. Kampilobakterlerin üremesi için gerekli mikraerofilik atmosfer, mikraerofilik gaz karışımı sağlayan ve ticari olarak temin edilebilen Campy Pak (BBL No: 271034), Campy Gen (Oxoid 0025A) gibi gaz jeneratörleri ile veya anaerobik kavanozların havası boşaltıldıktan sonra ilave edilecek uygun gaz karışımı ile sağlanır<sup>49</sup>.

**Tablo 3: Kampilobakter jejuni izolasyonu için seçici besiyerlerinin formülleri<sup>49</sup>**

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

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

### III. Seçici besiyerlerindeki koloni morfolojisi

Kampilobakterler Kanlı agar besiyerinde 24-48 saatlik inkübasyon periyodu sonunda, 0.3-0.5 mm çapında, su damlası gibi nemli, gri/beyaz, agarın yüzeyine doğru bir tabaka şeklinde üreme gösteren, hemoliz yapmayan tipik kolonileri oluşurlar. Kansız, kömür tozu içeren besiyerinde ise; 0.5 mm çapında, grimsi renkte, bazen metalik refle veren düz yüzeyli ancak yayılma eğilimi gösteren gözle görülebilir koloniler 72-96 saatlik inkübasyon süresi sonunda şekillenir<sup>49</sup>.

#### 2.7.4.1.4. Kampilobakterlerin İdentifikasyonu

Katı besiyerlerinde üretilen şüpheli koloniler koloni morfolojileri, mikroskopik morfolojik özellikleri, oksidaz ve katalaz aktiviteleri, ısı, tuz ve glisin tolerans testleri, antimikrobik duyarlılık paternleri ile hippuratu hidrolize edebilme özelliklerini göre identifiye edilirler (Tablo 2, 4). İdentifikasyon testleri ilk izolasyondan çok, mikroskopik morfolojileri kampilobakterlerle uyumlu olan kolonilerin subkültürlerinden yapılmalıdır<sup>84</sup>.

Hippurat hidroliz testi (N.benzoyl glycine amido hydrolase testi) *C.jejuni* 'yi diğer türlerden ayırt eden en önemli biyokimyasal testtir. Bu teste, N.benzoyl glycini (hippurikasit) glisin ve benzoik asite parçalayan hippurikaz enziminin varlığı araştırılmakta, glisin oluşumu ninhidrin bazlı reagenlerle belirlenmektedir. Benzoik asit oluşumu ise ferrik klorid reagenlerle veya gaz-likit kromatografisi ile belirlenmektedir. Ancak hippurikaz negatif *C.jejuni* suşlarınının gösterilmesi, hippurat hidroliz testinin identifikasyondaki değerini azaltmıştır. Düşük hippurikaz aktivitesinin bu testte belirlenememesi ve ekilen bakteri yoğunluğunun yöntemin duyarlılığını etkilemesi bu testin dezavantajı olarak gösterilmektedir<sup>85</sup>.

**Tablo 4: Termofilik kampilobakter türlerinin identifikasyonu.**

|                                          | <i>C.jejuni</i>    |                    | <i>C. coli</i> | <i>C. lari</i> | <i>C. upsaliensis</i> |
|------------------------------------------|--------------------|--------------------|----------------|----------------|-----------------------|
|                                          | <i>Subs.jejuni</i> | <i>Subs.doylei</i> |                |                |                       |
| <b>Hippurat hidroliz</b>                 | +                  | +                  | –              | –              | –                     |
| <b>Katalaz</b>                           | +                  | +                  | +              | +              | –/W                   |
| <b>Nitrate redüksiyon</b>                | +                  | –                  | +              | +              | +                     |
| <b>TSI agarda H<sub>2</sub>S üretimi</b> | –                  | –                  | –/W            | –              | –                     |
| <b>Nalidiksik asit direnci</b>           | S                  | S                  | S              | R              | S                     |
| <b>Sefalotin direnci</b>                 | R                  | V                  | R              | R              | S                     |

**W: zayıf reaksiyon V: değişken ; S: duyarlı ; R: dirençli .**

#### **2.7.4.1.5. Dışkıda Antijen Arayan Testler**

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. Ancak bu testlerden hiçbirinin duyarlılığı kültür yöntemi kadar yüksek değildir. Bir çalışmada, Meritec-Campy testi ile, seçici kültür yöntemi ile kampilobakter izole edilmiş örneklerin ancak % 40'ında pozitif sonuç elde edildiği bildirilmiştir<sup>86, 87, 88, 89</sup>.

#### 2.7.4.1.6. Moleküler Tanı Yöntemleri

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, multipleks-PCR, AFLP, PCR-hibridizasyon gibi moleküler temelli ile DNA dizi analizi ve mikroarray gibi modifiye moleküler yöntemler daha yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır<sup>13</sup>.

Moleküler tanı yöntemleri ile kampilobakter türlerinin genom düzeyinde tanımlanması ve tiplendirilmesinin yanı sıra, patogenez ve antimikrobik direncinden sorumlu genler ve gen mutasyonlarının tespiti de mümkün olabilmektedir<sup>90, 91</sup>.

#### I. Nükleik Asit Çoğaltma (NAA) Bazlı Yöntemler

Düşük metabolik aktiviteleri nedeni kampilobakterlerin in vitro şartlarda üretilmeleri ve fenotipik yöntemlerle identifikasyonları uygun alt yapı ve tecrübeli personele sahip laboratuvarlarda bile son derece düşük duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. Konvensiyonel tanı yöntemlerinde yaşanan ve bakteriden kaynaklanan bu olumsuzlukların aşılması amacı ile alternatif yöntemler denemiş, bu bağlamda PCR gibi nükleik asit çoğaltma yöntemleri birçok araştırmacı tarafından denenmiştir. Bu çalışmalarda kampilobakterlerin; *16s rDNA*, *23S rDNA*, *hip O*, *ceuE*, *mapA*, *Cad F*, *glyA* ve *groEL* genleri üzerindeki spesifik dizileri hedef alan primerlerin kullanıldığı, PCR, multiplex PCR, real-time PCR ve PCR-ELİSA gibi, değişik amplifikasyon bazlı moleküler yöntemler kullanılmıştır. Ayrıca klinik materyalden kampilobakterlerin direkt tanısı ve tür düzeyinde identifikasyonuna imkân veren PCR ile kombine DNA hibridizasyon ve PCR-RFLP yöntemlerde tanıda başarı ile kullanılmaktadır<sup>13,92, 93, 94, 95</sup>. Nükleik asit amplifikasyon testlerinin duyarlılık ve özgüllüğünü , hedef bölge, uygun primerlerin dizaynı, internal ve eksternal kontrol kullanımı, kullanılan DNA ekstraktın kalitesi, DNA polimeraz enzimi, reaksiyon tamponu, Mg konsantrasyonu, ısı döngü cihazının performansı ve uygulayıcının becerisi gibi, çok sayıdaki değişken etkilemektedir<sup>96</sup>.

## II. Hedef Bölge ve Primerlerin Seçimi

Kampilobakterler türlerine spesifik hedef bölgelerin belirlenmesinde tam genom dizi analizlerinden faydalanılmaktadır. Amplifiye edilen hedef DNA dizisi cins , tür, alttür hatta suş seviyesinde özgüllük gösterebilmelidir. Bu bakımdan ilk ve en çok çalışılan gen bölgeleri, filogenetik olarak konserve bölgelerin yanısıra ve mozaik bölgelerde içeren, 16S rDNA ve 23S rDNA genleri olmuştur. Cins düzeyinde son derece duyarlı sonuçlar elde edilen bu bölgelerin çoğaltılması ile tür düzeyinde tanıma istenen sonuçlar elde edilememiştir. Mesela, türler arasında % 97'nin üzerinde homolog olan ve genus hatta cins düzeyinde spesifik diziler taşıyan 16S rd RNA tür ayrımı için uygun bir çoğaltma hedefi değildir<sup>97</sup>. Bir çalışmada, 16S rDNA üzerindeki 1,004 bp lik bir bölgenin çoğaltılması ve elde edilen DNA'nın *DdeI*, *TaqI* ve *BsrI* restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucu elde edilen DNA fragmanlarının homolojisini esas alan PCR-RFLP yöntemi ile ancak kampilobakter, arkobakter ve helikobakter cinsi bakteriler arasında bir ayrımın mümkün olduğu, fakat kampilobakter cinsi içerisindeki türlerin ayrımının mümkün olmadığı ileri sürülmüştür<sup>98</sup>. Daha sonra yapılan araştırmalarda 16SrDNA geni üzerinde farklı bölgelerin çoğaltılması ile yapılan PCR-RFLP temelli çalışmalarla kampilobakterlerin tür düzeyinde tanımlanmalarına çalışılmış, ancak *C.jejuni* ve *C.coli*'nin identifikasyonu için henüz sensitivitesi yüksek 16S rd RNA PCR-RFLP yöntemi tanımlanamamıştır<sup>91</sup>.

Kampilobakterlerin tanı ve identifikasyonunda sık kullanılan bir diğer önemli hedef 23S rDNA geni içerisindeki spesifik dizilerdir. İlk çalışmalarda 23S rDNA geninde *C.jejuni*, *C.coli*, *C.lari* ve *C.upsaliensis* gibi termofilik kampilobakter türlerin için oldukça spesifik bir gen bölgesi olduğu, her bir tür için farklı dizay edilmiş primerlerin kullanılması ile bu türleri için spesifik bölgelerin çoğaltılarak identifiye edilebileceği gösterilmiştir<sup>99</sup>. Daha sonra 23S rDNA geni üzerinde 491 bp uzunluğunda ve *C.jejuni*, *C.coli*, *C.lari*, *C.upsaliensis* türlerinde ortak olan bir gen bölgesinin varlığı tespit edilmiştir Bu bölgenin spesifik primerlerle amplifikasyonu sonucu elde edilen ampikonların, *AluI* ve *Tsp509I* restriksiyon enzimi ile kesimi ile elde edilen DNA fragmentlerinin homolojileri dikkate alınarak "Tek tüp PCR-RFLP" ile tür düzeyinde, yüksek duyarlılık ve özgüllükte, tanı mümkün olmaktadır<sup>14</sup>.

Bu iki gen bölgesi dışında, *hipO*, *ceuE*, *mapA*, *cadF*, *glyA* ve *groEL* genleri üzerindeki spesifik dizileri hedef alan primerler yardımı ile tür düzeyinde tanıya yönelik

PCR, PCR-RFLP, multipleks PCR gibi modifiye yöntem çalışmaları denenmiştir<sup>100,101, 102, 103, 104, 105,106</sup>.

Kampilobakter türlerinin tanı ve identifikasyonunda en uygun PCR yönteminin tespiti için yapılan bir araştırmada, farklı gen bölgelerini hedef alan veya farklı primer dizaynlarının kullanıldığı 11 PCR temelli yöntemin duyarlılık ve özgüllük sonuçları, fizyokimyasal değişiklikler ve suşlar arasındaki varyasyonların testlerin performansı üzerine etkileri araştırılmıştır. Araştırmada *C. jejuni* tanısı için dizayn edilmiş 6 PCR testinin duyarlılık aralığı % 84 -100, özgüllük aralığı % 88 -100 olarak tesbit edilmiştir. *C.coli*' ye spesifik PCR testlerinin tamamında ise duyarlılık ve özgüllük % 100 olarak bildirilmiştir. Araştırmada kullanılan bazı testler, *C.jejuni*'nin referans suşları ile kıyaslandığında klinik izolatlar ile daha değişken sonuçlar alınmış, tanıda daha güvenilir sonuçlar üretebilmek için, farklı genetik dizileri hedef alan primerlerin kullanıldığı, birden fazla PCR testinin eş zamanlı olarak kullanılması önerilmiştir. Sokak suşları ile görülen böyle değişken sonuçlar *C.jejuni* genomunun şarta bağlı olarak gösterdiği aşırı variabilite ile izah edilmiştir<sup>96</sup>.

### III. Dışkıdan Nükleik Asit Ekstraksiyonu

Kompleks mikrobik flora içermesi, diyetle alınan gıda bileşenleri ve endojen içeriğinden dolayı dışkı örneklerinden nükleik asitlerin saf olarak ekstraksiyonu, diğer klinik örneklerle göre daha zordur. Dışkıda, safra tuzları, gıda içerisinde bulunan bitkisel kaynaklı kompleks polisakkaritler gibi PCR ve diğer moleküler yöntemlerin duyarlılığını düşüren çok sayıda ve miktarda inhibitörler bulunmaktadır<sup>96</sup>.

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

Geleneksel fenol-kloroform yöntemi ile dışkıdan DNA izolasyonunda, gerek dışkıdaki inhibitörleri gerekse fenolü ekstraktan tam olarak uzaklaştırmak mümkün olamamaktadır. Bu sebeple fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen DNA kalıplarının kullanıldığı PCR testlerinin duyarlılığı son derece düşüktür.

DNA ekstraksiyonunda bakterinin lizisi için Guanidyum isotiyosiyanatın kullanıldığı, DNA'nın silika matrikse bağlanarak ardarda yıkamalarla protein

kalıntılarının uzaklaştırıldığı bir yöntem tanımlanmış ve bu yöntemin Fenol-kloroform yöntemine göre daha başarılı olduğu ileri sürülmüştür<sup>107</sup>.

Konvensiyonel in-house tekniklerin yanı sıra, son yıllarda dışkıdan DNA izolasyonu için çok sayıda standardize edilmiş ticari kit geliştirilmiştir. Bu kitler iyi standardize edilmiş olup 200 ng üzerinde DNA eldesine imkân sağlayacak şekilde dizayn edilmiştir. Ancak hastaya ait diyet alışkanlıkları, dışkıda flora bakterilerinin yoğunluğu, dışkının sıvı içeriği ve içerikdeki inhibitör konsantrasyonu gibi değişkenler, gerek konvensiyonel, gerekse ticari olarak temin edilen DNA ekstraksiyon kitleri ile yapılan ekstraksiyon işlemlerinde sonuçları etkilemektedir<sup>106</sup>.

#### **2.7.4.2. İndirekt Tanı Yöntemleri**

Kampilobakter antijenlerine karşı hasta serum ve sekresyonlarında sIgA ve IgG türü antikorların tespiti amacı ile KBR ve ELISA bazlı serolojik testler denenmiş, ancak bu testlerin tanı değerlerinin düşük olduğu görülmüştür. Son yıllarda geliştirilen ve *C.jejuni*'nin rekombinant P18 ve P39 antijenlerine karşı hastada gelişen antikor cevabını tesbit eden ELISA testinin yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu ileri sürülmüştür. Ancak, *C.jejuni*'nin heterojen antijenik yapısından dolayı bu testlerden hiç biri standardize edilmiş seropozitivite kriterlerine sahip değildir. Kampilobakter enfeksiyonlarının tanısında serolojik testler epidemiyolojik amaçlı doğrulama testleri olarak kullanılmaktadır<sup>108</sup>.

#### **2.7.5. Kampilobakter Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi**

Kampilobakteriozis gelişmişlik farkı gözetmeksizin bütün dünyada görülen, sıklıkla zoonotik karakterli, gıda yolu ile bulaşan bir hastalıktır. Kampilobakteriozisin epidemiyolojisi, tarıma dayalı ekonomi, kişi ve çevre hijyenine verilen önem gibi toplumların sosyo-ekonomik ve sosyo kültürel özellikler ile temas yaşı, endemik bölgelere seyahat ve meslek gibi kişisel özelliklerden etkilenmektedir<sup>112</sup>.

Kampilobakteriozis, 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'nün, gelişmekte olan ülkelerde ishal etkenlerinin dağılımını tesbit

amacı ile, hastane labaratuvar kayıtlarını değerlendirdiği, retrospektif bir çalışmada, ishalli hastaların dışkı kültürlerinde; Tanzanya'da % 18, Bangladeş'de % 17,5, Ethopya'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 bildirimi ile ilgili halk sağlığı uygulamalarındaki yetersizliklerden dolayı, kampilobakteriozisin gerçek insidansının bildirilenlerden en az 10 kat daha fazla olduğunu iddia etmektedir<sup>113</sup>. Daha düşük kampilobakteriozis insidansına sahip gelişmiş ülkelerde ise enfeksiyonun kaynağı gelişmekte olan ülkelere seyahat, bu ülkelere ithal edilen gıda ürünleri ve endüstri tipi beslenen kanatlı hayvanlardır. Jiang ZD ve arkadaşları tarafından yapılan, hiperendemik bölgelere yapılan seyahatlerin kampilobakteriozisin görülme sıklığına etkisinin vurgulandığı bir çalışmada; Tayland ve Nepale seyahat eden kişilerde görülen Turist İshallerinde kampilobakter türlerinin ensık izole edilen ajan olduğu, Kenya, Hindistan ve Jameika'ya seyahat edenlerde ise kampilobakterlerin, ETEC ve EagEC den sonra en sık karşılaşılan, 3. ajan olduğu belirtilmiştir<sup>114, 115</sup>.

Kampilobakter epidemiyolojisini etkileyen en önemli faktörlerden biriside gıda amaçlı hayvancılıktır. Gıda üretim teknolojilerindeki gelişmelere rağmen, artan nüfus ve yeterli beslenme gerekliliği et üretimine olan ihtiyacı artırmaktadır. Endüstrileşmiş toplumlarda tüketilen gıdaların önemli bir bölümünün gelişmekte olan ülkelerde üretilmesi, bu ülkelerde gıda üretim aşamalarındaki kontrolün yerel yasa ve kurullar tarafından denetlenmesi, et ve gıda güvenliği konusunda denetlenebilir standartların bulunmaması, daha önce gıdaları koruduğuna inanılan tuzlama, kurutma ve soğukta saklam gibi yöntemlerin yeteri kadar güvenli olmayışı ve nihayet gıda yolu ile bulaşan mikroorganizmaların hayvan barınaklarından eradikasyonlarının mümkün olmaması, gıda yolu ile bulaşan hastalıkların, endüstrileşmiş toplumlarda da halk sağlığını tehdit eden önemli bir unsur olmaya devam edeceğini göstermektedir. Bu bağlamda Kampilobakteriozisin özellikle 1990 yılından itibaren tüm dünyada giderek arttığı çok sayıdaki araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Ancak, Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve İngiltere gibi gelişmiş ülkelerde bile ishalli hasta dışkılarının rutin mikrobiyolojik incelemesinde, kampilobakterlere yer verilmemesi, kampilobakteriozisin gerçek insidansı hakkında sağlıklı bilgi edinilmesini engellemektedir<sup>84</sup>. Mesela; 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 4740 kampilobakter olgusu bildirilmiştir. Oysa CDC, her yıl 2.4 milyonu *C. jejuni* ile enfekte olmak üzere en az 2.5 milyon kişide kampilobakteriozise bağlı olarak ishal geliştiğini ve olguların % 80’inden fazlasında bulaşın gıda kaynaklı olduğunu, kampilobakter sebebi ile hastaneye yatış endikasyonu alan hasta sayısının 10.000 ve bu sebeple kaybedilen hasta sayısının ise 100’ün üzerinde olduğunu bildirmektedir<sup>116, 117</sup>.

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. Yine bu ülkede, resmi kaynaklardan elde edilen bu sonuçların, subklinik enfeksiyonu olan ve sağlık kuruluşuna başvurmamayan hastaları içermediği, bu sebeplede gerçek kampilobakter olgu sayısının, bildirilenden 8-10 kat daha fazla olduğu ileri sürülmektedir<sup>118</sup>. Diğer taraftan Avrupa Gıda Güvenlik Ajansı 2004 yılı içerisinde, birliğe bağlı 21 ülkede, toplam olarak 183.961 *C. jejnui* olgusunun görüldüğünü, birliğe bağlı ülkelerden, Norveç’te 50/100,000, Danimarka’da 80/100,000, Finlandiya’da 75/100,000 ve İsveç’te 69/100,000 olmak üzere genel olarak *C.jejuni* insidansının 47.6/100.000 (0.1-249.6/100.000) olduğunu bildirmiştir. Bu ülkelerde kampilobakterlerden sonra en sık görülen gıda kökenli zoonotik ajanların sırası ile, yıllık 10.000 olgu ile EHEC, 4000 olgu ile *Listeria* ve 1000 olgu ile *Brusella* olduğu bildirilmiştir. EFSA, 2000’li yılların başlarında birliğe bağlı 10 eski ülkede düşme trendine giren kampilobakteriozisin yeni katılan ülkelerle birlikte tekrar artış trendine döndüğünü bildirmiştir<sup>119</sup>.

Ülkemizde, 1986- 2002 yılları arasında yapılan bazı çalışmalara göre, akut bakteriyel gastroenteriti olan olguların dışkı kültürlerinde kampilobakter cinsi bakterilerin izolasyon sıklığı % 1-13 arasında değişmektedir<sup>11</sup>. Bölgemizdeki ishalleri olguların dışkı kültürlerinde kampilobakter izolasyon oranı ise % 2,94-7,8 olarak tespit edilmiştir<sup>120, 121</sup>.

Kampilobakter enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde, gelişmekte olan ülkelerle gelişmiş ülkeler arasındaki en önemli farklılıktan birisi de olguların yaş gruplarına dağılımıdır. Gelişmekte olan ülkelerde, çocukların toprakla ve dolayısı ile kampilobakterle erken yaşta teması, çocukluk çağında hastalığa karşı özgül bağışıklığın

gelişmesine böylece toplumdaki asemptomatik taşıyıcıların sayısının fazlalığına yol açmakta, ileri yaşlardaki enfeksiyonlar da daha selim seyretmektedir. Bu ülkelerde hayatın ilk yıllarında asemptomatik taşıyıcılık görülen çocuklar, dışkıları ile bol miktarda kampilobakter çıkarmaktadır<sup>15</sup>.

Oysa gelişmiş ülkelerde kampilobakteriozis üç ayrı yaş gurubunda artış gösterir. İlk artış bir yaş altı bebeklik döneminde, ikinci artış 15-29 yaş arası gençlik döneminde son artışta 60 yaş ve üzerindekilerde görülmektedir. Ancak erken çocukluk döneminde ishal ve GBS'na, 60 yaş ve üzerinde de ciddi dehidratasyona bağlı olarak Kampilobakteriozis kliniği daha ağır seyretmektedir. Gelişmekte olan ülkelerin aksine gelişmiş ülkelerde asemptomatik taşıyıcılık oranı oldukça düşüktür<sup>112</sup>.

Suudi-Arabistan'da yapılan bir çalışmada 7369 ishalleri çocuğun dışkısı kampilobakter yönünden değerlendirilmiş, 82 hastada kampilobakter türleri izole edilmiş hastaların % 93'ünün 4 yaşının altında olduğu belirlenmiştir.<sup>122</sup> Hindistan'da ise sağlıklı popülasyonda % 14,8 oranında Kampilobakter izole edilmiş, en yüksek asemptomatik taşıyıcılık oranının okul öncesi yaş gurubunda olduğu belirlenmiştir<sup>123</sup>. Gürtler ve arkadaşları tarafından Almanya'da yapılmış bir çalışmada, kampilobakter enteriti tanısı almış 861 hastanın yaş dağılımına bakılmış ve en yüksek hasta gurubunun 15-24 yaşları arasında olduğu bunu 0-5 yaş arası hasta gurubunun takip ettiği belirlenmiştir<sup>124</sup>.

Kampilobakter enfeksiyonlarından her cinsin eşit oranda etkilendiği belirtilmektedir. Ancak bazı çalışmalarda genç "fast-food" beslenme alışkanlığının yaygın olmasından dolayı erişkin dönemde enfeksiyonun erkeklerde daha sık görüldüğü bildirilmektedir<sup>125</sup>.

Kampilobakteriozis epidemiyolojisinde mevsimsel farklılıklarda görülmektedir. Gelişmiş ülkelerde özellikle yaz ve sonbahar aylarında daha sık görülen Kampilobakteriozisin, gelişmekte olan ülkelerin çoğunun iklimler arası ısı farkının az olduğu, tropikal bölgelerde yer alması sebebi ile bu ülkelerde, insidans oranlarında mevsimler arası belirgin bir fark yoktur<sup>15</sup>.

İnsandan insana bulaş bildirilmiş olmakla birlikte Kampilobakteriozis, genel olarak bir zoonoz olup, primer kaynak başta kümes hayvanları olmak üzere enfekte hayvanların ürünleridir. Kampilobakter türü mikroorganizmalar; gıda amacı ile beslenen başta kümes hayvanları olmak üzere pek çok memeli hayvan ve yaban kuşunun, üreme

ve gastrointestinal sisteminde, hayatın erken dönemlerinden itibaren kolonize olmaktadır. Hayvanlardaki kolonizasyon genellikle asemptomatik olarak başlayıp hayat boyu sürmekte, nadiren belirtili infeksiyona bazende intermitten yayılıma yol açmaktadır. Daha düşük oranlarda da olsa kedi ve köpek gibi ev hayvanlarının gastrointestinal sistemlerinde kolonize olan kampilobakter türleri, bu hayvanlarda da normal flora bakterisi gibi davranmakta ancak stres, yaş, kolonize suşun tipi ve enfektif doza bağlı olarak bu hayvanlarda hafif, kendi kendisini sonlandıran ishalleri klinik tablolara yol açabilmektedir. Ancak kampilobakterlerin hayvanlarındaki intestinal kolonizasyonunda, genel olarak prognozu neyin etkilediği tam olarak anlaşılamamıştır<sup>126</sup>.

Kampilobakter türlerinin doku tropizmi yanı sıra konak tropizmi göstermeleri kolonizasyonda reseptör bağımlılığını akla getirmektedir (Tablo 5).

**Tablo 5: Kampilobakter türlerinin konak tropizmi**

| <b>Rezervuar</b>                   | <b>Tür</b>                                                                                                                                                                |
|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>İnsan</b>                       | <i>C. jejuni</i> , <i>C.sputorum</i> biovar sputorum, <i>C.conciscus</i> , <i>C.curvus</i> , <i>rectu C.showae</i> , <i>C.gracilis</i>                                    |
| <b>Büyük baş hayvan</b>            | <i>C.jejuni</i> , <i>C.fetus</i> subsp.fetus or <i>C.fetus</i> subsp. venerealis, <i>C.hyointestinalis</i> , <i>C.sputorum</i> biovar paranureolyticus ve biovar faecalis |
| <b>Koyun</b>                       | <i>C. fetus</i> , <i>C.sputorum</i> biovar faecalis                                                                                                                       |
| <b>Domuz</b>                       | <i>C. coli</i> , <i>C.hyointestinalis</i> , <i>C.mucosalis</i>                                                                                                            |
| <b>Kümes hayvanları</b>            | <i>C. jejuni</i> , <i>C. Coli</i> , <i>C. Lari</i>                                                                                                                        |
| <b>Evcil hayvan (Kedi, Köpek )</b> | <i>C.jejuni</i> , <i>C.lari</i> , <i>C.upsaliensis</i> (özellikle köpek), <i>C.hyointestinalis</i> <i>C. helveticus</i>                                                   |

*C.jejuni*'ni başta tavuk, hindi ve kesim amaçlı beslenen kuş türleri gibi kümes hayvanları olmak üzere, sığır, domuz ve nadiren de olsa kedi ve köpek gibi evcil hayvanların intestinal sistemine kolonize olabilmektedir. Kümes hayvanlarında bağırsağın 42°C gibi yüksek bir ısıya sahip olması, termofilik bir tür olan *C.jejuni* için ideal bir üreme ortamı oluşturmaktadır<sup>127</sup>. Deneysel çalışmalar, *C.jejuni* 'nin, tavuklarda 10-40 Cfı gibi düşük konsantrasyonda alınsa bile, kursak, çekum ve ince barsak lümeninde, epitel yüzeyini örten mukus tabakası içerisinde ve enterositlerin üzerinde adeze olarak kolonize olduğunu ve kısa sürede burada çoğalarak 10<sup>9</sup> Cfı/gr gibi yüksek konsantrasyonlara ulaştığını göstermiştir. Kümes hayvanlarında kolonizasyon hayatın 2. veya 3. haftasında başlamakta olup genç civcivlerde kolonizasyon gösterilememiştir. Deneysel olarak yapılan enfeksiyonlarda I. Haftadan itibaren düşük oranda ve kısa süreli kolonizasyonun mümkün olabildiği gösterilmiştir. Doğal yolla kolonizasyondaki gecikmenin anneden geçen ve yumurta sarısında yüksek düzeylerde gösterilen antikorlara, kursak ve intestinal sistemdeki flora bakterilerinin türü ve sayısına ve intestinal sistemin reseptörler ve anatomik yapılarındaki matürasyonla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür<sup>128</sup>.

Kümes hayvanlarında III. haftadan itibaren kolonizasyon oranı süratle artmakta ve kesime gelen broiler cinsi tavuklarda oran % 0-95'e ulaşmakta, bu dönemdeki tavukların dışkılarındaki *C.jejuni* yoğunluğu 10<sup>9</sup> Cfı/gr' a kadar ulaşmaktadır. Marketlerde yapılan çalışmalarda tüketime hazırlanmış et ürünlerinde kontaminasyon oranı % 100'ü bulmaktadır. Gerek doğal beslenen ev tipi kümes hayvanları gerekse büyük işletmelerde üretilen hayvanlarda kolonizasyonun başlama yaşı ve sıklığı arasında fark gösterilememiştir. Kolonizasyonun süresi konağa ve suşa göre değişmektedir<sup>128, 129</sup>.

Özellikle çocuk yaş grubunda toprak temasının yüksek olduğu, gelişmekte olan veya az gelişmiş ülkelerde, 0-5 yaş grubu bebekler ve çocuklarda intestinal kolonizasyonu sık görülen *C.coli* 'nin, primer kaynağı domuzlardır. *C.coli*, daha düşük oranlarda da olsa kümes hayvanları, besi hayvanları ve yabani kuşlarının intestinal sisteminde de kolonize olabilmektedir. Gerek sağlıklı gerekse ishalleri köpek ve kedi dışkılarından, çok nadiren de kümes hayvanlarının dışkılarından izole edilen *C.upsaliensis* ev içi temasla insanları da enfekte ederek ishalleri seyreden klinik tablolara sebep olabilmektedir. İsveç'te yapılan bir çalışmada sağlıklı köpeklerin dışkılarında, %

56 oranında kampilobakter pozitifliği tesbit edilmiş, baskın türün *C. upsaliensis* (% 69) olduğu belirlenmiştir<sup>130</sup>. Bir başka çalışmada ise *C.upsaliensis*, asemptomatik kedi ve köpeklerin dışkılarından sırasıyla % 64 ve % 75 oranında izole edilmiştir<sup>131</sup>.

Kontamine suların tüketilmesi veya doğa gezileri, avcılık ve su sporları gibi aktiviteler esnasında kontamine su birikintileri ile tesadüfi temas sonucu insanlara bulaşarak ishale seyreden klinik tablolara yol açan *C.lari*' nin primer konağı ve kaynağı martı ve diğer yabani kuşlardır. Kümes hayvanları ve deniz kabukluları da insanlardaki gibi temasa bağlı olarak, ancak yüksek oranda *C.lari* ile enfekte olurlar. Bu hayvanlarda insan *C.lari* enfeksiyonları için kaynak oluşturabilir<sup>132</sup>.

#### **2.7.5.1. Epidemiyolojik Açıdan Tiplendirme Yöntemleri**

Son yıllarda, özellikle moleküler epidemiyolojik yöntemlerin geliştirilmesi ile kampilobakteriozis epidemiyolojisi ile ilgili bilgiler önemli ölçüde artış göstermiştir. Mikroorganizmanın fenotipik özellikleri ile genotipik özelliklerinin karşılaştırıldığı çalışmalarda, bir salgında izole edilen suşlar arasındaki bulaşıcılık yönünden görülen farklılıkların sebebi, salgınların varsa hayvan rezervuarları veya diğer potansiyel kaynakları ile yayılma yolları belirlenebilmektedir<sup>133</sup>.

##### **2.7.5.1.1. Fenotipik Yöntemler**

Kampilobakterlerin hastalık etkeni olarak izole edildiği ilk günden günümüze kadar geçen süre içerisinde yapılan süveyans çalışmalarında, uygulama gücüğü, 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 süveyans çalışmalarında Penner ve Lior'un antijenik sınıflandırmasını esas alan serolojik identifikasyon yöntemleri baz olarak alınmıştır. Orijinal Penner yönteminde İndirekt hemaglutinasyon (IHA) tekniğı kullanılır ve kampilobakter izolatları ısıya dirençli (TS/HS) antijenlerindeki homolojiye göre identifiye edilirler<sup>134</sup>. Bu yöntemin en önemli dezavantajı antijenik benzerlik sebebi ile diğer gram negatif barsak bakterileri ile çapraz reaksiyonlara bağlı yalancı pozitiflik oranının yüksek oluşudur. Bu sebeple yöntem daha sonra modifiye edilmiştir. Bakteri

aglutinasyonuna dayalı bir yöntem olan, Modifiye Penner yönteminde özgül olmayan aglutinasyonlar ve çapraz reaksiyonların en aza indirilebilmesi için, kampilobakterlerin HS atijenine karşı geliştirilmiş adsorbe serumlar ve bakteri süspansiyonları kullanılmaktadır.<sup>135</sup> 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.<sup>136</sup> Ancak antiserum panellerinin fazlalığı, tiplendirilemeyen izolatların varlığı, yöntemlerin maliyetinin ve iş yükünün fazla olması gibi nedenlerden dolayı fenotipe dayalı sürveyans çalışmalarında serotiplendirme yöntemlerinin uygulanabilirliği, referans laboratuvarları ile sınırlı kalmaktadır. Ayrıca genetik materyalin horizontal transferi nedeni farklı genotipe sahip kampilobakterler suşlarının zaman zaman aynı antijenik profili sergilemeleri, ya da aynı genotipe sahip kampilobakter suşlarının farklı antijenik özelliğe sahip olmaları sebebi ile hatalı pozitif veya negatif sonuçların elde edilmesi, izolatların çoğunun sık karşılaşılan birkaç serotip içerisinde yer alması, buna karşılık bazı izolatların mevcut anti-serumlarla tespit edilememesi, antijenik homolojiyi esas alan tiplendirme yöntemlerinin en önemli zaafıdır. Bu sebeple daha duyarlı subtipleme metodlarına ihtiyaç duyulmuştur<sup>137</sup>. Bu güne kadar serotiplemenin yanı sıra kullanılmak üzere çok sayıda Faj tiplendirme şeması önerilmiştir. İlk faj tiplendirme şeması Grajewski B.A. ve arkadaşları tarafından (1985) ABD'de geliştirilmiştir. Daha sonra İngiltere'de Salama ve arkadaşları (1990) ile Kanada'da Khakhria R. ve Lior H. (1992) tarafından geliştirilen faj tiplendirme şemaları çok sayıdaki çalışmada epidemiyolojik tiplendirme yöntemi olarak serotipleme ve antimikrobik duyarlılık kalıplarına göre yapılan tipleme ile birlikte kullanılmıştır. Bu üç şemada major fajlar ortak olup daha az rastlanan faj tiplerinde farklılıklar görülmektedir. ABD'de geliştirilen orijinal Faj tiplendirme şeması kümes hayvanlarının dışkılarından izole edilen 14 virülan bakteriyofaj kullanılarak oluşturulmuştur. İngiltere'de geliştirilen Faj tiplendirme şemasında ise orijinal faj tiplendirme şemasındada kullanılan 6 bakteriyofaj ile birlikte domuz dışkılarından, gübre ve su gibi çevresel örneklerden izole edilen 10 farklı bakteriyofajda şemaya dahil edilmiştir. (Faj Tip 1.) Khakhria R. ve Lior H.'un önerdiği faj tiplendirme şemasında ise, orijinal faj tiplendirme şemasındaki 10 bakteriyofaja 9 minor faj eklenmiş ve böylece tiplendirmede kullanılan faj sayısı 19'a

ıkarılmıştır. Faj tiplendirilmesinde kullanılan bu üç şemadan en çok kabul göreni İngiltere’de kullanılan şemadır. Bu şemaya göre 76 farklı faj tipi bulunmaktadır. Giderek artan sayıdaki faja rağmen serotiplemede olduğu gibi epidemiyolojik olarak ilışkisiz suşlar arasında aynı faj tiplerinin tespit ediliyor olması bu testlere olan gvenide zayıflatmıştır <sup>138, 139, 140</sup>. Khakhria R. ve Lior H. 17 farklı ülkeden gönderilen insan ve çeşitli hayvan dışkı örneklerinden izole edilen 672 *C. jejuni* ve 82 *C. coli* isolatı ile genişletilmiş bakteriyofaj şemasını kullanarak yaptıkları bir araştırmada izolatların ancak % 80,6’nın tiplendirilebildiğini, bu suşların birden çok faj duyarlılığı gösteren 46 farklı faj (PT) tipi sergilediklerini belirtmişlerdir. Tiplendirilen izolatların % 57,0’sinin 9 faj tipi içerisinde yoğunlaştıklarını (3, 5, 10, 11, 18, 19, 23, 26, 44) insanlardan izole edilen *C.jejuni* izolatları arasında en yaygın faj tipinin PT-11 olduğunu bildirmişlerdir. Ancak genişletilmiş bu şemaya rağmen izolatların % 19,4’nde faj tipine göre ilişkilendirme yapılamamıştır<sup>140</sup>.

Kampilobakterlerin epidemiyolojik amaçlı tiplendirmelerinde, hızlı ve kolay bir alternatif olarak, antimikrobik duyarlılık kalıplarındaki homolojiyi dikkate alan antibiyotiplendirmede denemiştir. Ancak genotipik yöntemlerle yapılan kıyaslamalı çalışmalarda mikroorganizmayı üretme aşamasında kullanılan besiyerinin özellikleri, tuz konsantrasyonu, kalınlık, inkübasyon şartları ve inokülüm miktarındaki standartsızlık gibi testlere ait intrinsik sebeplerden dolayı bu yöntemin duyarlılığının tek başına düşük olduğu, fenotipik tanımlamada diğer testlerle birlikte anlamlı olabileceği görülmüştür. Wittwer.M. ve arkadaşları tarafından yapılan, hayvanlar ve çevresel örneklerden izole edilen 139 kampilobakter suşunun tiplendirilmesinde, antibiyotipleme ile Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) ve *flaA*-RFLP yöntemlerinin kıyaslandığı çalışmada, AFLP’de 48, *flaA*-RFLP de 29 ayrı patern gösteren suşların, 8 farklı antimikrobikkullanılarak yapılan antimikrobikduyarlılık teslerine göre 13 ayrı antimikrobik direnç profili gösterdiği tespit edilmiştir. Tiplendirilen suşların hiç birisinde genotipik profiller ile antimikrobik direnç profilleri arasında korelesyon görülmemiştir<sup>141</sup>. Benzer bir başka çalışmada Han K ve arkadaşları, 181 kampilobakter suşunu pulsed field gel elektroforezi (PFGE), *flaA*-tiplendirme ve Tetrasiklin, Nalidiksik asit, Siprofloksacin’e karşı direnç profillerine göre tiplendirmeye çalışmışlar, sonuç olarak test kombinasyonları ile suşların toplam 87 farklı grup içerisine dağıldıklarını bildirmişlerdir. Bu grup, genotipik testlerin suşlar arasındaki farklılıkları

ortaya koymada daha ayırt edici olduğunu ayrıca genetik özelliklere göre yapılan gruplandırmanın antimikrobik duyarlılık kalıplarına göre yapılan gruplandırma ile hiç uyuşmadığını belirtmişlerdir. Bu durum *Kampilobakter* suşları arasında çoklu direncin yaygın olarak görülebilmesi ile ilişkilendirilmiştir<sup>142</sup>.

Sonuç olarak, faj duyarlılığına göre, antijenik özelliklere göre ve antimikrobik duyarlılık kalıplarına göre identifikasyonu esas alan fenotipik tiplendirme yöntemleri, gerek taksonomik gerekse epidemiyolojik çalışmalar için yeterli duyarlılık ve özgüllüğe sahip değildir. Bu sebeple özellikle epidemiyolojik çalışmalarda, salgınlardan izole edilen suşların tiplendirilmesi ve ilişkilendirilmesinde genotipik yöntemlerin kullanılması istenmektedir<sup>137</sup>.

#### 2.7.5.1.2. Genotipik Yöntemler

*Kampilobakter* izolatlarının genomundaki nokta mutasyonları ve/veya delesyonel mutasyonların tespitini esas alan Pulsed-Field Jel Elektroforezi (PFGE), *fla* gen tipleme, Multilocus Sequence Typing (MLST), kısa palindromic tekrarlayan diziler arasındaki bölgelerin (clustered regularly interspaced short palindromic repeats - CRISPRs) dizi analizi, RAPD-PCR (random amplification of polymorphic DNA) ribotiplendirme ve fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis (FAFLP) gibi çeşitli restriction fragment length polymorphism (RFLP) yöntemlerin süveyans çalışmalarında yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip oldukları gösterilmiştir. Epidemiyolojik tiplendirme metodları kısa süreli epidemilerde ve uzun süreli ve geniş alana yayılan büyük epidemilerde enfeksiyonun kaynağı ve major tipin tespit amacı ile kullanılabileceği gibi, bir salgından izole edilen major tipin daha sonraki salgınlarla muhtemel ilişkisini tespit amacı ile de kullanılmaktadır. Bu sebeple seçilecek olan tiplendirme metodunun, hem kabul gören subtiplendirme şemalarını oluşturan grupları tanımlayabilme özelliğine hemde yüksek ayırım yeteneğine sahip olması gereklidir<sup>137</sup>.

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. 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<sup>143</sup>.

Global moleküler epidemiyolojik çalışmalarda filogenetik ilişkiyi ortaya koyan en uygun yöntemler arasında yer alan Multilocus sequence typing (MLST) ve Multilocus Enzyme Electrophoresis (MEE) yöntemleri, suptiplemede indeks oluştururken, sırası ile, kampilobakterlerdeki çok sayıdaki housekeeping gene ait çeşitli lokusların dizi analizi ve bu genlerinin kodladığı enzimlerdeki polimorfizmin tespitini baz alır. Yani MEE ile MLST birbirinin analogu olan iki yöntemdir. Housekeeping genlerdeki mutasyonlar çok yavaş gelişir ve sıklıkla sessiz mutasyonlardır. Yani meydana gelen mutasyonlar enzimin tabiatını değiştirmez. Bu sebeple MEE ve özellikle MLST bazlı metodlar, tiplendirilen suşlar arasındaki filogenetik ilişkiyi ortaya koymaları sebebi ile global epidemilerde başarı ile kullanılmaktadır. Multilocus sequence typing (MLST) ile dizi analiz yapılan lokuslardan elde edilen her alele 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<sup>144</sup>.

Genotiplemede yaygın olarak kullanılan nükleik asit amplifikasyon bazı metodlardan AFLP/FAFLP prensip olarak PFGE ve MEE'ye benzemektedir. Yüksek ayırım gücüne sahip olduğu bildirilen AFLP yönteminde pürifiye edilmiş tüm kampilobakter genomu 6 baz dizisini tanıyan *Bgl* II veya *Hind* III ya da dört baz dizisini tanıyan *Csp* 6I, *Hha*I veya *Mfe*I gibi restriksiyon enzimleri ile kesilmekte, enzim kesim bölgeleri spesifik oligonükleotidlerle (adaptör oligonükleotid) işaretlenmektedir. Aynı tüp içerisinde geliştirilen bu iki reaksiyonun ardından farklı büyüklükteki gen parçaları, adaptör oligonükleotidlere komplementer floresan boya ile işaretli primerler kullanılarak amplifiye edilmekte, amplifikasyon ürünleri, poliakrilamid jel elektroforezi ile (AFLP) ya da otomatize floresansı okuyan sekans analiz cihazlarında görüntülenmektedir (FAFLP). AFLP yöntemi ile mrp-PFGE yönteminin duyarlılıklarının karşılaştırıldığı 91 salgın suşunun değerlendirildiği bir çalışmada, 4 bazlık bir bölgeyi tanıyan *Bgl* II ve *Mfe*I restriksiyon endonükleazların kullanıldığı AFLP yönteminin *Sma*I restriksiyon enziminin kullanıldığı PFGE yöntemine göre daha yüksek ayırt etme gücüne sahip olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada AFLP yöntemi ile uzunlukları 50-500bp arasında değişen, farklı büyüklükte 20-25 bant oluştuğu, bu bant profillerine göre çalışmaya dahil edilen izolatların 40 farklı AFLP gen kümesi oluşturduğu, PFGE ile elde edilen band profiline göre ise sadece 20 gen kümesi oluştuğu bildirilmiştir.<sup>145</sup> Benzer bir çalışmada 3 ayrı salgında izole edilen kampilobakter suşları, sadece *Hind* III restriksiyon endonükleaz enziminin kullanıldığı AFLP yöntemi ve *Sma*I restriksiyon enziminin kullanıldığı mrp-PFGE ile değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, her iki yöntemin gen küme sayıları ile kümelere dahil edilen suşlar arasında farklılık olmadığı bildirilmiştir. Araştırmacılar, kampilobakter salgın suşlarının tiplendirilmesi ve takibinde daha az ekipman gerektiren ve hızlı sonuç üreten AFLP yönteminin mrp-PFGE'ye alternatif olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir<sup>146</sup>.

İnsan ve hayvanlardan izole edilen toplam 184 kampilobakter izolatu arasındaki genetik ilişkiyi ortaya koymak amacı ile MLST ve AFLP yöntemlerinin kullanıldığı bir başka çalışmada, değerlendirmeye alınan izolatların her iki yöntemle ayrı ayrı 100'den fazla genetik profil oluşturdukları, benzer genetik profile sahip suşların oluşturduğu gen

kümelerinde benzer olduğu ve bu kümelerin suş-konak ilişkisini açık bir şekilde ortaya koyduğu bildirilmiştir<sup>147</sup>.

Kampilobakter izolatlarının moleküler epidemiyolojisinde kullanılan PCR bazlı bir başka yöntemde, Random amplified polymorphic DNA typing (RAPD-DNA) yöntemidir. Bu yöntemle AT yönünden zengin, 8-10 bp uzunluğunda primerler kullanılarak, yüksek tuz konsantrasyonu ve düşük ısıda izolat genomundaki non-spesifik DNA fragmentlerinin amplifikasyonu ve amplikonlar arasındaki polimorfizmin tespiti amaçlanmaktadır. Aynı genotipe sahip suşlar, primerler aynı gen bölgelerine bağlanacağı için ortak amplikonlar üreteceklerdir. Yapılan bir çalışmada RAPD-DNA ve PFGE ile tiplendirilen suşların yüksek derecede benzer profiller verdikleri tesbit edilmiştir. Kolay uygulanabilir oluşu ve düşük maliyeti sebebi ile bu yöntem epidemiyolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bant paternlerinin DNA konsantrasyonundan etkilenmesi ve yorumlanamayan minör bantların oluşumu bu yöntemin en önemli dezavantajları olarak bildirilmektedir<sup>148</sup>.

Kampilobakter salgın izolatlarının genotipilendirilmesinde *fla* geninin varyasyonlarını ortaya koyan amplifikasyon bazlı *fla*/RFLP ve *fla* genindeki kısa değişken bölgelerdeki (SVA) polimorfizmi belirleyen dizi analiz yöntemleride kullanılmaktadır. Ancak tek bir geni hedef alan bu yöntemlerde *C.jejuni* izolatlarında intergenomik ya da intragenomik rekombinasyonlara bağlı olarak, hedef gende oluşan değişiklikler test sonuçlarını etkilenmektedir. Bu dezavantajlar sebebi ile birçok araştırmacı moleküler epidemiyolojik çalışmalarda PFGE ve AFLP gibi tam bakteri genomunu hedef alan yöntemlerin kullanılmasını önermektedir<sup>149</sup>.

Ribozomal RNA (rDNA) 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 rDNA' yı hedef alan prob kullanıldığında yöntemin ayırım gücünün düşük olacağını belirterek, 16S rDNA'yı yada hem 23S rDNA hemde 16S rDNA genini hedef alan prob ve iki farklı enzim kullanılması halinde yöntemin başarısının daha yüksek olacağını bildirmiştir. Ancak AFLP, PFGE ve *flaA* tiplendirme yöntemlerinin, *PstI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile 23S rDNA ve 16S rDNA yı hedef alan propların kullanıldığı ribotiplendirme yöntemi ile karşılaştırıldığı bir çalışmada, salgın suşlarının tiplendirilmesinde

ribotipleme yönteminin ayırım gücünün diğer 3 yönteme göre daha düşük olduğu belirtilmiştir. Diğer taraftan uygulamada yoğun emek gücü gerektirmesi ve sonuçların uzun sürede alınması Ribotiplendirme yöntemlerinin dezavantajı olarak gösterilmiştir<sup>150</sup>.

#### 2.7.6. Kampilobakter Enfeksiyonlarının Tedavisi

Kampilobakterlere bağlı enteriti olan hastaların çoğu antimikrobiyal tedavi gerektirmeden, kendiliğinden iyileşmektedir. 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, aminoglikozit, tetrasiklin grubu antibiyotiklere ve kloramfenikole duyarlıdır.

Yüksek doku düzeyi sağlaması, ciddi toksisitesinin olmaması nedeniyle eritromisin kampilobakter enfeksiyonlarının tedavisinde ilk seçenек 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<sup>109</sup>.

Bunun yansıra kampilobakter türlerinin, özellikle *C.coli*'nin eritromisine karşı her yıl artan oranlarda direnç geliştirdiği bildirilmektedir. Eritromisin ve diğer makrolid grubu antibiyotiklere *C. jejuni* ve *C. coli* nin geliştirdiği direnç, ribozomda antibiyotiğin hedef bölgesinde oluşan mutasyonların neden olduğu düşünülmektedir<sup>110</sup>. Kampilobakterlerin ve diğer enterik patojenlerin neden olduğu ishallerin tedavisinde Kinolon grubu antimikrobiklerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak 1995 yılında kümes hayvanlarında florokinolon kullanımına lisans verilmesi ve bu hayvanlarda yaygın enrofloksasin kullanımının başlaması ile hayvan ve insanlardan izole edilen kampilobakter izolatlarının kinolon grubu antibiyotiklere yüksek oranda direnç geliştirdiği bildirilmiştir. siprofloksasin, eritromisin ve seftriaksona dirençli multidrug rezistans *C. jejuni* ' suşlarının varlığı 2005 yılında rapor edilmiştir<sup>111</sup>.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

*C jejuni* ve diğer kampilobakter türlerinin ishalleri hasta dışkılarındaki izolasyon oranını, klasik kültür ve PCR-RFLP yöntemi ile belirlemek amacı ile planlanan çalışmada, Haziran-2006 ile Ekim-2007 tarihleri arasında kalan toplam 15 aylık süre içerisinde Sağlık Bakanlığı Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi ve Sağlık Bakanlığı Adana Devlet Hastanesi polikliniklerine ishal yakınması ile başvuran 232'si kadın, 202'si erkek hastalara ait olmak üzere toplam 434 dışkı örneği dahil edildi. Örnekleri çalışmaya dahil edilen hastalarımızın 208 (% 47,9)'sinin çocuk, 232 (% 53,4)'sinin ise kadın hastalar olduğu görüldü (Tablo 6).

**Tablo 6: Dışkı örnekleri değerlendirilen hastaların cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılımı.**

| Yaş Grubu     | Kadın      |             | Erkek      |             | Toplam     |              |
|---------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|--------------|
|               | Sayı       | %           | Sayı       | %           | Sayı       | %            |
| 0-5           | 54         | 12,4        | 52         | 12          | 106        | 24,4         |
| 6-14          | 56         | 13          | 46         | 10,6        | 102        | 23,6         |
| 15-29         | 54         | 12,4        | 42         | 9,7         | 96         | 22,1         |
| 30-45         | 32         | 7,4         | 52         | 12          | 84         | 19,4         |
| 46-64         | 28         | 6,4         | 10         | 2,3         | 38         | 8,7          |
| 65 ≤          | 8          | 1,8         | 0          | 0           | 8          | 1,8          |
| <b>Toplam</b> | <b>232</b> | <b>53,4</b> | <b>202</b> | <b>46,6</b> | <b>434</b> | <b>% 100</b> |

Her hastadan, birisi, steril eküvyon yardımı ile önceden steril edilmiş, sızdırmaz kapaklı dışkı kapları içerisine yaklaşık olarak 1 gr, diğeride Modifiye Carry-Blair besiyeri içerisine eküvyon yardımı ile alınmak üzere toplam 2 dışkı örneği alındı. Örnek alınmadan önce hastalar bilgilendirilerek varsa dışkının kanlı ve/veya mukuslu

bölgelerinden dışkı alınması sağlanmıştır. Transport kaplarına alınan örnekler buz kalıpları arasında en geç 2 saat içerisinde laboratuvara taşındı.

Dışkı örneklerinin konvansiyonel kültür yöntemi ile değerlendirilmesinde sadece kampilobakter'ler değil, ishale yol açabilen ve seçici kültür ortamlarında üretilen *salmonella* ve *shigella* türleri ile *Y. enterocolitica* gibi enterik patojenler de araştırıldı. kampilobakter türlerinin izolasyonu için Modifiye Carry-Blair besiyeri içerisinde taşınan örnekler; her birisinden 2 petri kutusuna olmak üzere mCCDA, CAT suplementli CCDA ve Skirrow Selektif Agar (SSA) besiyerlerine ekildi. Ekim yapılan besiyerlerinden birisi 42°C diğeri de 37°C de, % 10 CO<sub>2</sub> içeren kavanozlarda 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda besiyeri yüzeyinde üreyen, 0,3-0.5 mm çaplı gri, şeffaf hemoliz yapmayan koloniler şüpheli kabul edilerek oksidaz aktiviteleri yönünden test edildi. Güçlü oksidaz aktivitesi gösteren koloniler, Gram'ın boyası ile boyanarak mikroskopik morfolojileri yönünden değerlendirildi. Gram negatif, kıvrımlı veya virgül şeklinde görülen koloniler kampilobakter yönünden değerlendirilmek üzere yeni besiyerlerine pasajlandı ve ilk üretme şartlarında tekrar inkübasyona bırakıldı. Hem 42°C hem de 37°C'de üreyen bakteri kolonileri termofilik kampilobakter yönünden değerlendirildi. İkinci pasajda üretilen, makroskopik ve mikroskopik morfolojik özellikleri kampilobakterlerle uyumlu koloniler; Oksidaz ve katalaz aktiviteleri, Hippurati hidrolize etme yetenekleri, TSI agarda H<sub>2</sub>S oluşturma özellikleri, Sefalotin, Nalidiksik asit ve Tuz tolerans yeteneklerine göre fenotiplendirildi.

Diğer enterik patojenler için, dışkı kabı ile taşınan örnekler ; Selenit-F sıvı besiyerine, CIN agar besiyerine ve XLD besiyerlerine ekildi. Selenit-F besiyeri içerisine ekilen örnekler 37°C'de 8 saat inkübe edildikten sonra, XLD besiyerine pasajlandı. Ekim ve pasaj yapılan besiyerleri 37°C'de aerobik etüvlerde 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda XLD besiyerinde üreyen renksiz koloniler *salmonella* ve *shigella* yönünden değerlendirilirken, CIN agar besiyerinde üreyen ortaları koyu kırmızı, çevresi şeffaf zona sahip koloniler *Y. enterocolitica* yönünden şüpheli kabul edilerek fenotipik yöntemlerle ileri identifikasyonları yapıldı.

Taşıma kabı içerisinde transport edilen dışkı örneğinden PCR-RFLP yöntemi ile kampilobakter varlığı ve tip tayini yapabilmek amacı ile bir miktar alınarak QIA-Gen Dışkı ekstraksiyon kiti (QIAamp DNA Stool Kit Kat No:51504) içerisine alındı ve total dışkı DNA ekstraksiyonu yapıldı. Ekstraksiyon sonucu elde edilen DNA, UV

spektrofotometrede kantite edildi ve PCR’da kalıp olarak kullanılmak üzere çalışma yapılana kadar -20°C’de saklandı. Kampilobakterlerin 23S rDNA genlerindeki termofilik türler için spesifik 491 bp’lik bölge, spesifik primerler yardımı ile amplifiye edildi, ampliconlar *AluI* ve *Tsp609* restriksiyon enzimleri ile kesilerek fragment profilleri yönünden değerlendirildi. *AluI* ile kesim sonrası 202 bp 166 bp ve 124 bp büyüklüğünde fragment profili veren ampliconlar *C.jejuni* olarak tiplendirildi.

### 3.1. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Çalışmamızda taşıma ve üretme amaçlı olmak üzere 2 farklı grup besiyerleri kullanıldı..

#### 3.1.1. Taşıma Besiyerleri

Kampilobakter türlerinin izolasyonunda kullanılacak örneklerin taşınmasında Modifiye Carry-Blair besiyeri kullanıldı.

##### 3.1.1.1. Modifiye Carry-Blair Besiyeri

|                                  |         |
|----------------------------------|---------|
| Sodyum tioglikolat               | 1,5 gr. |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1,1 gr. |
| NaCl                             | 5 gr.   |
| Agar                             | 1,6 gr  |
| Distile su                       | 991 ml. |
| Ph                               | 7,4     |

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

### 3. 1. 2. Üretim Besiyerleri

Dışkı örneklerinden kampilobakter izolasyonu için, koyun kanı içeren Skirrow Selektif Agar (SSA) besiyeri, Modifiye kampilobakter Blood- Free Selective Agar (mCCDA agar) ve CAT supplement içeren CCDA besiyeri, *Salmonella* ve *Shigella* izolasyonu için Selenit-F zenginleştirici sıvı besiyeri ve XLD besiyeri ile *Y.enterocolitika* izolasyonu için CIN Agar besiyeri kullanıldı.

#### 3. 1. 2.1. Skirrow Selektif Agar Besiyeri (SSA)

Besiyeri kanlı agar içerisine antibiyotik kombinasyonlarından oluşan selektif supplementin ilavesi ile aşağıdaki şekilde hazırlandı:

|                                                   |        |
|---------------------------------------------------|--------|
| Kanlı Agar Base (Blood agar base Merck VL 823286) | 20 gr  |
| Distile Su (DS)                                   | 500 ml |
| Koyun kanı (defibrine)                            | 35 ml  |

Ticari olarak temin edilen kanlı agar besiyeri, DS içerisinde benmaride eritildikten sonra pH'sı ayarlandı ve otoklavda 120°C 'de 15 dakika bekletilerek steril edildi. Oda ısısında soğumaya bırakılan besiyerinin ısısı 40-42 °C'ye gelince 35 ml defibrine koyun kanı ile 2mg Vankomisin, 0,05 mg Polimiksin, 1.0 mg Trimethoprim içeren ve 2ml steril distile su içerisinde çözülerek kullanıma hazır hale getirilen 1 vial Skirrow selektif supplement (Merck 1.02249.0001) besiyeri içerisine ilave edildi. Steril petri kutularına 20 ml miktarında dökülen besiyerleri, kullanılıncaya kadar +4°C' de saklandı

#### 3.1.2.2. Modifiye Kampilobakter Blood- Free Selective Agar = Modified Charcoal Cefoperazon Deoxycholate Agar (Mccda)

Besiyeri Modifiye Kampilobakter Blood- Free Selective Agar (mCCDA) içerisine antibiyotik kombinasyonlarından oluşan selektif supplementin ilavesi ile aşağıdaki şekilde hazırlandı.

|                                               |        |
|-----------------------------------------------|--------|
| Kampilobakter Blood- Free Selective Agar Base | 22.75  |
| (mCCDA agar Merck, VM830670-716)              |        |
| DS                                            | 500 ml |

Ticari olarak temin edilen mCCDA besiyeri, distile su içerisinde, benmaride homojen hale gelinceye kadar eritildi ve otoklavda 120 °C ‘de 15 dakika bekletilerek steril edildi. Oda ısısında soğumaya bırakılan besiyeri ısısı 40-42 °C’ye gelince 16 mg sefaperazon, 5 mg amfoterisin B içeren ve 2ml steril distile su içerisinde çözülerek kullanıma hazır hale getirilen 1 vial CCDA selektif suplementi (Merck 1.00071.0001) besiyerine eklendi. Steril petri kutularına 20 ml miktarında dökülen besiyerleri, kullanılıncaya kadar +4°C ‘de saklandı

### **3.1.2.3 Sefaperazon, Amfoterisin B, Teikoplanin (CAT)**

#### **Suplementli mCCDA Besiyeri**

Modifiye kampilobakter Blood-Free Selective (mCCDA) agar 3.1.2.2. de tarif edildiği şekilde hazırlandı ve otoklavda 120°C ‘de 15 dakika bekletilerek steril edildi. Oda ısısında soğumaya bırakılan besiyerinin ısısı 40-42 °C’ye gelince içerisine, herbiri ayrı olarak tartılıp 2 ml steril distile suda eritilmiş olan 4mg Sefaperazon, 5mg Amfoterisin B ve 2mg Teikoplanin besiyerine eklendi. Steril petri kutularına 20 ml miktarında dökülen besiyerleri, kullanılıncaya kadar +4°C ‘de saklandı.

### **3.1.2.4. Selenit–F Sıvı Besiyeri**

Ticari olarak temin edilen Selenite Enrichment Broth (Merc 1.07717) besiyeri üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlandı ve steril edildi. Besiyeri 45-50 °C’ye soğuyunca, steril ve sıkı tıkaçlı tüplere, her birinde 7 ml besiyeri olacak şekilde paylaştırıldı. Kullanılıncaya kadar +4°C’de saklandı.

### **3.1.2.5. XLD (Ksiloz Lizin Deoksikolat Agar ) Besiyeri**

Ticari olarak temin edilen XLD (OxoidCMO469) besiyeri üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlandı ve steril edildi. Besiyeri soğuyunca steril petri kutularına döküldü ve kullanılıncaya kadar +4°C ‘de saklandı.

### **3.1.2.6. Yersinia Sellektif Suplementli (CIN agar ) Besiyeri**

Ticari olarak temin edilen Yersinia Sellektif agar (CIN agar) ( Merck VM 972934) üretici firmanın önerdiği şekilde hazırlandı ve otoklavda 120°C'de 15 dakika bekletilerek steril edildi. Oda ısısında soğumaya bırakılan besiyerinin ısısı 40-42°C'ye gelince içerisine 7,5 mg sefsulodin, 1.25 mg. Novobiosin, 2.0 Irgasan içeren ve 2ml steril distile su içerisinde çözülerek kullanıma hazır hale getirilen 1 vial Yersinia Sellektif supplement (Oxoid:SR0109) eklendi. Steril petri kutularına 20 ml miktarında dökülen besiyerleri kullanılıncaya kadar +4°C 'de saklandı.

### **3.2. Dışkı Örneklerinin Kampilobakterler İçin Seçici Besiyerlerine**

#### **Ekimi ve İnkübasyonu**

Cary-Blair taşıma besiyerine alınan dışkı örnekleri, her bir besiyerinden 2 petri kutusuna olmak üzere, mCCDA, CAT supplementli CCDA ve SSA besiyerlerine tek kullanımlık plastik öze kullanılarak tek koloni düşecek şekilde ekildi. Besiyeri plakları anaerobik jar içerisine, % 10 CO<sub>2</sub>, % 5 H<sub>2</sub> ve % 85 N<sub>2</sub>' den oluşan mikroaerofilik atmosfer oluşturan, kullanıma hazır, gaz üreten iyon zarfı (CampyGen *Campylobacter* System Oxoid CN 0025A, 494489) ile birlikte yerleştirildi. Ekim yapılan besiyerlerinden birisi 42°C diğeri 37°C de inkübe edildi. Ekim yapılan plaklarının tamamı, 48 saat süren inkübasyonun ardından kampilobakter üremesi yönünden değerlendirildi. Üremenin olmadığı plaklar tekrar kapatıldı ve her gün üreme yönünden kontrol edilerek 5gün süre ile inkübasyona devam edildi. Bu sürenin sonunda üreme görülmeyen plaklar atıldı.

### **3.3. Kampilobakter Suşlarının Identifikasyonu**

Skirrow Sellektif Agar besiyerinde üreyen, 0.3-0.5 mm çapında, non hemolitik, su damlası gibi nemli, gri/beyaz, agarın yüzeyine doğru bir tabaka şeklinde üreme gösteren tipik koloniler ile, kansız mCCDA ve CAT besiyerinde, 0.5 mm çapında, grimsi renkte, bazen metalik refle veren, düz yüzeyli ancak yayılma eğilimi gösteren koloniler kampilobakter yönünden şüpheli kabul edilerek oksidaz ve katalaz enzim aktiviteleri yönünden değerlendirildi. Her iki enzimatik reaksiyonu pozitif bulunan kolonilerden hazırlanan yayma preparasyonlar, Gram'ın boyası ile boyandı ve ışık mikroskopunda X 100 büyütmede incelendi. Mikroskopta Gram negatif, kıvrımlı veya virgül şeklinde

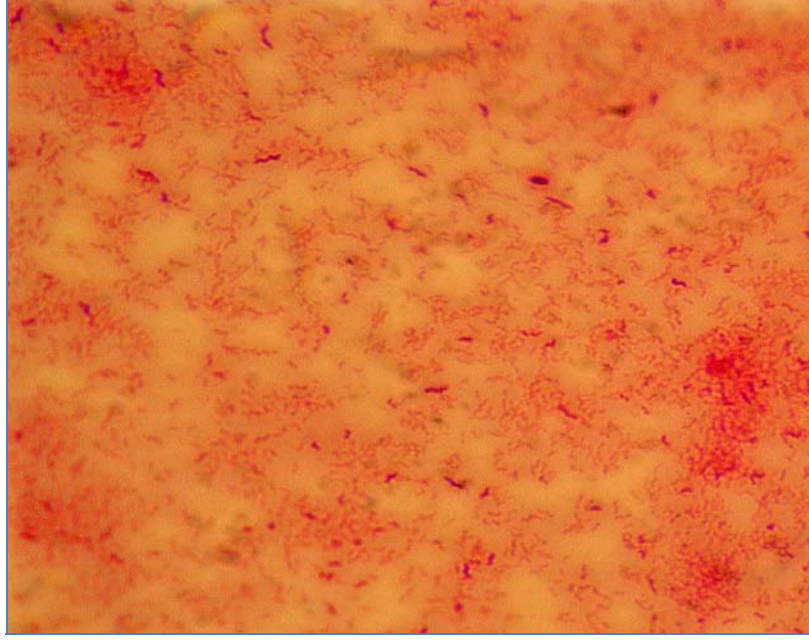
görülen koloniler kampilobakter ön tanısı ile ileri identifikasyon çalışmaları için saf olarak elde edilmek üzere seçici besiyerine pasajlandı.(Şekil 1, 2). Pasajda saf olarak üreyen koloniler tekrar oksidaz ve katalaz aktiviteleri ve gram boyanma özellikleri yönünden doğrulandıktan sonra identifikasyon testlerine başlandı. Besiyeri yüzeyinden öze ile toplanan 2-3 koloni, 23Sr RNA PCR- RFLP yöntemi ile genotipleme amacı ile, 200 µl TE buffer (10mM Tris HCl,1mmM EDTA, pH: 8.0) içerisine alındı ve kullanılıncaya kadar -20 °C’de saklandı



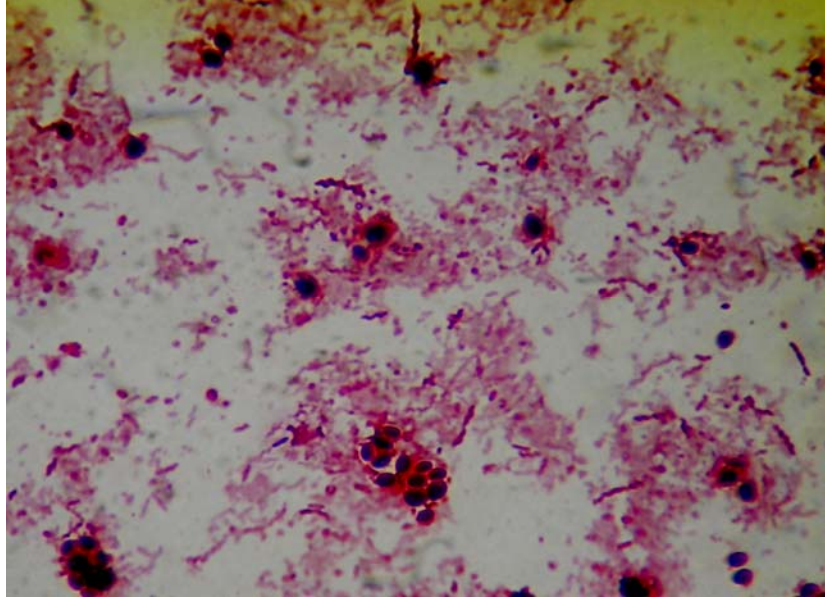
**Şekil 2: Skirrow'un seçici besiyerinde üretilen kampilobakter kolonilerinin görünümü.**



**Şekil 3: Modifiye kampilobakter Blood-Free Selective Agar besiyerinde üretilen kampilobakter klonilerinin görünümü.**



**Şekil 4 : Seçici besiyerinde üreyen , kampilobakter kolonilerinden hazırlanan Gram boyalı preparatların, X 100 büyütmedeki mikroskopik görüntüsü.**



**Şekil 5: Taze dışkı örneğinden hazırlanan Gram boyalı preparatların 100 X büyütmedeki mikroskopik görüntüsü.**

Besiyeri üzerinde kalan kampilobakter kolonileri fenotipik identifikasyon amacı ile oksidaz ve katalaz aktivitelerine ek olarak, sülfürlü bileşikleri kullanabilme yeteneğinin tespiti için, Triple Sugar Iron Agar’ da H<sub>2</sub>S oluşumu, hippurik asidi hidrolize edebilme yeteneğinin tespiti için, hippurat hidrolizi, seçici antibiyotiklere toleranslarının tespiti içinde disk diffüzyon yöntemi ile nalidiksik asit ve sefalotin dirençliliği yönünden değerlendirildi.

### 3.3.1. Oksidaz Testi

Oksidaz ayırıcının hazırlanışı:

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| Tetramethyl-1,4-phenylenediamine | 0,1 gr |
| Distile su                       | 10 ml  |

Tetramethyl-p-phenylenediamine distile suya ilavesi ile günlük olarak hazırlanan ayıraç, ışık geçirmeyen kapaklı cam şişelere koyuldu ve kullanılıncaya kadar +4°C’ saklandı.

Önceden bantlar halinde kesilip, steril edilmiş filtre kağıtları temiz lamın üzerine konuldu. Filtre kağıdının üzerine 2-3 damla oksidaz ayırıcı damlatıldı. Besiyerinden plastik öze yardımı ile alınan şüpheli koloni, filtre kağıdı üzerindeki ayırıcın damlatıldığı bölgeye sürüldü. Filtre kağıdındaki sürüntü bölgesinde 5-15 saniye içinde mor renk oluşumunun gözlenmesi halinde oksidaz testi pozitif olarak kabul edildi.

### 3.3.2. Katalaz Testi

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

### 3.3.3 Triple Sugar İron Agar (TSI)’ da H<sub>2</sub>S Oluşumunun Değerlendirilmesi

Kuru toz halinde ticari olarak temin edilen TSI agar (Merck 1.03915)’dan 32,5 gr alınarak 500 ml distile su içerisine konuldu ve agar tamamen eriyinceye kadar benmaride kaynatıldı. Daha sonra 40-45°C’ye kadar soğutularak pH sı ayarlanan besiyeri otoklavda 121°C’de 15 dakika bekletilerek steril edildi. Otoklavdan

çıkarıldıktan sonra 50°C'ye kadar soğutulan besiyeri 8 ml hacimlerde steril cam tüplere paylaştırıldı. Tüpler dipte 3 cm'lik bir dik kısım ve üstte bir yatık kısım kalacak şekilde yatık tutularak katılaşmaya bırakıldı.

Şüpheli kampilobakter kolonilerinden 2-3 tanesi iğne öze ile alınarak TSI agara ekildi ve mikroaerofilik ortamda 37°C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda besiyerleri üreme ve H<sub>2</sub>S oluşumu yönünden değerlendirildi.

### **3. 3. 4. Hippurat Hidroliz testi**

Test için gerekli olan sodyum Hippurat solüsyonu ve Ninhidrin ayıracı önceden hazırlandı ve önerilen ısıda saklandı.

#### **Sodyum Hippurat Solüsyonunun Hazırlanışı**

Toz halindeki 1 gr Sodyum Hippurat'ın 100ml distile suda eritilmesi ile hazırlanan solüsyon, 0,4 ml lik tüplere dağıtıldı ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

#### **Ninhidrin Ayıracının Hazırlanışı**

50 ml Aseton ve 50ml Butanol içeren karışıma 3,5 gram Ninhidrin ayıracı eklendi ve kullanılıncaya kadar karanlıkta, oda ısısında saklandı.

#### **Hippurat Hidroliz Testi'nin Uygulaması**

Kampilobakter kolonilerinden birkaç tane alınarak Sodyum hippurat solüsyonunda yoğun bulanıklık oluşturuldu ve 37 ° C' de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda solüsyona 0,2 ml ninhidrin ayıracı damlatıldı ve 37 ° C' de 10 dakika daha inkübe edildi. Test sonucu solüsyonun renginin koyu mor renge dönüşmesi halinde pozitif, açık mor veya renksiz kalması halinde ise negatif olarak değerlendirildi (Şekil 6).



**Şekil 6: Hippurat Hidroliz Testinin değerlendirilmesi.**  
Soldaki tüp negatif, sağdaki tüp pozitif hippurat hidroliz testini göstermektedir.

### **3. 3. 5. Sefalotin ve Nalidiksik Asit Duyarlılık Testleri**

Selektif besiyerinde üreyen, kampilobakter tanılı kolonilerden bir öze dolusu alınarak serum fizyolojik içerisinde Mc Farland 0,5 bulanıklık standardına eşdeğer yoğunlukta bakteri süspansiyonu elde edilene kadar homojenize edildi. Bakteri süspansiyonu içerisine daldırılıp 1-2 dakika bekletilen pamuklu öze, fazla sıvının bırakılması için tüp kenarına bastırılarak çıkartıldı ve antibiyotik ilave edilmemiş % 7 koyun kanı içeren kanlı agar besiyerinin yüzeyine sürüldü. Besiyerlerinin yüzeyinde artık sıvı besiyerinin kalmamasına dikkat edildikten sonra besiyeri yüzeyine en az 4 cm aralıklarla, 30 µg nalidiksik asit ve 30 µg sefalotin içeren diskler steril bir pens yardımı ile yerleştirildi. Besiyerleri mikroaerofilik atmosferde, 37°C’de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda disk etrafında inhibisyon zon çapları cetvelle ölçüldü. Nalidiksik asit için 10 mm ve üzeri, sefalotin için 14 mm ve üzeri çapa sahip koloniler o antibiyotik için duyarlı olarak değerlendirildi.

### **3.3.6. Tuz Tolerans Testi**

İzolatlar % 1,5 oranında NaCl içeren kanlı agara ekildi. Mikroaerofilik şartlarda inkübe edildi. Ekim yapılan plaklar 48 saat sonra üreme yönünden değerlendirildi.

### 3.3.7. İdentifikasyon Testlerinin Yorumlanması

Tüm incelemeler sonunda kampilobakterler için seçici besiyerinde mikroaerofil atmosferde hem 37°C hem de 42°C’de, üreyen termofilik özellikteki, oksidaz ve katalaz aktivitesine sahip, Triple Sugar Iron Agar’ da H<sub>2</sub>S oluşturmayan, kolonilerden;

a- Nalidiksik asite duyarlı, sefalotine dirençli olup hüppüratı hidroliz testi pozitif olanlar *C.jejuni*

b- Nalidiksik asite ve sefalotine dirençli olup, hippürat hidroliz testi negatif olanlar *C.lari*,

c- Nalidiksik asite duyarlı, sefalotine dirençli olup hippürat hidroliz testi negatif olanlar *C.coli* olarak identifiye edildi.

### 3.4. Diğer Enterik Patojenlerin İdentifikasyonu

XLD besiyerinde üreyen, kırmızı kolonilerden oksidaz ve üreaz aktivitesi içermeyenler, Salmonella ve Shigella yönünden şüpheli kabul edilip, glikoz, laktoz ve mannitole etkileri ile gaz, H<sub>2</sub>S ve İndol oluşumu yönünden değerlendirilmek üzere Braun A ve Braun B besiyerine ekildi. CIN Agar besiyerinde üreyen *Y.enterocolitika* yönünden şüpheli koloniler şekerlere olan etkileri için TSİ besiyerine, üreaz aktivitelerinin değerlendirilmesi için Christensen’in % 2’lik sıvı üre besiyerine, 25 ° C ve 37 ° C’de hareket özelliklerinin değerlendirilmesi için Motilite İndol Lizin Medium (MIL) hareket besiyerine ekildi ve değerlendirildi<sup>49</sup>.

### 3. 5. PCR/RFLP Uygulamaları

İshalli hastalardan toplanan 434 dışkı örneği, kültür izolasyonu ile eş zamanlı olarak, termofilik kampilobakter türlerine ait 23Sr RNA geni üzerindeki spesifik dizilerin varlığını tespit amacı ile, moleküler bazlı bir yöntem olan, PCR-RFLP yöntemi ile değerlendirildi. PCR-RFLP ile tanımlama direk dışkı örneklerinden ekstrakte edilen DNA ve kültürde izole edilen ve fenotipik karakterleri kampilobakterlerle uyumlu olduğu için yapılan kültür pasajı sonrası TE buffer içerisine toplanarak saklanan izolatlardan ekstrakte edilen DNA kalıpları ile yapıldı. PCR-RFLP ile tip tayini sırası ile:

1. DNA ekstraksiyonu

2. Termofilik kampilobakter türlerinin 23S rDNA genine ait 491bp lik fragmentin PCR ile amplifikasyonu

3. Amplikonların agaroz gel elektroforezi ile tespiti

4. Tip tayini için amplikonların RE ile hazmı ve hazım sonucu oluşan fragmentlerin agaroz gelde görüntülenerek tanımlanması: RFLP aşamaları ile tamamlandı

### 3.5.1. DNA Ekstraksiyonu

**I. Dışkı örneklerinden DNA Ekstraksiyonu:** Çalışmaya alınan dışkı örneklerinden kampilobakter DNA'sının ekstraksiyonu için QIA-GEN (QIAamp DNA Stool Kit Kat No:51504) dışkı ekstraksiyon kiti kullanıldı. Kit içeriği aşağıdaki gibidir.

QIAamp spin columns

Koleksiyon tüpleri (2ml)

İnhibit EX tablet

Buffer ASL

Buffer AL

Buffer AW1

Buffer AW2

Buffer AE

Proteinaz K.

Örneklerden QIAGEN kiti ile DNA ekstraksiyonu aşağıdaki sıraya göre tamamlandı:

1. Yaklaşık 180-220 mg dışkı örneği 2 ml'lik ependorf tüplerine alındı (örnek sıvı kıvamda ise 200 µl koyuldu). Örneklerin üzerine 1,4 ml ASL buffer eklendi ve homojenize oluncaya kadar vortekslendi ve su banyosunda 70°C'de 5 dakika bekletilerek tam olarak erimesi sağlandı.

2. İnkübasyon süresi sonunda, karışım önce homojenizasyon için 15 saniye vortekslendi, daha sonra kaba partiküllerin uzaklaştırılması amacı ile 14,000 rpm'de, 1 dakika santrifüje edildi. Santrifüj sonunda oluşan süpernatantın 1,2 ml'si, 2 ml'lik yeni bir tüpe aktarıldı ve tortu/pellet atıldı.

3. Dışkı içerisinde bulunan, DNA degradasyonuna ve PCR aşamasında enzimatik reaksiyonların inhibisyonuna sebep olan inhibitörlerin adsorbsiyonu için süpernatantın üzerine 1 tablet inhibit ex atıldı ve eriyinceye kadar, yaklaşık 1 dakika vortekslendi. Tam erime sağlandıktan sonra tüpler 1 dakika oda ısısında bekletildi. Bekleme süresinin sonunda örnekler 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüje edildi. Santrifüj sonucu oluşan süpernatant yeni ependorf tüpüne alındı ve pellet atıldı.

4. Süpernatant 3 dakika aynı şartlarda yeniden santrifüj edildi ve yeni oluşan süpernatant yeni ependorf tüpüne alındı ve pellet atıldı.

5. Süpernatantdan 200 µl alınarak yeni bir ependorf tüpüne koyuldu. Bakteri hücre duvarı patlatılarak DNA'nın serbest kalmasını sağlamak için tüpdeki süpernatant üzerine 15 µl proteinaz K ve 200 µl AL buffer eklendi ve karışım homojen hale gelinceye kadar, yaklaşık olarak 15 saniye vortekslendi ve hemen 70°C'lik su banyosunda 10 dakika bekletildi.

6. Süre sonunda karışıma hücre lipidlerinin hidrolizi için 200 µl etanol (% 96-100) eklendi ve 15 saniye vortekslendi.

7. Karışımın tamamı Qiagen koleksiyon tüpüne aktarıldı ve 14,000 rpm'de 1 dakika santrifüje edildi. Karışım filtreden süzülöldükten sonra alt tüp atıldı. Filtre yeni bir spin kolon tüpüne koyuldu.

8. Filtrenin üstüne 500 µl AW 1 buffer koyuldu ve 1 dakika 14,000 rpm'de santrifüj edildi. Alt tüp atıldı, filtre yeni bir spin kolon tüpüne aktarıldı.

9. Filtrenin üstüne 500 µl AW2 buffer eklendi ve 14,000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.

10. Alt tüp atıldı filtre AW2 bufferdan tamamen arındırılma üzere, yeni bir spin kolon tüpüne aktarıldı ve 14,000 rpm'de, 1 dakika santrifüje edildi. Rezidü AW2 buffer alt tüpe geçti.

11. Alt tüp atıldı, filtre 2 ml'lik kapaklı ependorfa oturtuldu. Filtrenin üstüne 200 µl AE buffer eklendi ve 1 dakika oda ısısında bekletildi. Bekleme süresinin bitiminde 14,000 rpm'de, 1 dakika santrifüj edildi. Filtre uzaklaştırıldı, ependorf kapatılıp -20°C'ye kaldırılır. Bu işlem sonunda 200 µl DNA ekstraktı elde edildi.

Ekstrakte edilmiş DNA içeren tüpler, spektrofotometrede (CHEBIOS s.r.l. Optimum-One UV-VIS Spectrophotometer) 260 nm dalga boyunda okunarak, optik dansiteleri (OD260) belirlendi. Örneklerdeki total DNA konsantrasyonu (µg/ml) =

OD260 x Seyreltme faktörü x 50 formülü ile hesaplandı. Sonuç olarak dışkı örneklerinden ekstrakte edilen DNA miktarının 3-12 µg/ml olduğu tespit edildi. Amplifikasyon aşamasında 50 ng kalıp DNA kullanılacağından elde edilen ekstraktların çalışma için oldukça yeterli miktarda olduğu görüldü. DNA miktarı yönünden kantite edilmiş tüpler PCR ile amplifikasyon çalışması başlatılana kadar -20 °C’de saklandı.

**II. Kültürde İzole edilen suşlardan DNA Ekstraksiyonu:** Daha önce seçici besiyerinde üreyen kampilobakter ön tanımlı kolonilerden TE buffer içerisine alınarak ependorf tüplerinde saklanan örnekler, 23S rDNA’ geni üzerindeki hedef bölgelerin amplifikasyonu amacı ile DNA kalıbı olarak kullanılmak üzere DNA ekstraksiyonu işlemine tabi tutuldu. Bu amaçla dondurup çözme yöntemi kullanıldı. Bu işlemde sırası ile aşağıdaki şekilde tamamlandı:

1. Derin dondurucuda -20°C saklanan örnekler derhal ısı bloğuna alınarak, 95°C’de 5 dakika kaynatıldı.
2. Kaynatma işleminin ardından örnekler, 20°C’de 1-2 saat tutularak tekrar donduruldu. Bu işlemler üç kez tekrarlandı.
3. Dondurup çözme işlemlerinden sonra örnekler 13.000 rpm’de, 3 dakika santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonunda oluşan süpernatant yeni ependorf tüpüne aktarıldı. Spektrofotometrede DNA kantitasyonu yapılan örnekler PCR ile amplifikasyon işleminde kalıp olarak kullanılıncaya kadar - 20C de saklandı.

### 3.5.2. Termofilik Bölgenin Amplifikasyonu

Termofilik kampilobakterlerin 23S rDNA geninde 43 ile 69. heliksler arasında yer alan ve dört farklı termofilik kampilobakter türü için spesifik olan 491 bp uzunluğundaki bölgenin amplifikasyonu için THERM (F-5’-TAT TCC AAT ACCAAC ATT AGT - 3’)ve THERM-4 (R-5’-CTT CGC TAA TGC TAA CCC -3’) primerler kullanıldı.

Amplifikasyon; 10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, herbir dNTP’den 200 µM, herbir primerden 25 pmol, 2,5 U *Taq* polymerase ve 50ng/5µl kalıp DNA içeren, toplam 50 mikrolitre PCR karışımında gerçekleştirildi. Amplifikasyon aşamaları Termal Cyler (APPLIED BIOSYSTEMS 2720 Termal Cyler) termal döngü cihazında aşağıdaki döngü sırasına göre tamamlandı:

|                                       |            |
|---------------------------------------|------------|
| 94°C’de 5 dak. ilk denaturasyon       |            |
| 93 °C’de 1 dak. denaturasyon          |            |
| 56°C’de 1,5 dak. bağlanma (annealing) | } 40 döngü |
| 72°C’de 1 dak. uzama (extension)      |            |
| 72 °C’de 7 dak. son uzama (extension) |            |

Döngü sonunda elde edilen amplikonlar % 05 etidyum bromürlü % 2’lik agaroz jel elektroforezi ile araştırıldı. Agaroz jelin hazırlanmasında ve tank tamponu olarak 1XTBE (pH: 8.2) tamponu kullanıldı. TBE (Tris, Borik asit, EDTA) tamponu; 108 gr/L Tris-Base, 55 gr/L Borik asit ve 8.3 gr/L EDTA ile distile su içerisinde 10X stok solüsyon olarak hazırlandı ve gerektiğinde, 1xTBE olacak şekilde sulandırıldı.

### 3.5.3. Agaroz Jel Elektroforezinin Uygulaması

Amplifikasyon işlemi sonrasında hedeflenen bölgeyi temsil eden büyüklükteki amplikonların varlığını gösterebilmek amacı ile, amplikonlar elektrikli ortamda agaroz jel içerisinde migrasyonel seperasyona tabii tutuldu. Bu işlem aşağıdaki şekilde yapıldı;

1. Elektroforez matriksi olarak kullanılmak üzer % 2’lik agaroz jel 1xTBE solüsyonu ile hazırlandı.
2. Bir balon içerisine tartılarak konulan 2 gr agaroz (Sigma Agarose A5093-500G) üzerine 100 ml 1xTBE ilave edildi.
3. Karışım homojenizasyon sağlanana kadar mikrodalga fırında eritildi.
4. Oda ısısında 60 °C’nin altına düşmeyecek şekilde bekletilerek soğutuldu.
5. Eriyik haldeki agaroz içerisine 10 mg/ml’lik etidyum bromid stok solüsyonundan 5 µl eklenerek, % 0,5 mg/ml son konsantrasyon elde edildi.
6. Hazırlanan % 0,5 ethidium bromid içeren % 2’lik agaroz jel, önceden hazırlanmış ve tarakları uygun olarak yerleştirilmiş jel kalıp tepsisinin üzerine yavaşça döküldü.
7. Oda sıcaklığında 20-30 dakika bekletilerek jel kalıbının katılaşması sağlandı.
8. Jel kalıbı elektroforez tankına (OWL Separation Systems Model B2 Mini Gel Electrophoresis System) yerleştirilerek taraklar yavaşça çıkarıldı.

9. Örneklerden 5'er µl alınarak parafilm üzerindeki 1xTBE ile hazırlanmış % 20 sükröz, % 0,25 brom fenol mavisini ile hazırlanmış 3 µl yükleme tamponunun karıştırıldı. Bu karışımdan 2. kuyudan itibaren açılan her kuyuya bir örnek olacak şekilde 5 µl alınarak konuldu. İlk kuyuya DNA markeri (Fermentas O'Range Ruler, 100bp+500bp Ladder, Lot: 0302 ) yüklendi.

10. Tankın güç kaynağı (LABNET International Power Station 300) çalıştırılarak 80 mA – 120 V akım verildi.

11. Brom fenol mavisinin jeldeki migrasyonu takip edilerek, boya jelin 2/3'lik kısmına ulaştığında elektroforez durduruldu.

13. Jel tanktan çıkarıldı ve jel görüntüleme sistemi ( Kodak Gel Logic 1500 Imaging System) ile görüntülenerek incelendi.

#### 3.5.4. RFLP Uygulamaları

PCR ile çoğaltılan ve kampilobakter 23S rDNA geni üzerindeki hedef dizilerle uyumlu olan ampikonlar, tür düzeyinde identifikasyon için *Alu I* ve *Tsp 509I* RE ile kesildi. Kesim sonucu ortaya çıkan DNA fragmentlerindeki polimorfizm termofilik kampilobakterlerin tip düzeyinde tanımlanmasını sağladı.

Enzim ile kesimde enzimin aktivitesine uygun substrat konsantrasyonunun standardizasyonu için, enzimle kesilecek olan kalıp ampikonların DNA miktarı spektrofotometrede (CHEBIOS s.r.l. Optimum-One UV-VIS Spectrophotometer) ölçüldü. Çalışma esnasında substrat konsantrasyonundaki toplam DNA miktarı, üretici firma önerileri doğrultusunda, toplam hacimde 1µg olacak şekilde hesaplandı. Bu çalışmada 2 farklı restriksiyon enzimi kullanıldığı için her enzim kendi özel tamponu ve substratı ile 2 farklı tüpte çalışıldı;

#### I. *Alu I* Restriksiyon Endonükleazı ile ampikonların kesimi

Termofilik kampilobakterlere ait olduğu tespit edilen Ampikonlar ticari olarak sağlanan, genomda 5'AGCT 3' baz dizisini tanıyan ve hedef diziyi G ile C arasından keserek kör uçlu fragmanlar oluşturan (Şekil 6) ***Alu I* Restriction enzimi (Promega R6281;)** ile hazmettirildi. *Alu I* enzimi, 10.000 U/ml aktif enzim içeren 0.1 ml'lik viallerde, kullanıma hazır olarak sağlandı. Enzimin çalışma tamponu olan asetillenmiş BSA ve 10X RE Buffer da enzimle birlikte kullanıma hazır olarak alındı.



Şekil 7: *Alu I* restriksiyon enziminin hedef aldığı baz dizisi ve kesim bölgesi.

Enzimatik kesim için reaksiyon karışımı aşağıdaki şekilde hazırlandı

|                      |                        |
|----------------------|------------------------|
| <i>AluI</i> (10U/μl) | 0,1 μl                 |
| RE Buffer (10x)      | 2.0 μl                 |
| Asetilated BSA       | 0.2 μl                 |
| Amplikon             | 10 μl (0,1 μg/μl DNA ) |
| Distile su           | 7.7 μl                 |
| Toplam hacim         | 20 μl                  |

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

## II. *Tsp 509I* Restriksiyon Endonükleazı İle Amplikonların Kesimi

Termofilik kampilobakterlere ait olan Amplikonlar, yine ticari olarak sağlanan, genomda 5'AATT 3'baz dizisini tanıyan ve hedef diziyi ilk Adenin rezidüsünden önce palindromik olarak kesen *Tsp 509I* restriksiyon enzimi (**Bio Labs, Kat No:R5076L**) ile hazmettirildi. *Tsp 509I* enzimi, 10,000 unit/ml aktif enzim içeren 100 ml viallerle kullanıma hazır olarak sağlandı. Enzimin çalışma solüsyonu olan 1XNE Buffer enzimle birlikte alındı (Şekil 7)





Şekil 8: *Tsp 509I* restriksiyon enziminin hedef aldığı baz dizisi ve kesim bölgesi.

Enzimatik hazım için reaksiyon karışımı aşağıdaki şekilde hazırlandı:

|                           |                       |
|---------------------------|-----------------------|
| <i>Tsp 509I</i> (10U/µl ) | 0,1 µl                |
| Kalıp DNA                 | 10.µl (0,1 µg/µl DNA) |
| 1XNEBuffer Buffer (10x)   | 5 µl                  |
| DS:                       | 34,9 µl               |

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

### III. RFLP Sonuçlarının Yorumlanması

Termofilik kampilobakter tür tayini için amplifiye edilen 23S rDNA üzerindeki 491 bp’lik ampikonlar, *Alu I* ve *Tsp 509I* restriksiyon enzimi ile kesildikten sonra, jel elektroforezinde gösterdikleri fragment profil polimorfizmine göre tip düzeyinde tanımlandılar. Tiplendirmede Engwal EO ve arkadaşlarının kriterleri baz olarak alındı.<sup>14</sup> (Tablo7)

**Tablo 7: Engwall E. ve Fermer C. tarafından belirlenen, PCR-RFLP fragment polimorfizmine göre kampilobakter tiplendirilme kriterleri<sup>14</sup>.**

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

#### 4. BULGULAR

Konvansiyonel kültür yöntemleri ile PCR-RFLP yönteminin ishalleri hasta dışkı örneklerindeki termofilik kampilobakter türlerinin tespiti ve tiplendirilmesindeki özgüllük ve duyarlılığını belirlemek amacıyla yapılan bu çalışmada; 232 (% 53,4)'si kadın, 202 (% 46,6)'side erkek hastalara ait olmak üzere toplam 434 hastanın dışkı örneği değerlendirildi (Tablo 8).

Bu çalışmada dışkı örneklerinden kampilobakter izolasyonu için, şarkoal içeren mCCDA besiyeri, CAT supplementli CCDA besiyeri ile % 7 koyun kanlı Skirrow selektif besiyerleri (SSA) kullanıldı. Kültür besiyerlerinde üretilmiş ve fenotipik yöntemlerle kampilobakter ön tanısı almış izolatlardan “dondurup çözme” yöntemi kullanılarak, hastalara ait dışkı örneklerinden de “QIAgen Stool Extraction” kiti (QIAamp DNA Stool Kit, Kat No:51504) yardımı ile ekstrakte edilmiş DNA örnekleri, termofilik kampilobakterlerin genomunun 23S rDNA geninin 43 ile 69. heliksler arasında yer alan ve termofilik türler için spesifik ve iyi korunmuş olan 491 bp uzunluğundaki fragmentini hedefleyen PCR-RFLP için kalıp olarak kullanıldı. Bu yöntemlerden en az birisi ile; 13 (% 59)'ü kadın, 9 (% 41) 'u da erkek hastalara ait olmak üzere 22 (% 5,1) örnekte kampilobakter pozitifliği tespit edildi (Tablo 8).

Bu çalışmada, dışkı örneklerinden kampilobakter izolasyonu için kullanılan üç farklı besiyerlerinin duyarlılıkları da kıyaslandı. SSA besiyerinde dışkı örneklerinden 13 (% 3)'ünde kampilobakter üretilirken, mCCDA ve CAT supplementli CCDA besiyerlerinde 16 (% 3,7) örnekte üreme görüldü. (Tablo 9, 10).

**Tablo 8: Dışkı örneklerinde kültür ve/veya PCR-RFLP yöntemleri ile kampilobakter varlığı tespit edilen hastaların yaş ve cinsiyet gruplarına göre dağılımı.**

| Örneklerin Dağılımı |            | Kadın     |              | Erkek    |              | Toplam    |              |
|---------------------|------------|-----------|--------------|----------|--------------|-----------|--------------|
| Yaş Grubu           | Sayı       | Sayı      | (%)          | Sayı     | (%)          | Sayı      | (%)          |
| 0-5                 | 106        | 3         | (2,8 )       | 2        | (1,9)        | 5         | (4,7)        |
| 6-14                | 102        | 3         | (2,9)        | 4        | (3,9)        | 7         | (6,9)        |
| 15-29               | 96         | 3         | (3,1)        | 2        | (2,1)        | 5         | (5,2)        |
| 30-45               | 84         | 4         | (4,8)        | 1        | (1,2)        | 5         | (6,0)        |
| 46-64               | 38         | 0         | (0,0)        | 0        | (0,0)        | 0         | (0,0)        |
| 65 ≤                | 8          | 0         | (0,0)        | 0        | (0,0)        | 0         | (0,0)        |
| <b>Toplam</b>       | <b>434</b> | <b>13</b> | <b>(3,0)</b> | <b>9</b> | <b>(2,1)</b> | <b>22</b> | <b>(5,1)</b> |

**Tablo 9: Dışkı örneklerinden kampilobakter izolasyonu için kullanılan besiyerlerinde kampilobakter türü mikroorganizmaların üretilme oranları.**

| Besiyeri            | Kadın(s: 232 ) |            | Erkek(s: 202 ) |            | Toplam(s:434) |            |
|---------------------|----------------|------------|----------------|------------|---------------|------------|
|                     | Sayı           | %          | Sayı           | %          | Sayı          | %          |
| SSA                 | 1              | 0,4        | 0              | 0          | 1             | 0,2        |
| MCCDA               | 3              | 1,3        | 1              | 0,5        | 4             | 0,9        |
| SSA + CCDA besiyeri | 8              | 3,5        | 4              | 2          | 12            | 2,8        |
| <b>Toplam</b>       | <b>12</b>      | <b>5,2</b> | <b>5</b>       | <b>2,5</b> | <b>17</b>     | <b>3,9</b> |

**Tablo 10: Kampilobakter izolatlarının seçici besiyeri kombinasyonlarında üreme oranları.**

| Besiyeri | SSA Besiyeri |        | mCCDA Besiyeri |        |
|----------|--------------|--------|----------------|--------|
|          | Sayı         | (%)    | Sayı           | (%)    |
| SSA      | 13           | (76,5) | 17             | (100)  |
| MCCDA    | 17           | (100)  | 16             | (94,1) |
| CAT      | 17           | (100)  | 16             | (94,1) |

Kültürde üreyen kampilobakter suşlarının 13 (% 76,5)' ü hippurat hidroliz testi ile pozitif sonuç verirken, 4 (% 23,5)'ünün hippurat hidroliz testi negatif olarak tesbit edildi. Hippurat hidroliz testi negatif olan kampilobakter suşlarının hepsi sefalotine dirençli, nalidiksik asite duyarlı bulundu (Tablo11).

**Tablo 11: Seçici Besiyerlerinden izole edilen kampilobakter izolatlarının fenotipik özellikleri.**

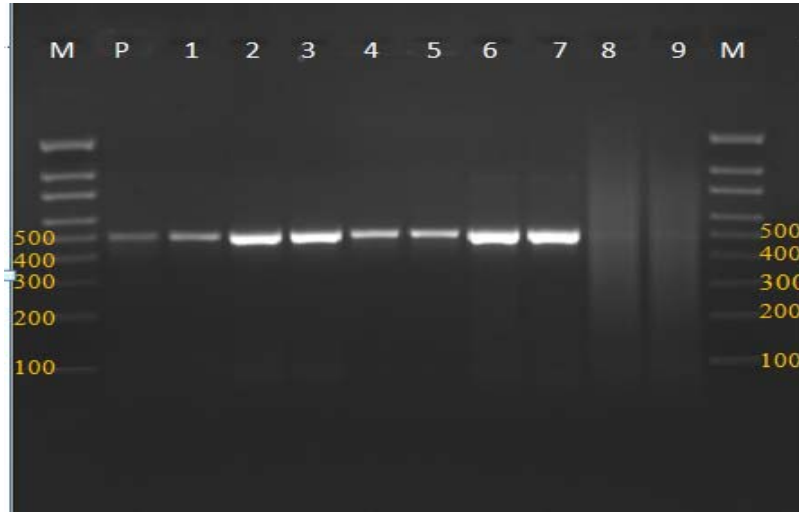
| Şuş No: | Hippurat Hidrolizi | TSI'de H <sub>2</sub> S oluşumu | Sefalotine duyarlılık | Nalidiksik asit duyarlılık | %1.5 NaCl de üreme | 37°'de üreme | 42°'de üreme |
|---------|--------------------|---------------------------------|-----------------------|----------------------------|--------------------|--------------|--------------|
| 1       | -                  | -                               | -                     | +                          | -                  | +            | +            |
| 2       | +                  | -                               | -                     | +                          | -                  | +            | +            |
| 3       | +                  | -                               | -                     | +                          | -                  | +            | +            |
| 4       | -                  | -                               | -                     | +                          | -                  | +            | +            |
| 5       | +                  | -                               | -                     | +                          | -                  | +            | +            |
| 6       | +                  | -                               | -                     | +                          | -                  | +            | +            |
| 7       | +                  | -                               | -                     | +                          | -                  | +            | +            |
| 8       | -                  | -                               | -                     | +                          | -                  | +            | +            |
| 9       | +                  | -                               | -                     | +                          | -                  | +            | +            |
| 10      | +                  | -                               | -                     | +                          | -                  | +            | +            |
| 11      | +                  | -                               | -                     | +                          | -                  | +            | +            |
| 12      | +                  | -                               | -                     | +                          | -                  | +            | +            |
| 13      | +                  | -                               | -                     | +                          | -                  | +            | +            |
| 14      | -                  | -                               | -                     | +                          | -                  | +            | +            |
| 15      | +                  | -                               | -                     | +                          | -                  | +            | +            |
| 16      | +                  | -                               | -                     | +                          | -                  | +            | +            |
| 17      | +                  | -                               | -                     | +                          | -                  | +            | +            |

Çalışmaya dahil edilen 434 hastaya ait dışkı örneğinden, “QIAGEN Stool Extraction” kiti (QIAamp DNA Stool Kit Kat No:51504) ile yapılan ekstraksiyon işlemi sonunda, örneklerden 14 (% 3,2) ünde çalışma için önerilen miktarda DNA ekstrakte

edilemedi. Bu sebeple örneklerden 420 (% 96,8.)'sine ait DNA ekstraktı PCR-RFLP ile tiplendirmede kalıp olarak kullanıldı.

Seçici besiyerlerinde üretilmiş ve fenotipik yöntemlerle kampilobakter ön tanısı almış izolatların ise tamamından “dondurup çözme” yöntemi kullanılarak elde edilen ekstraktların DNA yoğunluğunun PCR-RFLP için yeterli olduğu görüldü ve tamamı çalışmaya dahil edildi.

Termofilik kampilobakter genomundaki hedef dizilerin PCR ile amplifikasyonu sonucu, direkt dışkıdan ektrakte edilmiş DNA kalıplarından 19 (% 4,5)'u ile 17 izolattan ektrakte edilen DNA kalıplarının tamamında (% 100) 491 bp uzunluğundaki hedef DNA dizilerinin varlığı tespit edildi (Şekil 9, Tablo 12)



Şekil 9: PCR amplifikasyon ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.  
M: DNA marker, P: *C.jejuni* RSKK-02022.  
1, 2, 3, 4, 5, 6,7: PCR (+) hasta örnekleri,  
8,9: PCR (-) hasta örnekleri.

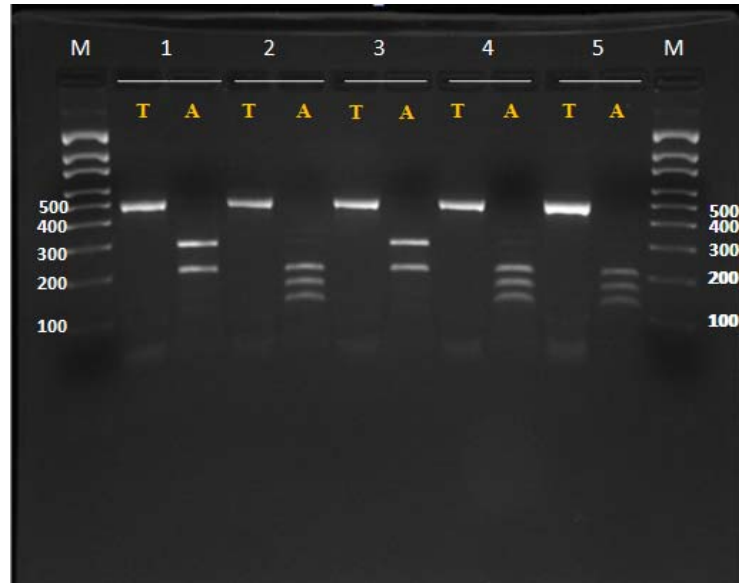
Tablo12: PCR ile termofilik kampilobakter spesifik 491bp uzunluğunda fragment tespit edilenörneklerin, ekstraktın özelliğine göre dağılımı.

| Ekstraktın Özelliği     | PCR (+) | (%)   | PCR(-) | (%)    |
|-------------------------|---------|-------|--------|--------|
| Dışkı ekstraktı (n=420) | 19      | (4,5) | 401    | (95,5) |
| İzolat ekstraktı (n=17) | 17      | (100) | 0      | ( 0,0) |

PCR ile çoğaltılarak, 491 bp uzunluğundaki hedef bölge ile uyumlu fragment büyüklüğüne sahip olan ampliconlar, tip tayini amacı ile *Alu I* ve *Tsp 509I* restriksiyon enzimi ile hazmettirildi. Hazım sonucu oluşan fragmentlerin polimorfizmi agaroz jel elektroforez işlemi ile görüntülenerek değerlendirilen örneklerden 18 (% 81,8)'inin profilinin *C.jejuni*, 4 (% 18,2)' ünün profilinin *C.coli* ile uyumlu olduğu görüldü (Tablo: 13, Şekil 7).

**Tablo13: *Alu I* ve *Tsp 509I* RE'lerinin kullanıldığı PCR-RFLP yöntemi ile değerlendirilen ekstraktlarda tespit edilen kampilobakter tiplerinin örneklere göre dağılımı.**

| Örneğin türü                             | PCR-RFLP ile tanımlanan kampilobakter tipleri |               |               |               |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
|                                          | <i>C.jejuni</i>                               |               | <i>C.coli</i> |               |
|                                          | Sayı                                          | (%)           | Sayı          | (%)           |
| <b>Yalnız dışkı ekstraktında</b>         | 4                                             | (18,2)        | 1             | (4,5)         |
| <b>Yalnız izolat ekstraktında</b>        | 2                                             | ( 9,1)        | 1             | (4,5)         |
| <b>Hem dışkı+hem izolat ekstraktında</b> | 12                                            | (54,5)        | 2             | (9,1)         |
| <b>Toplam</b>                            | <b>18</b>                                     | <b>(81,8)</b> | <b>4</b>      | <b>(18,2)</b> |
|                                          |                                               |               | <b>22</b>     | <b>(100)</b>  |



Şekil 10: *Alu I* ve *Tsp 509I* RE'nin kullanıldığı PCR-RFLP yöntemi ile elde edilen fragmentlerin agaroz jeldeki polimorfizmi. T: *Tsp509I* ile kesim profilini, A: *Alu I* ile kesim profilini göstermektedir. 1, 2, 3, 4, 5 nolu örnekler *C.coli*, *C.jejuni*, *C.coli*, *C.jejuni*, *C.jejuni* ile uyumlu fragment profili sergilemektedir.

Dışkı izolatlarının fenotipik yöntemlerle tiplendirilmesinde hippurat hidroliz testi pozitif olarak belirlenip, *C.jejuni* ön tanısı alan 13 suşdan 12'si PCR/RFLP testi ile de *C.jejuni* ile uyumlu fragment profili gösterdi. Ancak hippurat hidrolizi sonucuna göre *C.jejuni* olduğu düşünülen, 1 suş PCR-RFLP sonuçlarına göre *C.coli* ile uyumlu fragment profili, buna karşılık hippurat hidroliz testi negatif olarak belirlenen ve fenotipik olarak *C.jejuni* düşünülmeyen 4 suştan 2'si PCR-RFLP analizinde *C.jejuni* ile uyumlu fragment polimorfizmi gösterdi. (Tablo 14) Bu sonuçlara göre PCR-RFLP bazlı genotiplendirme baz olarak alındığında fenotipik yöntemlerle *C.jejuni* tiplendirmesinin sensitivitesinin % 85,7, spesifitesinin % 66,6 olduğu, *C.coli* için bu oranların sırası ile % 66,6 ve % 85,7 olduğu belirlendi.

**Tablo 14: PCR-RFLP analizinde elde edilen fragment polimorfizmine göre tiplendirilen suşların fenotipik (Hippurat hidrolizi) yöntemlere göre aldıkları ön tanı.**

| PCR/RFLP' ye göre tipler | Hippurat hidrolizi testine göre tipler<br>n=17 |      |               |       |
|--------------------------|------------------------------------------------|------|---------------|-------|
|                          | <i>C.jejuni</i>                                |      | <i>C.coli</i> |       |
|                          | Sayı                                           | %    | Sayı          | %     |
| <i>C.jejuni</i>          | 12                                             | 70,6 | 2             | 11,75 |
| <i>C.coli</i>            | 1                                              | 5,9  | 2             | 11,75 |
| <b>Toplam</b>            | 13                                             | 76,5 | 4             | 23,5  |

## 5. TARTIŞMA

Kampilobakter türü mikroorganizmalar; gelişmişlik farkı gözetmeksizin tüm dünyada, özellikle 6 ay 5 yaş arası çocuklarda, sıklıkla gıda kaynaklı ishale seyreden gastrointestinal sistem hastalıklarına yol açarlar. 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 olan kampilobakter enfeksiyonları, bazen konağın duyarlılığı, enfeksiyona sebep olan ve mikroorganizmanın türü, sayısı ile virulans faktörlerine bağlı olarak, Guillain-Barre sendromu, Hemolitik üremik sendrom ve reaktif artrit gibi ciddi komplikasyonlara da yol açabilmektedir.<sup>69,72</sup>

İshale seyreden hastalıkların genel olarak % 5-14'ünden sorumlu olan kampilobakter enfeksiyonlarının insidansı, gıda ve kişi hijyeninin düzenlendiği Avrupa ülkelerinde % 1-5 oranında seyrederken, düşük hijyen şartlarına sahip, malnütrisyonun görüldüğü az gelişmiş Afrika ülkelerinde % 20'lerin üzerine çıkmaktadır. Ülkelerin gelişmişlik düzeyleri enfeksiyonların insidansı kadar, ishalleri hastalıklardan izole edilen kampilobakter türünün tipini de etkilemektedir. Genel olarak insanlarda kampilobakterlerin sebep olduğu gastroenteritlerin yaklaşık olarak % 95'inden *C.jejuni* ve *C.coli* sorumludur. Ancak, 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.<sup>84</sup>

Fred G. ve arkadaşlarının Kolombiya'da, akut ishal yakınması olan 5 yaş altı 129 çocukta ishal etkenlerini belirlemeye yönelik olarak yaptıkları, karşılaştırmalı bir çalışmada, kampilobakterlerin % 2,3 oranı ile, Rota virus (% 48,1) ve *E. coli* (% 13,9)'den sonra ishalden en sık izole edilen 3. etken olduğu bildirilmiştir<sup>151</sup>. Olesen B. ve arkadaşları Danimarka'da benzer yaş grubundaki çocuklarda yaptıkları ve Mart 2000 Aralık 2001 arasındaki 2 yıllık periyodu kapsayan, prospektif vaka kontrol çalışmasında; 424 ishalleri hastaya ait dışkı örneği ile 726 sağlıklı asemptomatik kişiden aldıkları dışkı örneklerini incelemiştir. Bu grup hastaların % 54'ü ile kontrol grubu kişilerin % 22'sinin dışkı örneklerinden etken patojen tesbit edebildiklerini,

kampilobakter insidansında gruplar için sırası ile % 3,3 ve % 0,4 olduğunu belirtmişlerdir<sup>152</sup>. Klein E.J. ve arkadaşları ABD’ de yaptıkları yine bir prospektif kohort çalışmasında; acil servise ishal şikâyeti ile gelen 1626 çocuk hastanın dışkı örneğini etken patojenlerin tesbiti yönünden incelemişlerdir. Bu çalışma sonunda dışkı örneklerden en sık izole edilen patojenin *E.coli* (% 4,1) olduğu, bunu % 2,4 oranı ile *Salmonella* türlerinin, % 1,5 oranı ile *C.jejuni*’nin izlediği gösterilmiştir<sup>153</sup>.

İtalya’da Scarlata F ve arkadaşlarının yaptığı ve çocuklarda gastroenterite yol açan etken mikroorganizmaların tesbitine yönelik bir başka çalışmada ise 540 ishalleri çocuk hastaya ait dışkı örneği incelenmiş, örneklerden sırası ile *Salmonella* (% 18,5) ve kampilobakterler türlerinin (% 6,5) en sık izole edilen ajanlar olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada Fenotipik yöntemlerle tiplendirilen kampilobakter izolatlarının % 88,5’inin *C.jejuni* ve %11,5’ininde *C. coli* olarak tanımlanmış olduğu belirtilmiştir<sup>154</sup>. Lopez L. ve arkadaşlarının İspanya’da yaptığı, 20 ay süren bir zaman periyodunda toplanan 599 hastaya ait 729 dışkı örneğinin kampilobakterler ve diğer bakteriyel etkenler ile viral ve paraziter enteropatojenler yönünden incelendiği çalışmada ise en sık tesbit edilen bakteriyel ajanın % 38,3 izolasyon oranı ile kampilobakter türleri olduğu, bunu sırası ile % 21,5, % 1,2, % 1,2 izolasyon oranları ile *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella* ve *Aeromonas* türlerinin takip ettiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada kampilobakter izolatları fenotipik testlerle tiplendirilmiş, izolatların % 64,6’sı *C.jejuni*, % 27,5’si *C. coli* ve % 0,9’u *C.upsaliensis* olarak tanımlanmıştır<sup>155</sup>.

Cabrita L. ve arkadaşlarının Portekiz’de 2,811 dışkı örneğini muhtemel patojenler yönünden değerlendirdikleri çalışmalarında; kampilobakter türlerinin görülme sıklığının % 5,3 olduğunu, izole edilen kampilobakter tiplerinden *C. jejuni* ve *C. coli*’nin izolasyon oranlarında sırası ile, % 77,2 ve % 22,8 olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada kampilobakter türü mikroorganizmaların izole edildiği dışkı örneklerinden % 83,3’nün 0-4 yaş grubu çocuklara ait olduğu belirtilmiştir<sup>156</sup>.

Wardak S. ve arkadaşlarının Polonya’da yaptıkları çalışmada; 723 ishalleri hastaya ait dışkı örnekleri, etyolojik ajanların belirlenmesi amacı ile değerlendirilmiştir. Dışkı örneklerinin % 9,7’sinden kampilobakter türü mikroorganizmaların izole edildiği çalışmada, fenotipik özelliklerine göre tiplendirilen izolatların % 87’si *C.jejuni* olarak tanımlanmıştır<sup>157</sup>.

Haq JA. ve arkadaşlarının çocukluk çağı ishal etkenleri arasında *C.jejuni* ve diğer kampilobakter türlerinin önemini belirlemek amacı ile Bangladeş'te yaptığı çalışmada; 102 ishalleri çocuk ve 93 sağlıklı çocuktan alınan dışkı örnekleri incelenmiş, kampilobakter insidansı gruplar için sırası ile % 25,5 ve % 8,6 olarak belirlenmiştir.<sup>158</sup> Pakistan'da M. Ali ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada yaşları 0-12 arasında olan 100 ishalleri çocuğun dışkısında, %18 oranında kampilobakter pozitifliği tesbit edilmiş, kampilobakter tesbit edilen hastaların tamamının 2 yaşından küçük olduğu ve hastalığın 18. ayda pik yaptığı belirlenmiştir<sup>159</sup>. Koulla-Shiro S. ve arkadaşlarının Kamerun'da yaptıkları bir çalışmada ise ishalleri olan 272 çocuk hastadan ve sağlıklı 157 çocuktan alınan dışkı örnekleri, kampilobakterlerin varlığı yönünden incelenmiş, hastalardan alınan örneklerin % 7,7'sinde, sağlıklı çocuk gurubundan alınan örneklerinse % 3,2'sinde kampilobakter türlerinin görüldüğü bildirilmiştir<sup>160</sup>. Filistin'de Elamreen.A ve arkadaşları tarafından 5 yaşın altındaki çocuklarda ishal etkenlerinin dağılımını belirlemeye yönelik bir çalışmada ise gastroenteritli 150 çocuğa ait dışkı örneği incelenmiştir. Örneklerin % 17,3'sinde ishal etkeni olarak bir bakteriyel ajanın tesbit edildiği çalışmada, Shigella türlerinin % 6,0 oranı ile en sık izole edilen patojen olduğu bunu % 4,7 izolasyon oranı ile kampilobakter türlerinin izlediği bildirilmiştir<sup>161</sup>.

Türkiye'de farklı bölgelerde ve farklı yaş gruplarındaki ishalleri hastalarla yapılmış değişik çalışmalarda, kampilobakter cinsi bakterilerin dışkı örneklerinden izolasyon sıklığının % 1-13 arasında olduğu bildirilmiştir<sup>11</sup>.

Bölgemizdeki akut ishalleri hastaların dışkı örneklerinde, muhtemel bakteriyel etyolojik ajanları tespit amacı ile, Köksal F. ve arkadaşları tarafından, yapılan bir çalışmada, örneklerin % 7,8 sinde kampilobakter türlerinin izole edildiği bildirilmiştir.<sup>120</sup> Yine Adana bölgesinde, çocukluk çağı ishallerinde *C.jejuni* insidansını belirlemek amacı ile Kılıç B. ve arkadaşları tarafından yapılan ve 238 ishalleri çocuk ile 105 sağlıklı çocuktan alınan dışkı örneklerinin değerlendirildiği bir başka çalışmada ise; ishalleri çocukların % 2,94'u ile sağlıklı çocukların % 2,86'sının dışkı örneklerinden *C.jejuni* izole edildiği bildirilmiştir. Araştırmacılar kampilobakter yönünden pozitif bulunan ishalleri hastaların % 71,43 'ünün 5 yaşın altında olduğunu belirtmiş, asemptomatik gruplardaki izolasyon oranının semptomatik hastalar kadar yüksek oluşunu da tarıma dayalı ekonomiye sahip olan bölgedeki insanların toprağa yakınlığı sebebi ile bölgedeki asemptomatik taşıyıcılık oranının yüksekliğine bağlamışlardır.<sup>121</sup>

Öngen B. ve arkadaşları İstanbul'da yaptıkları 5 yıllık zaman periyodunu kapsayan bir çalışmada, 6835 ishalleri hastaya ait dışkı örneğini, kampilobakter türlerinin varlığı yönünden değerlendirmişlerdir. Kampilobakter izolasyonu amacı ile Butzler selektif besiyerini kullandıkları çalışmada, örneklerin % 1.2'sinde kampilobakter pozitifliği tesbit etmişler, fenotipik özelliklerine göre tiplendirdikleri izolatların, % 84'ünün: *C.jejuni*, % 5'inin; *C.upsaliensis*, % 2'sinin; *C.coli* ve % 2'sinin de *C.lari* olduğunu bildirmişlerdir. Bu grup izolatların % 6'sının, identifikasyon amacı ile kullanılan fenotipik testlerle tiplendirilemediğini belirterek, fenotipleme yöntemlerinin yetersizliğini vurgulamışlardır<sup>162</sup>.

Taş. E, ve arkadaşlarının Ankara'da yaptığı çalışmada ise; değişik yaş gruplarındaki akut gastroenteritli 200 hasta ile kontrol grubu olarak değerlendirdikleri, sağlıklı asemptomatik 40 kişiye ait dışkı örneklerini, ishal etyolojisini tespit amacı ile rutin dışkı kültürünün yanı sıra, E. coli O157:H7, rotavirus ve kampilobakter türlerinin varlığı yönündende değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada, kampilobakter türlerinin dışkı örneklerinin % 4'den izole edildiği, kontrol grubundan alınan dışkı örneklerinde ise hiçbir etken patojenin üremediği bildirilmiştir<sup>163</sup>.

Yılmaz A. ve arkadaşları Edirne ve yöresinde ishal etkenlerini belirlemek amacı ile yaptıkları çalışmada, gastroenteriti olan 82 hastaya ait dışkı örneğini, rutin bakteriyolojik besiyerlerinin yanı sıra, kampilobakter izolasyonu amacı ile mCCDA besiyerine de ekmişlerdir. Bu grup; dışkı örneklerinin % 4'ünden kampilobakter türlerini izole ettiklerini, bu izolatların, % 81'inin *C.jejuni*, % 19'unun *C.coli* olarak tanımladığını bildirmişlerdir. Araştırmada kampilobakter izolasyon oranları bakımından yaş grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadığı belirtilmiştir<sup>164</sup>.

İshalleri hastalardan kampilobakter türlerinin izolasyon oranlarının belirlenmesine yönelik olarak yapılan farklı çalışmalarda; Özkan F. ve Günhan C. İzmir'de % 2, Aşçı Z. ve ark. Elazığ'da % 13, Akgün Y. ve ark. Eskişehir'de % 1, Gültekin A. ve ark. Sivas yöresinde %5, Yıldırım MS. ve Fazlı ŞA Kayseri'de % 3, Zarakolu P. ve ark. Ankara'da % 6, Yağcı S. Ankara'da % 6, Altındiş M. ve ark. Afyon'da % 7, Kanan B. ve Akşit F. Eskişehir'de % 0,6, Aydemir Ş. ve ark. İzmir'de % 0,8, Erdoğan H. ve ark. İstanbul'da % 1,17 oranında kampilobakter belirlediklerini bildirmişlerdir<sup>11</sup>.

Biz seçici kültür besiyerleri ve PCR-RFLP yöntemlerini kombine ederek yaptığımız çalışmamızda, değerlendirdiğimiz ishalleri hastalara ait dışkı örneklerinde

kampilobakterlerin izolasyon oranını % 5,1 olarak tespit ettik. Fenotipik ve genotipik tiplendirme yöntemleri ile yaptığımız tip tayinine görede izolatların % 81,8'inin *C. jejuni*, % 18,2'sinin de *C.coli* olduğunu tespit ettik.(Tablo13) Her ne kadar bizim bulgularımız, bizimle aynı bölgedeki hasta grubu ile çalışan Köksal F ve arkadaşlarının % 7,8'lik bulgularından daha düşük, Kılıç ve arkadaşlarının % 2,9'luk bulgularından biraz daha yüksekte, iki çalışmada elde edilen oransal değerin yaklaşık olarak ortasındadır. Çalışmada kullanılan izolasyon ve identifikasyon yöntemlerinin yanı sıra, örnekleri değerlendirilen hastaların yaş gruplarına dağılımı, sosyo kültürel farklılıklar, kümes hayvanlarındaki salgınlar ve mevsimsel farklılıklar insidans oranlarını etkilemektedir. Nitekim ülkemizde farklı merkezler ve yıllarda yapılan çalışmalarda bildirilen insidans oranları da % 0,6-13 arasında değişmektedir. Bizim sonuçlarımız Altındış M. ve arkadaşlarının Afyondan bildirdikleri % 7'lik, Zarakolu P. ve Yağcı S.nin farklı 2 çalışmada Ankara'dan elde ettikleri % 6'lık, Gültekin A.ve arkadaşlarının Sivas'tan bildirdikleri % 5'lik Yılmaz A. ve arkadaşlarının Edirne'den, Taş E. ve arkadaşlarının Ankara'dan bildirdikleri %4 'lük insidans oranları ile büyük ölçüde benzerlik göstermektedir. Biz 3 farklı besiyeri kullanarak, bir taraftan izolasyon amacı ile kullanılması önerilen besiyerleri arasındaki duyarlılık farkını, diğer taraftanda 3 besiyeri ile en yüksek duyarlılıkla gerçek insidansın tespitini amaçladık. Bu sebeple sonuçlarımızın çalışmanın yapıldığı dönemdeki gerçek kampilobakter insidans oranını yansıttığına inanıyoruz. Dünya genelinde ishalleri hastalıklarda kampilobakterlerin görülme sıklığının tespitini amaçlayan çalışmaların sonuçları ile kıyaslandığında, ülkelerin ve ülkemizin gelişmişlik durumu da dikkate alındığında, sonuçlarımızın beklendiği şekilde çok yüksek olmayıp, gelişmiş ülkelerin sonuçları ile benzerlik gösterdiği görülmektedir. Nitekim gıda ve kişi hijyeninin uzun sıkı denetlendiği A.B.D'den Klein E. ve arkadaşları % 1,5 gibi bizim oranımızdan daha düşük bir insidans oranı bildirmişlerdir. Buna karşılık gelişmişlik düzeyi olarak benzerlik gösterdiğimiz, Polonya'dan Wardak S. ve arkadaşlarının bildirdikleri % 9,7'lik, İtalya'dan Scarlata F.ve arkadaşlarının bildirdikleri % 6,5'lik, Portekiz'den Carbita L. ve arkadaşlarının bildirdikleri % 5,3'lük ve Danimarka'dan Olesen B. ve arkadaşlarının bildirdikleri % 3,3'lük izolasyon oranları bizim izolasyon oranlarımızla büyük ölçüde benzerdir. İspanya'dan Lopez L. ve arkadaşlarının % 38,3'lük izolasyon oranları ile Filistin'den Elamreen A. % 4,7'lik ve Kamerun'dan Koulla-S.S ve arkadaşlarının

bildirdikleri % 7,7'lik izolasyon oranları, ülkelerin gelişmişlik oranları ile kıyaslandığında beklenenden çok farklı oranlardır. Ancak bu sonuçlarında yapılan çalışmalar sonunda elde edilmiş gerçek veriler olduğu dikkate alındığında kampilobakterlerin ishale ilişkilerinin belirlenmesinde bir başka ifade ile ishalleri hasta dışkılarından kampilobakterlerin izolasyon ve identifikasyonlarında kullanılan metodolojinin, çalışmanın yapıldığı merkezin ve merkezde çalışanların bu konudaki uygulama birikimlerinin, elde edilen sonuçları ciddi anlamda etkilediği düşünülebilir. Nitekim biz çalışmamızda izolasyon amaçlı kullandığımız Skirrow selektif suplementli (SS) besiyerinde, örneklerden 13 (% 3)'ünde kampilobakter ürettiğinden, mCCDA besiyerinde 12'si SSA'da üreme gözlenen 16 (% 3,7) örnekte kampilobakter izole ettik. Buna karşılık aynı dışkı örneklerinden elde edilen DNA ekstraktlarında kampilobakter spesifik DNA dizileri tespit edilen dışkı örnekleride kampilobakter pozitif olarak değerlendirildiğinde, elde edilen insidans oranı % 5,1 idi (Tablo8). Bizim sonuçlarımızın kendi içerisinde tutarsızlıklarıda, henüz izolasyon bazlı standardize edilmiş ideal bir tanı yönteminin bulunmamasından kaynaklanmaktadır. Nitekim, kampilobakter ishallerinde klinik materyalden mikroorganizmanın, seçici kültür yöntemleri ile izolasyon ve identifikasyonu tanıda altın standart olarak gösterilse de, pratik uygulamalarda örneklerin alınması, laboratuvara taşınma şekli ve süresi, laboratuvarında değerlendirme için geçen süre ve izolasyon amaçlı kullanılan besiyerlerinin özellikleri ile identifikasyonda kullanılan yöntemler, izolasyon bazlı yöntemlerin sensitivite ve spesifitesini etkilemektedir. Bu sebeple tanının tek başına kültür sonuçlarına dayalı olarak yapıldığı merkezlerde, kullanılan besiyeri ve identifikasyon yöntemlerinin özelliğine bağlı olarak değişen sonuçlar elde edilebilmektedir.

Kampilobakterlerin dışkıdan izolasyonunda kullanılan besiyerleri, dışkı florasında bulunan ve kampilobakterlerden daha hızla üreyerek kültür ortamına hakim olan bakteri ve mantarların üremelerini baskılamak amacı ile farklı tür ve konsantrasyonlarda antibiyotik, antimikotik ve şarkoal gibi antimikrobiklerin ilavesi ile seçici hale getirilmektedir. Besiyerlerinin ilave edilen antibiyotiklerin türü ve konsantrasyonları bu besiyerlerinin duyarlılığını belirleyen en önemli etmen olarak gösterilmiştir. Mesela besiyerlerine *C.jejuni* için uygun olan konsantrasyonda ilave edilen Sefaperazon, Vankomisin, Kolitsin, Rifampin ve Trimethoprim gibi antibiyotikler, *C.coli* ve

*C.upsaliensis* 'in gibi kampilobakter türlerinin üremesini baskılayabilmektedir. Aspinall ST.ve arkadaşları, *C.jejuni* için optimize edilmiş mCCDA besiyerindeki 32 mg/L sefaperazon'un, özellikle bağışıklık yetmezliği olan hastalarda oportunistik olarak ishal ve bakteriyemiye neden olan *C.upsaliensis* 'in üremesini engellediğini göstermişler ve sefaperazon içermeyen suplementlerle desteklenmiş seçici besiyerlerinde bütün kampilobakter türlerinin izolasyon oranının arttığını ileri sürülmüşlerdir. Bu grup immunsuprese ishallerli hastalarda dışkının membran filtrasyon yöntemi ile dekontaminasyonunun *C.upsaliensis* 'in izolasyon şansını artıracağını, ancak dışkıdaki *C.upsaliensis* yoğunluğunun  $10^5$  cfu/g'dan daha düşük olması halinde izolasyon şansının oldukça düşük olduğunu belirtmişlerdir<sup>165</sup>.

Bizim, *C.upsaliensis* türü kampilobakter izole edemememiz, özellikle mCCDA besiyerine ilave edilen 32mg/L sefaperazon ve bu türün endikasyon alanına giren hastamızın bulunmaması ile izah edilebilir. Diğer taraftan mCCDA besiyerinde SSA besiyerine göre daha yüksek oranda kampilobakter izolasyon sonuçlarımız, mCCDA besiyerinin SSA agara göre daha seçici ve duyalı olması ile izah edilebilir. Nitekim mCCDA besiyerinin içeriğinde yer alan şarkoalın besiyerlerinin seçiciliğini ve duyarlılığını artırdığı birçok araştırmacı tarafından vurgulanmıştır. Karmali M.A. ve arkadaşları charcoal-based selective medium (CSM) ile kan içeren Skirrow Selektif agar (SSA) besiyerinin duyarlılıklarını karşılaştırdıkları çalışmalarında; 1,227 ishallerli hastaya ait dışkı örneğini bu iki seçici besiyerine ekerek değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak en az bir besiyerlerinde üremek şartı ile 35 (% 2,9) örnekte kampilobakter pozitifliği tesbit ettiklerini, isolatların % 83'nün her iki besiyerinde de ürerken, % 14'ünün sadece CSM besiyerinde, % 3'ünde yalnız SSA besiyerinde ürediğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada CSM besiyerlerinin % 57'sinde SSA besiyerlerinin ise % 35'inde kontaminant bakterilerin tam olarak süprese olduğu belirlenmiştir. CSM besiyerinin dışkıdaki pseudomonas türleri, gram-pozitif mikroorganizmalar ve mantar türlerini SSA'dan daha iyi baskıladığını göstermişlerdir<sup>82</sup>. Endtz H. P ve arkadaşları da kan içermeyen; şarkoal bazlı besiyerlerinden CSM besiyeri, mCCDA besiyeri ve semisolid blood-free selective motility mediuma (SSM) besiyeri ile kan içeren besiyerlerinden, SSA ve CampyBAP besiyerinin kampilobakter türlerinin izolasyonundaki duyarlılığını araştırdıkları çalışmalarında seçici besiyerlerinin yanı sıra 0.65 µm por çaplı selüloz asetat membran ile membran filtrasyon yönteminde

karşılaştırmışlardır. Bu grup; 1,980 ishali hastaya ait dışkı örneğinden 161(% 8 )'inde en az bir besiyerinde olmak şartı ile kampilobakter türü mikroorganizmaları izole etmişlerdir. Araştırmada; CSM, CCDA, SSA, SSM ve membran filtrasyon işlemi sonrası ekim yapılan kanlı besiyerlerinde kampilobakter izolasyon oranlarının sırası ile % 87, % 83, % 80, % 72 ve % 61 olduğu, CSM ve SSM besiyerlerinin kombine kullanımı ile izolasyon oranının % 96'ya ulaştığı bildirilerek dışkı örneklerinin, biri şarkoal bazlı CSM besiyeri olmak üzere iki besiyerine ekildiği takdirde dışkı örneklerinden kampilobakter izolasyon şansının artacağı belirtilmiştir. Bu grup fenotipik testlerle tiplendirdikleri kampilobakter izolatlarının % 91,9'unun *C.jejuni*, % 7,5'inin *C.coli* ve % 0,6'sında *C.upsaliensis* olduğunu bildirmişlerdir<sup>166</sup>. Merino FJ. ve arkadaşlarıda 263 ishali hastaya ait dışkı örneğinden kampilobakter izolasyonu amacı ile, Butzler selektif medium (BU), Blaser medium (BL), Skirrow Selektif besiyeri (SSA), Preston Campylobacter selective medium (PC), Butzler Virion medium (BV), Modified Preston medium (MP), Preston campylobacter blood-free medium (PBF) besiyerlerini kullandıkları çalışmalarında, besiyerlerinden en az birinde üremek şartı ile 46 (% 17) örnekte kampilobakter pozitifliği tesbit etmişlerdir. Araştırmada kullanılan BU, BL, SSA, PC, BV, MP ve PBF besiyerlerinde kampilobakter izolasyon oranlarının sırası ile % 96 , % 93 , % 93 , % 91, % 98 , % 98 ve % 100 olduğunu, dışkı florasının, en yüksek izolasyon oranını veren kan içermeyen Preston besiyerinde (PBF), diğer besiyerlerine göre daha iyi baskıladığını bildirilmişlerdir<sup>83</sup>.

Piersimoni C. ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada; 415 ishali hastaya ait dışkı örneği, kampilobakter yönünden değerlendirilmek üzere, kan içermeyen CCDA ve kan içeren SSA besiyerlerine ekilmiştir. Bu çalışmada filtrasyon yönteminin kampilobakter izolasyonundaki duyarlılığını tespit amacı ile, aynı dışkı örnekleri 0.65 µm por çaplı membran filtrelerden süzöldükten sonra antibiyotik katkısız Columbia kanlı agar besiyerine ekilmiştir. Sonuç olarak örneklerden 48 (% 11,5)'inde en az bir besiyerinde kampilobakter türü mikroorganizmaların ürediği, izolatların % 62'sinin SSA besiyerinde, % 82'sinin mCCDA agarda % 95'nin membran filtrasyon yöntemi ile elde edildiği, mCCDA agar ve membran filtrasyon yönteminin birlikte kullanımı ile izolasyon oranının % 100'e ulaştığı, fenotipik yöntemler kullanılarak yapılan tiplendirme ile izolatların, % 91,7'sinin *C.jejuni* ve % 6,3'ünün de *C.coli* olduğu bildirilmiştir<sup>77</sup>.

Aspinall ST ve arkadaşları, *C.upsaliensis* ve diğer termofilik kampilobakter türlerinin izolasyonunda CAT ve mCCDA besiyerlerinin duyarlılığını tespit amacı ile yaptıkları çalışmada 7000 ishalleri hastadan alınan dışkı örneğini değerlendirmişlerdir. Bu çalışma sonunda, dışkı örneklerinden 229 (% 3,3)'unda kampilobakter türü mikroorganizmalar üretilmiş, besiyerlerinin duyarlılıkları arasında fark olmadığı, ancak CAT besiyerinin *C.upsaliensis* izolasyonu yönünden daha duyarlı olduğu belirtilmiştir. Fenotipik yöntemlerle tiplendirilen izolatlardan % 91,3'ünün *C.jejuni*, % 5,7'sinin *C.coli* ve % 2,2'sinin de *C.upsaliensi* olduğu tespit edilmiştir<sup>80</sup>.

Enberg.J ve arkadaşları da yaptıkları çalışmalarında, kampilobakter izolasyonunda yaygın olarak kullanılan üç farklı seçici besiyeri ile membran filtrasyon yönteminin duyarlılıklarını karşılaştırma ve ishalleri hastalardaki kampilobakter insidansını belirlemeyi amaçlamışlardır. İshal yakınması olan 1,376 hastaya ait dışkı örneğini; mCCDA besiyeri, CAT besiyeri ve kan içermeyen SSA besiyerlerine doğrudan inoküle ettikten sonra, membran filtrasyon yöntemi ile elde ettikleri dışkı süzöntülerinide kanlı besiyerine inoküle ederek değerlendiren grup, ekim yapılan örneklerin toplam olarak 144 (% 10,5)'ünde kampilobakter ürediğini bildirmişlerdir. En yüksek kampilobakter izolasyon oranının mCCDA besiyerinde elde edildiği, bunu sırası ile CAT agar besiyeri, membran filtratlarının ekildiği kanlı besiyeri ve SSA besiyerinin izlediği, izolasyon oranlarının da sırası ile; % 95, % 85, % 83 ve % 82 olduğu belirtilmiştir. Ayrıca mCCDA agarın, *C.jejuni*'nin izolasyonunda, SSA'ya göre anlamlı ölçüde daha yüksek duyarlılığa sahip olduğu, ( $P = 0.0034$ ), ancak izolasyon başarısı yönünden CAT agar ile SSA besiyerleri arasında anlamlı bir farklılığın bulunmadığı da ileri sürülmüştür<sup>167</sup>.

*C.upsaliensis*'in ishalleri hastalardaki görülme sıklığı, köpeklerin bulaşındaki rolü ve bu mikroorganizma izolasyonunda kullanılan CAT ve CCDA besiyerinin duyarlılıklarını tespit amacı ile, Byrne C. ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada, 2,064 ishalleri hastaya ait dışkı örneği ile 22 köpekten alınan dışkı örnekleri değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, insan dışkı örneklerinden 1'isi ile 5 köpeğe ait dışkı örneğinden *C.upsaliensis* izole edilmiştir. Bu izolatlarının tamamının CAT selektif besiyerinde üremesine karşılık, CCDA besiyerinde üreme olmadığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada CCDA besiyerinin duyarlılığını tespit amacı ile *C.upsaliensis* ile kontamine edilmiş dışkı örnekleri seri olarak sulandırıldıktan sonra bu besiyerine ekilmiştir. Sonuç

olarak, dışkı örneklerinde  $10^3$  cfu/ml ve daha az sayıda *C.upsaliensis* bulunması halinde, CCDA besiyerinde üremenin olmadığı gösterilmiştir.<sup>168</sup>.

Lopez L ve arkadaşları, CCDA agara ekim ile 0.45 µm por çaplı selüloz asetat membranlardan filtre edilmiş dışkı örneklerinin % 5 kanlı Mueller-Hinton agara ekilmesi arasındaki duyarlılık sonuçlarını karşılaştırdıkları çalışmalarında; 729 dışkı örneğini değerlendirmişlerdir. Dışkı örneklerinin % 38,3'ünden, bu yöntemlerden en az birisi ile kampilobakter türü mikroorganizmaların üretildiği çalışmada, mCCDA'n duyarlılığının % 91,6, membran filtrasyon yönteminin duyarlılığının ise % 79,6 olduğu ve aradaki farkın istatistiki yönden anlamlı olduğu bildirilmiştir. Fenotipik testlerle kampilobakter izolatlarının % 64,6'sının *C.jejuni*, % 27,5'inin de *C. coli* olduğu gösterilen çalışmada, izolatların % 6,8'inin tiplendirilemediği belirtilmiştir. Örneklerden % 0,9 oranında izole edilen *C.upsaliensis*'in yalnız membranfiltrasyon yöntemi ile hazırlanarak ekim yapılan besiyerinde üretilebildiği bildirilmiştir<sup>155</sup>.

Biz çalışmamızda dışkı örneklerinden kampilobakter türü mikroorganizmaları üretebilmek için; SSA, mCCDA ve CAT besiyerlerini kullandık. Literatürde de belirtildiği gibi dışkı örneklerinden kampilobakter izolasyonunda kullanılan seçici besiyeri ve membran filtrasyon tekniklerinden hiç birisi tek başına kullanıldığında istenen duyarlılığı vermemekte ve ancak en az iki yöntem veya besiyerinin kombine edilmesi halinde dışkıdan izolasyon şansı artmaktadır. Biz bu çalışmada, dışkı örneklerinden kampilobakter izolasyonu için duyarlılığı en yüksek besiyeri ve/veya besiyeri kombinasyonunun tespitini de amaçladık. Sonuç olarak seçici besiyerlerine ekim yaptığımız ishalleri hasta dışkılarından, en az bir besiyerinde üremek şartı ile, 17(% 3,9)'sinde kampilobakter türü mikroorganizmaları ürettik. Bu izolatlardan, tamamı aynı hastalara ait dışkı örneklerinden olmak üzere, 16 (% 94,1)'sı, hem mCCDA hemde CAT besiyerlerinde üretildi. SSA besiyerinde ise, 12'si mCCDA ve CAT besiyerinde üreyen hasta örneklerinden olmak üzere, toplam 13 (% 76,5) dışkı örneğinde izolasyon gerçekleştirildi. Yani 12 izolat her üç besiyerinde de üretilirken, mCCDA/CAT besiyerinde üretilen 4 izolat SSA besiyerinde, SSA besiyerinde üretilen 1 izolatta mCCDA ve CAT besiyerinde üretilmedi. (Tablo 9)

Bizimle benzer besiyerlerini kullanan Enberg J ve arkadaşları dışkı örneklerinden kampilobakter izolasyonu için kullandıkları mCCDA besiyerinin duyarlılığını % 95, SSA besiyerinin duyarlılığını ise % 82 olarak vermişlerdir. Piersimoni C. ve

arkadaşlarıda aynı besiyerlerinin duyarlılıklarının sırası ile % 82 ve % 62 olduğunu, Karmali ve arkadaşlarıda yine sırası ile olmak üzere bu oranların % 83 ve % 80 olarak bulduklarını bildirmişlerdir. Diğer taraftan Lopez L ve arkadaşlarıda 5 farklı seçici kültür tekniğinin duyarlılıklarını değerlendirmek için planladıkları çalışmalarında, mCCDA agar besiyerinin dışkı örneklerindeki kampilobakter türü mikroorganizmaları tespit duyarlılığının % 91,6 ile en yüksek orana ulaştığını belirtmişlerdir. Bu sonuçlar bizim çalışmamızda elde ettiğimiz mCCDA / CAT agar ve SSA besiyerlerine ait % 94.1 % 76,5 lik bulgularımızla tamamen benzerlik göstermektedir. Diğer taraftan Aspinall ST ve arkadaşları, *C.upsaliensis* dışındaki kampilobakter türlerinin izolasyonunda, CAT ve mCCDA besiyerlerinin duyarlılıklarının, bizim çalışmamızda tespit ettiğimiz gibi, aynı olduğunu göstermişlerdir. Bütün bu değerlendirmelerin ışığında; dışkıdan en yüksek duyarlılıkta kampilobakter izolasyonu için mCCDA veya CAT besiyerinin SSA ile birlikte kullanılmasının en uygun kombinasyon olacağını söylemek mümkündür.

Kampilobakter türü mikroorganizmaların, dışkı örneklerindeki varlıkları ile tür ve tip düzeyinde tanımlanmalarının yapılmasında kültür bazlı konvasiyonel yöntemler güncelliğini korumakla birlikte son yıllarda PCR ve prop hibridizasyon gibi nükleik asit amplifikasyon bazlı yöntemler de yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Dışkı örneklerinden bakterinin izolasyonuna gerek duymaksızın tür ve tip düzeyinde tanıyı mümkün kılan bu yöntemlerle, bakteri sayısının kültürde izolasyon için gerekli olan sınırın altında olması halinde bile yüksek duyarlılıkta pozitif sonuçlar elde edilebilmektedir. Moleküler yöntemlerin, klinik örneklerdeki kampilobakter türlerinin tanısındaki duyarlılıklarını belirlemeye yönelik çok sayıdaki araştırmada bakteri genomundaki; *16SrDNA* geni, *hipO*, *glyA*, *asp*, *cadF*, *lpx*, *ceuE* .*map A* geni gibi tür, grup veya tip spesifik gen dizilerini hedef alan primerler kullanılmıştır. Bu araştırmalarda PCR bazlı yöntemlerin başarısını etkileyen en önemli iki unsurun dışkıdaki inhibitörler ve hedef bölgenin doğru seçimi olduğu bildirilmiştir.<sup>96</sup>

Karşılaştırmalı genomik çalışmalar, klinik ve çevresel örneklerden izole edilen *C.jejuni* *C.coli* ve *C.lari* ' suşlarının genomunun yüksek düzeyde homoloji gösterdiğini ve üç tür arasındaki homolojinin PCR bazlı testlerin performansını etkileyeceğini ortaya koymuştur. Mesela *C.jejuni* *C.coli* ve *C.lari* 'nin 16S rDNA gen dizisinin çok yüksek oranda benzerlik gösterdiği ve bu nedenle bu gen bölgesini hedef alan PCR yöntemlerinin, üç türün ayırımı için elverişsiz olduğu belirtilmiştir<sup>97</sup>. Aynı benzerlik

23S rDNA geninde gösterilmiştir. Bu tür yüksek homoloji gösteren gen dizilerinin hedef alındığı tiplendirme çalışmalarında, tip tayini için, şayet çoğaltılan bölge polimorfik ise, uygun restriksiyon enzimlerinin kullanıldığı PCR\_RFLP yöntemi ile tanıya gitmek mümkündür. Engvall E.O. ve arkadaşları, kampilobakterlerin 23S rDNA geni üzerinde 43 ile 69. Heliksler arasında kalan ve termofilik kampilobakterler için tür spesifik olan 491 bp'lik polimorfik bir bölgenin amplifikasyon ürünlerinin, *AluI* ve *Tsp509I* restriksiyon endonükleazlar ile kesilmesi sonucu oluşan DNA fragmentlerinin polimorfizminin, termofilik kampilobakterler için tanı koydurucu olduğunu göstermişlerdir. Araştırmada; daha önce çevresel örneklerden izole edilmiş ve tür tanımlaması yapılmış, 77 *C.jejuni*, 17 *C.coli*, 10 *C.lari* ve 14 *C.upsaliensis* suşu ile termofilik olmayan 7 kampilobakter suşu ile içlerinde *H.pylori*, *Salmonella* türleri ve *E.coli*'nin yer aldığı 30 farklı suş, 23S rDNA PCR-RFLP yöntemi ile tiplendirilmiştir. Termofilik kampilobakter türleri dışındaki test suşlarının hiç birisinde hedef bölge amplifikasyonu gerçekleşmemiştir. Hedef bölgeleri amplifiye olan suşların amplikonlarının restriksiyon enzim analizinde ise; çalışma öncesi fenotipik yöntemlerle *C.jejuni* olarak tanımlanan bir suş *C.coli* ve *C.coli* olarak tanımlanan bir suşta *C.jejuni* olarak tanımlanmış, bu 2 suş dışındaki diğer bütün termofilik suşlar fenotipik yöntemlerle uyumlu fragment polimorfizmi vermiştir<sup>90</sup>.

Karenlampi R. I. ve arkadaşları, kampilobakter türlerinin 60 kD luk' şaperon proteinini kodlayan *groEL* geninde termofilik türler arası spesifik konservatif dizilerin yanı sıra, tür spesifik polimorfik dizilerinde olduğunu ve *groEL* dizi analizi ile oluşturulan filogenetik ağacın 16S rDNA ile oluşturulan filogenetik ağaca oldukça benzediğini bildirilmişlerdir. Aynı araştırmada hippurat hidroliz testi negatif olan *C.jejuni* 6871 suşu ile hippurat hidroliz testi pozitif olan *C.jejuni* 4117 suşunun *groEL* genlerinin dizi benzerliğinin % 100 olduğu gösterilerek, *groEL* genindeki kampilobakter tür spesifik dizilerin % 95-100 gibi yüksek oranlarda konservatif olduğu, buna karşılık termofilik türler arası spesifik konservatif dizilerin, 16S rDNA genindeki türler arası spesifik konservatif dizilerden daha değişken (% 65-94 ve % 90-99) olduğu ileri sürülmüştür. Araştırmacılar *groEL* geninde tür spesifik polimorfik dizilerin 517 bp uzunluğunda bir fragmanda yer aldığını, bu fragmentin PCR ile amplifikasyondan sonra *AluI* ve *ApoI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi sonucu oluşan polimorfik

fragment profillerinin termofilik kampilobakter türleri için spesifik bir tanı kriteri olduğunu bildirmişlerdir<sup>91</sup>.

Birden çok hedef bölgenin tek tüp multipleks-PCR analizi, termofilik türlerin tanısı ve tiplendirilmesinde çok sayıdaki araştırmacı tarafından denenmiş, ancak hedef dizilerin G+C oranlarındaki farklılıkların büyük oluşu, uygun bağlanma ve uzama ısılarının sağlanamaması ve güvenilir sonuçların alınamaması sebebi ile kullanım alanı sınırlı kalmıştır. Stephen L ve arkadaşlarıda, yaptıkları bir çalışmada *C. jejuni* ve *C.coli*'nin identifikasyonunda daha önce tanımlanmış 11 PCR temelli yöntemin sensivite ve spesifitesi karşılaştırılmıştır. *C.jejuni* için 6 ve *C.coli* için 4 PCR testi ile her iki türü tesbit edebilen tek tüp multipleks PCR testinin karşılaştırıldığı bu çalışmada, fizyokimyasal değişikliklerin ve suşlar arasındaki varyasyonların test performansı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Araştırmada; *C.jejuni* türü için spesifik olduğu iddia edilen 6 PCR testinin sensivitesinin % 88-100, spesivitesinin %84-100 arasında değiştiği, *C.coli* için tanımlanmış testlerin ise tamamının %100 sensivite ve spesiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar PCR testlerinin performansının bilinen olumsuzlukların dışında, hedef bölgenin seçilmesinde *C.jejuni* genomundaki beklenen doğal değişikliklerin veya *C.jejuni*'nin *hip O* geninde olduğu gibi mutasyonlardan kaynaklanan değişikliklerin gözardı edilmesi olduğunu bildirilmişler, hem *C.jejuni* hemde *C.coli* nin doğru olarak identifikasyonunda tek bir PCR temelli yöntem yerine en az iki yöntemin kullanımını önermişlerdir<sup>96</sup>.

Debruyne L. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise *C.jejuni* ve *C.coli*'nin identifikasyonunda kullanılan 6 farklı PCR yönteminin performansı karşılaştırılmıştır. Araştırmada dizi analizi yapılmış 100 referans suş, *C.jejuni* için *hipO* genini, *C.coli* için *asp* genini hedef alan iki farklı tür spesifik PCR testi ve her iki türü birden tesbit eden multipleks PCR yöntemi ile değerlendirilmiştir. Araştırmada; multipleks PCR testi hariç diğer PCR testlerin sensivitesinin, *C.coli* için % 100, *C.jejuni* için, % 82,5-100 olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar *C.coli* tanısında uygulanan PCR testlerinin sensivitesinin yüksek oluşunu, bu kampilobakter türünün genomunun *C.jejuni* genomuna göre daha stabil olmasına, hedef bölge kopi sayısına bağlı olarak kullanılan PCR yönteminin düşük sensiviteye sahip olmasına, PCR reaksiyonunu olumsuz yönde etkileyen inhibitörlerinin DNA ekstraktından yeterince uzaklaştırılamamasına ve hedef gen

bölgesinde dizi değişikliklerine bağlı olarak kullanılan primerlerin hedefi tanıyamaması sonucu görülen yanlış negatif sonuçlara bağlamışlardır<sup>169</sup>.

Dışkıdan direkt kampilobakter DNA'sını belirleyen PCR yöntemleri; aynı gün içerisinde sonuç verilebilmeleri, kültürde üretilmeyen veya çoğalamayan bakteri formlarının tesbitine imkân sağlamaları sebebi ile seçici kültür yöntemlerine göre daha avantajlıdır<sup>96</sup>. Lawson A J. ve arkadaşları hem ishalleri hastalıklarla kampilobakter türü mikroorganizmalar arasındaki etyolojik ilişkiyi, hemde tanıda seçici kültür teknikleri ile PCR bazlı testlerin sensitivitesini belirlemek amacı ile yaptıkları çalışmada 200 hastaya ait dışkı örneğini değerlendirmişlerdir. Bakteri izolasyonu için dışkı örneklerini mCCDA besiyerine ekmişler, dışkıdan PCR ile kampilobakter tanısı içinde, *C.jejuni-hipO* geni ile *C.coli-aspartokinaz* genini hedef alan primerlerin kullanıldığı test sistemlerini-master miks-oluşturmuşlardır. PCR ile diğer kampilobakter türlerini de belirleyebilmek içinde *16S rDNA* genindeki cins spesifik bir bölgeyi hedef alan primerleri kullanmışlardır. Seçici kültür yöntemi ile örneklerin 16 (% 8)'sında kampilobakter türü mikroorganizmalar üretilirken, PCR ile dışkı örneklerinin 19 (% 9,5)'unda kampilobakter pozitifliği tesbit edilmiştir. Araştırmada PCR ile kampilobakter yönünden pozitif bulunan 3 (% 1,5) dışkı örneğinin, seçici besiyerlerine yapılan ekimlerinde üremenin olmadığı, bunun muhtemelen dışkı örneğindeki kampilobakter türü mikroorganizmaların canlılığını kaybetmiş olmasından yada besiyerine ilave edilen antibiyotiklere duyarlı olmasından kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Buna karşılık bir dışkı örneğinden, seçici besiyerine yapılan ekimlerde kampilobakter türü mikroorganizma üretilmişken, PCR ile negatif sonuç alındığı bildirilmiştir. Bu sonuç, örnekteki bakteri yoğunluğunun düşüklüğüne, DNA izolasyon aşamasında DNA'nın degrade olmasına ve/veya bu izolatin 16SrDNA geninde hedef bölgedeki mutasyonel değişimlere bağlanmıştır<sup>92</sup>.

Kulkarni S P ve arkadaşları da ishalleri hasta dışkılarından kampilobakter türlerinin direkt tesbitinde kullanılan yöntemlerin tanı ve identifikasyon değerlerini belirlenmek amacı ile yaptıkları çalışmada; selektif besiyerleri, membran filtrasyon yöntemi sonrası non-selektif besiyerine ekim ve PCR testlerinin sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada ishalleri hastalara ait 343 dışkı örneği; mCCDA besiyerlerine ve 0.45µm çaplı selüloz triasetat membranlardan geçirildikten sonra kanlı besiyerlerine ekilmiş, ayrıca dışkı örneklerinden elde edilen DNA ekstraktları termofilik kampilobakter türleri için

spesifik olan 16S rDNA geni üzerindeki hedef bölgenin tespiti için PCR ile amplifiye edilmiştir. Sonuç olarak kullanılan tanı yöntemlerinden en az birisi ile örneklerin 23 (% 6,7)'ü kampilobakter yönünden pozitif bulunmuştur. Dışkı DNA ekstraktlarının 20 (% 5,8)'sinde 16S rDNA geni üzerinde hedeflenen dizilerin varlığı belirlenirken, mCCDA besiyeri ve membran filtrasyon sonrası kanlı besiyerine yapılan ekimlerde ise sırası ile 17 (% 4,9) ve 12 (% 3,5)'sinde termofilik kampilobakterlerin ürediği bildirilmiştir. Böylece kullanılan yöntemlerin duyarlılıkları sırası ile % 5,8, % 4,9 ve % 3,5 olarak belirlenmiş, 16S rDNA- PCR yönteminin tanıda en duyarlı yöntem olduğu gösterilmiştir. Diğer taraftan PCR ile elde edilen ampikonlar 16S rDNA gen bölgesindeki tür spesifik bölgeleri tanıyan problemlerin kullanıldığı PCR-ELISA ile, kültürde üretilmiş izolatlar ise fenotipik yöntemlerle tiplendirilmiştir. Genotipik yöntemle ampikonların 15'inde *C.jejuni*, 2 sinde hem *C.jejuni* hemde *C.coli*, 1'inde *C.coli*, 1'inde *C. upsaliensis* ve 1'inde de *C. hyointestinalis* spesifik proplarla hibridizasyon gerçekleşmiş, sonuç olarak ampikonların tamamı tiplendirilebilmiştir. Buna karşılık; fenotipik yöntemlerle m CCDA besiyerinde üreyen 14' izolat, membran filtrasyon yöntemi sonrası ekim ile üretilen 10 izolat biyokimyasal testler ile tiplendirilebilmiş, tiplendirilen izolatların genotipleme ile belirlenen türlere ait olduğu görülmüştür. Fenotipik yöntemlerin *C. upsaliensis* ve *C. hyointestinalis* gibi klinik örneklerden daha nadir olarak izole edilen türleri tanımlamada yetersiz kaldığı gösterilmiştir. Bu bulgulardan yola çıkan araştırmacılar; tanı amacı ile kullandıkları metodlar arasında duyarlılık yönünden anlamlı bir farklılığın bulunmadığını, ancak PCR' in sensivitesinin membran filtrasyon yönteminden anlamlı ölçüde yüksek olduğunu, bu yöntemle bir gün gibi kısa sürede sonuç alınabilmesinin testin en önemli avantajı olduğunu belirterek PCR yönteminin selektif kültür yöntemine alternatif olarak kullanılabileceğini iddia etmişlerdir. ( $0.05 > p > 0.02$ )<sup>93</sup>.

Hong H.S.H ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise, 358 ishalleri çocuklardan alınan dışkı örnekleri seçici kültür yöntemi ve *ceuE* bazlı multipleks PCR ile termofilik kampilobakter türleri yönünden araştırılmıştır. Araştırmada PCR ile dışkı örneklerinin % 77'sinin, selektif kültür yöntemi ile de % 56'sının kampilobakter yönünden pozitif bulunduğu bildirilmiştir. Araştırmada örneklerin % 24,86'sının kültür yöntemi ile negatifken PCR yöntemi ile pozitif olarak tesbit edildiği, buna karşılık % 4,47'sinin kültür yöntemi ile pozitifken PCR yöntemi ile negatif olarak tesbit edildiği bildirilmiş,

bu sonuca dayanarak, dışkıda kampilobakter tanısında PCR bazlı tekniklerin, seçici besiyerlerinin kullanıldığı kültür yöntemlerine göre daha yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip olduğu ileri sürülmüştür <sup>94</sup>.

Seçici kültür yöntemi ile realtime-PCR yönteminin tanı değerinin karşılaştırıldığı bir başka çalışmada, Eastwood K.ve arkadaşları, ishalli hastalara ait 187 dışkı örneğini termofilik kampilobakterler yönünden değerlendirmişler, dışkı örneklerinin % 22,4'ünde kampilobakterleri besiyerinde üretirken, realtime-PCR ile dışkı örneklerinden elde ettikleri DNA ekstraktlarının % 31'inde kampilobakter genomuna ait hedef dizilerin varlığını göstermişlerdir <sup>95</sup>. Bu grup iyi optimize edilmesi halinde dışkıdan direkt PCR'ın, kampilobakter tanısında seçici besiyerlerinin kullanıldığı izolasyon tekniklerinden daha duyarlı olduğunu belirtmişlerdir. Biz seçici besiyerleri kullanarak en az bir besiyerinde üremek şartı ile 17 (% 3,9) dışkı örneğinde Termofilik kampilobakter türlerini üretirken, dışkıdan ekstrakte edilen DNA örneklerinin 19 (% 4,5)'unda, termofilik kampilobakter türlerinin 23Sr RNA geni üzerindeki türler arası spesifik 491 bp büyüklüğündeki hedef dizilerin varlığını tespit ettik. Bu bulgularımız dışkıdan direkt kampilobakter tanısında kullanılan PCR bazlı metodların duyarlılıklarını seçici kültür tekniklerine göre daha yüksek olarak belirleyen literatür bilgileri ilede uygundur.

Çevre şartlarına uyum amacı ile genomik değişimlerin son derece kolay ve sık görüldüğü kampilobakter türlerinde, fenotipik tanımlama için kullanılabilecek stabilitede az sayıda biyokimyasal aktivite görülür. Bu sebeple kampilobakterlerin identifikasyonunda biyokimyasal özellikleri göz önünde bulundurularak geliştirilmiş laboratuvarlar arası tekrarlanabilen, standardize edilmiş sınırlı sayıda fenotipik test bulunmaktadır. Diğer taraftan aynı kampilobakter türünün fenotipik varyantlarının olması farklı araştırmacı grupları tarafından kampilobakterler için oluşturulan biyokimyasal identifikasyon tablolarının yorulanmasını ve kampilobakterlerin fenotipik yöntemlerle identifikasyonunu daha da problemli hale getirmektedir<sup>170</sup>. Son yıllarda yapılan birçok araştırmada, *hippürikaz* negatif veya düşük *hippürikaz* aktiviteli *C.jejuni* varyantlarının olduğu bu sebeple, *C.jejuni*'yi *C.coli* ve diğer kampilobakter türlerinden ayıran hippurat hidroliz testinin *C.jejuni*'nin identifikasyonu için yeterince güvenilir olmadığı gösterilmiştir. Bu durumun tersine bazı araştırmalarda *C.jejuni* dışında diğer kampilobakter türlerinin de hippurat hidroliz testi ile pozitif sonuç verdiği

bildirilmektedir. Bu aktivitenin gerçek anlamda *hippurikaz* enzim aktivitesini yansıtmadığı, kullanılan testin şartlarından kaynaklanan yalancı pozitiflik olduğu bazı araştırmacılar tarafından ileri sürülmüştür. Ayrıca hippurat hidroliz testinin sonuçlarını, inoküle edilen bakteri yoğunluğunda etkilediği gösterilmiştir<sup>96</sup>. İdentifikasyon şemasında problem yaratan başka bir varyantta *C.coli* suşları arasında gösterilmiştir. Bourke B. ve arkadaşları *C.coli*'nin bazı suşlarının TSI agarda H<sub>2</sub>S oluşturduğunu göstermişlerdir. İdentifikasyon testlerinin güvenilirliğinin tartışıldığı bir diğer kampilobakter türüde *C.lari*' dir. *C.jejuni* ve *C.coli*'nin son yıllarda nalidiksik asite artan oranlarda direnç geliştirmesi ile birlikte *C.lari*' yi diğer termofilik türlerden ayıran Nalidiksik asite duyarlık testlerinin sonuçlarının yorumlanması tartışmalı hale gelmiştir<sup>171</sup>. *C.upsaliensis* sefalotine duyarlı oluşu ile *C.jejuni* ve *C.coli* 'den ayırt edilmektedir. Ancak son yıllarda yapılan araştırmalar *C.upsaliensis* izolatlarının % 10-15 oranında sefalotine direnç geliştirdiğini göstermiştir<sup>172</sup>. Kampilobakterlerin tür düzeyinde tanımlanmasında, fenotipik yöntemlerle yaşanan bu olumsuzluklar, identifikasyonda genotipik yöntemlerin kullanılmasını zorunlu hale getirmiştir<sup>96</sup>.

Kolackova I ve ark.'ı kampilobakterlerin tür düzeyinde identifikasyonunda kullanılan yöntemlerin etkinliğini karşılaştırmak amacı ile yaptıkları çalışmada, ishali hastaların dışkıları ile gıda örneklerinden izole ettikleri 911 kampilobakter izolatını tiplendirmişlerdir. Termofilik kampilobakter türleri için spesifik üç primer çiftinin kullanıldığı tek tüp multipleks-PCR yöntemi ve fenotipik yöntemlerin sonuçlarının karşılaştırıldığı çalışmada; tür spesifik PCR ile izolatların % 85,1'inde; *C.jejuni* % 12,5'inde de *C. coli* için spesifik DNA fragmentleri tespit edilirken, izolatların % 2,3'ünde miks enfeksiyona işaret eden, hem *C.jejuni* hemde *C.coli* için spesifik DNA dizilerinin varlığı tespit edilmiştir. Buna karşılık, hippurat hidroliz testi baz alınarak yapılan fenotiplemeye göre izolatların % 81'i; *C.jejuni*, % 19'uda *C.coli* olarak tiplendirilmiştir. Araştırmacılar PCR testi ile karşılaştırıldığında, hippurat hidroliz testi ile örneklerin % 31,3'ünün yanlış pozitif ya da yanlış negatif sonuç verdiğini, bu durumun bazı *C.jejuni* izolatlarında *hippurikaz* enzimini kodlayan gen mutasyonlarından, bakterinin üreme fazında olmasından ya da bakteri inokulum, miktarının yetersizliği gibi yöntemin standardize edilememesinden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada miks örnekler yalnız PCR testi ile tesbit edilebilmiştir<sup>173</sup>.

Steinhauserovalar I. ve arkadaşlarının yaptıkları benzer çalışmada ise termofilik kampilobakterlerin identifikasyonunda fenotipik ve genotipik yöntemler karşılaştırılmıştır. Araştırmada insanlardan elde edilen ve fenotipik testlerle 62'si *C.jejuni*, 28'i *C.coli* olarak tiplendirilen 90 termofilik kampilobakter suşu Engval E.O'nun tanımladığı, Termofilik kampilobakter türler için spesifik 23SrDNA-RFLP yöntemi ile tiplendirilmiştir. Fenotipik testlerle *C.jejuni* olarak identifiye edilen kampilobakter izolatlarının 58'i 23SrDNA-RFLP'de *C.jejuni* ile uyumlu fragment profili sergilediği halde 4'nün *C.coli* ile uyumlu profil göstermediği fenotipik testlerle *C.coli* olarak identifiye edilen izolatların tamamının ise 23SrDNA-RFLP'de *C.coli* ile uyumlu fragment profili sergilediği bildirilmiştir<sup>170</sup>.

Rönnert A C. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise insan dışkısından seçici kültür yöntemi ile izole edilen 108 kampilobakter suşu fenotipik yöntemler ve 23S rDNA-PCR/RFLP yöntemi ile identifiye edilmiş, 23S rDNA-PCR/RFLP yöntemi ile izolatların tamamı *C.jejuni* ile uyumlu bant profili sergilediği halde hippurat hidroliz testi ile izolatların % 5'inin negatif sonuç verdiği bildirilmiştir<sup>100</sup>.

Denis M. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise 294 kampilobakter izolatı; 16SrDNA geni üzerinde 857 bp'lik kampilobakter genusu için spesifik bir bölge, *map A* geninde 589 bp *C.jejuni* için spesifik bir bölge ile *ceu* geninde 462 bp.'lik *C.coli* için spesifik bir bölgeyi tanıyan üç primer çiftinin kullanıldığı multipleks PCR yöntemi ile tiplendirilmiştir. Aynı izolatlar fenotipleme için hippurat hidroliz testi ile de değerlendirilmiştir. Hippurat hidroliz testi ile izolatların, 74'ü *C.jejuni* ve 220'si *C.coli* olarak tiplendirilirken, multipleks PCR ile 66 izolat *C.jejuni*, 228 izolat *C.coli* olarak tanımlanmıştır. Araştırmada kullanılan 154 izolatın identifikasyonunda her iki test arasında uyum bulunmadığı, Hippurat hidroliz testi yönünden pozitif bulunan 174 izolatın (% 59) multipleks PCR ile *C.coli* olduğu. Hippurat hidroliz testi ile tanımlanamayan 20 izolatın (% 7) multipleks PCR ile *C.jejuni* olarak identifiye edildiği bildirilmiştir. Araştırmada kullanılan tüm izolatlar Linton ve ark.'nın önerdiği PCR yöntemi ile de değerlendirilmiş, iki PCR testleri arasında % 100 uyum bulunduğu halde hippurat hidroliz testi ile PCR testleri arasında % 34 uyum bulunduğu bildirilmiştir<sup>101</sup>.

Aisha AA. ve arkadaşlarıda, kampilobakter yönünden pozitif olduğu bilinen 114 örneği, genus spesifik: *cadF*, *C.coli* için spesifik: *asp* ve *C.jejuni* için spesifik: *hipO* gen

bölgelerindeki konservatif bölgeleri hedef alan primerlerin kullanıldığı bir multipleks PCR testi ve hippurat hidroliz testi ile tiplendirmiştir. Multipleks PCR testi ile izolatların 70 (% 61,4)'i *C.jejuni*, 35 (% 30,7)' i *C.coli*, 9 (% 7,9)'u her iki türün bir arada bulunduğu miks infeksiyon olarak belirlenmiştir. Buna karşılık, multipleks PCR sonuçları ile kıyaslandığında, hippurat hidroliz testi ile 17 örneğin *C.jejuni* olmadığı halde *C.jejuni*, 7 örneğin ise *C.jejuni* oldukları halde *C.coli* veya *C.lari* olarak tanımlandığı gösterilmiş, hippurat hidroliz testinin tanımlamada yetersiz olduğu vurgulanmıştır<sup>102</sup>.

Nayak R.ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise insan dışkısı ve çevresel örnekten izole edilen 97 *Campylobacter* suşu, genus spesifik *cadF*, *C.coli* için spesifik *ceuE* ve *C.jejuni* için spesifik *oxido reductase* genini hedef alan primerlerin kullanıldığı bir multipleks-PCR yöntemi ve hippurat hidroliz testi ile identifiye edilmiştir. Multipleks- PCR yöntemi ile suşların tamamı *C.jejuni* olarak belirlendiği halde hippurat hidroliz testi ile 22 (% 22,68) suş negatif enzim aktivitesi göstererek *C.coli* olarak tanımlanmıştır<sup>103</sup>.

Klena J D. ve arkadaşları kampilobakter genomunda yer alan ve UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase enzimini kodlayan *lpxA* geninin tür düzeyinde tanı için yüksek ayırım gücüne sahip olduğunu bildirmiş ve klinik örneklerden *C. jejuni*, *C. coli*, *C.lari* ve *C. upsaliensis*'in tanı ve identifikasyonunda *lpxA* geninde her tür için farklı bölgeyi hedef alan, üç ayrı primer çiftinin kullanıldığı bir multipleks PCR yöntemini önermişlerdir. Araştırmacılar klinik ve çevresel örnekten elde edilen 108 kampilobakter izolatını bu multipleks PCR testi ile identifiye etmiş ve sonuçların biyokimyasal tiplendirme yöntemi ile % 100 uyumlu olduğunu bildirmişlerdir<sup>104</sup>.

Burnett T.A. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise, fenotipik özelliklerine göre *C.jejuni* olarak tanımlanmış 116 klinik izolat, farklı gen bölgelerinin hedeflendiği daha önce tanımlanmış 6 PCR testi ile yeniden tiplendirilmişlerdir. PCR testlerinin tamamında, fenotipik olarak *C.jejuni* tanısı alan 32 insan izolatının 31'i (% 97) *C.jejuni*, 1 (% 3)'i ise *C.upsaliensis* olarak tanımlanırken, 83 tavuk izolatının 56 sı(% 67) *C.jejuni*, 27 (% 33)'side *C.coli* olarak identifiye edilmiştir<sup>105</sup>.

Persson S. ve arkadaşları ise daha önce biyokimyasal testlerle *C.jejuni* olarak tanımladıkları 88 izolat ile *C.coli* olarak tanımladıkları 47 izolatı, 16S rDNA genindeki genus spesifik dizileri, *C.jejuni* için spesifik olan *hipO* genini ve *C.coli* için spesifik

olan aspartokinase genini tanıyan primerleri kullandıkları multipleks PCR yöntemi ile yeniden tiplendirmişlerdir. Sonuç olarak fenotipik yöntemle *C.coli* olarak identifiye edilip Multipleks PCR ile *C.jejuni* olarak tesbit edilen bir suş hariç tüm suşların Multipleks PCR testinde fenotipik identifikasyon ile uyumlu sonuç verdiğini bildirmişlerdir<sup>106</sup>.

Biz hippurat hidroliz testini baz olarak aldığımızda, dışkıdan seçici besiyerlerinde izole ettiğimiz 17 izolatın 13 (% 76,5 )'ünü *C.jejuni*, 4 (% 23,5)'ünü de *C. coli* olarak tanımladık (Tablo14). Aynı izolatları PCR-RFLP ile tiplendirdiğimizde ise; 14 (% 82,4) izolatın *C.jejuni* ile 3 izolatın (% 17,6) *C.coli* ile uyumlu fragment profili sergilediğini tesbit ettik. PCR-RFLP sonuçlarını Hippurat hidroliz testi ile karşılaştırdığımızda; Hippurat hidroliz testi ile *C.jejuni* ön tanısı alan 13 suşdan 12'sinin PCR/RFLP testinde *C.jejuni* ile uyumlu fragment profili gösterdiğini ancak hippurat hidrolizi sonucuna göre *C.jejuni* olarak tanımladığımız 1 suşın, PCR-RFLP sonuçlarına göre *C.coli* ile uyumlu fragment profili sergilediğini buna karşılık hippurat hidroliz testi ile negatif olarak belirlenen ve fenotipik olarak *C.jejuni* olarak belirlediğimiz 4 suştan 2'sinin PCR-RFLP' de *C.jejuni* ile uyumlu fragment polimorfizmi gösterdiğini tesbit ettik (Tablo14).

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Termofilik kampilobakter türlerinin bölgemizdeki ishale seyreden gastroenteritlerdeki insidansı ile, termofilik kampilobakterlerin dışkı örneklerinden tanısında kullanılan kültüre dayalı metodlarla, 23S rDNA genindeki türe spesifik dizilerin PCR-RFLP yöntemi ile tespitine dayalı moleküler metodların tanı değeri ve kabul edilebilirliğini tespit amacı ile planlanan ve ishalleri 434 hastaya ait dışkı örneğinin değerlendirildiği çalışma sonunda;

1- Termofilik kampilobakterlerin çalışmaya dahil edilen olguların % 5,1’inde etyolojiden sorumlu oldukları,

2- Çalışmada kullanılan, kültüre dayalı yöntemlerle 17 (% 3,9) hastanın dışkı örneğinde kampilobakter tespit edilirken PCR-RFLP yöntemi ile 19 (% 4,5) hastanın dışkı örneğinde termofilik kampilobakterlere ait hedef dizilerin bulunduğu,

3- Seçici kültür teknikleri ile termofilik kampilobakter tespit edilen dışkı örneklerinden 3 (% 13,6)’ü PCR-RFLP ile negatif bulunurken, 5 (% 22,7) hastaya ait dışkı örneğinde de sadece PCR-RFLP ile hedef dizilerin tespit edilebildiği,

4- PCR-RFLP testi sonuçları altın standart olarak kabul edildiğinde seçici kültüre dayalı metodların duyarlılığının % 73,7, özgüllüğünün % 99,3 olduğu,

5- Seçici kültüre dayalı tanıda kullanılan besiyerlerinden mCCDA ve CAT’ın benzer duyarlılıkta olmasına (% 73,7) karşılık, SSA besiyerinin duyarlılığının bu besiyerlerine göre daha düşük (% 57,9) olduğu, ancak mCCDA/CAT besiyeri ile SSA besiyerinin birlikte kullanılması halinde duyarlılığın optimize edilebileceği,

6- Seçici besiyerinde üretilen 17 suşun hippurat hidroliz testi esas alınarak yapılan fenotiplendirilmesinde *C.jejuni* olduğu düşünülen, 1 suşun PCR-RFLP sonuçlarına göre *C.coli* ile uyumlu fragment profili, buna karşılık hippurat hidroliz testi negatif olarak belirlenen ve fenotipik olarak *C.jejuni* düşünülmeyen 2’suşun PCR-RFLP analizinde *C.jejuni* ile uyumlu fragment polimorfizmi gösterdiği, bu sonuçlara göre PCR-RFLP bazlı genotiplendirme baz olarak alındığında fenotipik yöntemlerle *C.jejuni* tiplendirmesinin duyarlılığının % 85,7, özgüllüğünün % 66,6 olduğu, *C.coli* için bu oranların sırası ile % 66,6 ve % 85,7 olduğu görülerek, özellikle çocukluk dönemi

sekretuvar veya dizanterik formda seyreden ishallerde termofilik kampilobakter türlerinin mutlaka araştırılması gerektiği ve laboratuvar imkanlarının uygun olması halinde kısa sürede ve yüksek duyarlılıkta sonuç veren PCR-RFLP yönteminin tanı amacı ile kullanılmasının uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Skirrow M B.** Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related bacteria. *J.Com. Pathol.* **1994**; 111:113-149
2. **Stanley K, Jones K.** Cattle and sheep farms as reservoirs of *Campylobacter*. *J. Appl. Microbiol.* **2003**; 94:104-113
3. **Vliet van AHM, Ketley JM.** Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *J. Appl. Microbiol.* **2001**; 90:45-56
4. **Blaser, M. H, Powers, H, Wang, B.** Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in biological milieus. *J.Clin. Microbiol* **1980**; 127:309–313.
5. **Russell RG, et al.** Early colonic damage and invasion of *Campylobacter jejuni* in experimentally challenged infant *Macaca mulatta*. *J Infect Dis* **1993**; 168:210–5.
6. **Blaser M, Berkowitz I, LaForce F, Cravens J, Relleer L, Wang W.** *Campylobacter enteritis* clinical and epidemiological features. *Ann. Intern.Med.* **1979**; 91:179–185.
7. **Blaser M, Hardesty H, Powers B, Wang W.** Extra intestinal *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections: host factors and strain characteristics. *J.Infect. Dis.* **1986**; 153:552–559.
8. **Aarestrup FM, Engberg J.** Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. *Vet Res* **2001**; 32:311-21.
9. **Molina JM, Casin I, Hausfater P, Giretti E, et al.** *Campylobacter* infections in HIV-infected patients: clinical and bacteriological features. *AIDS* **1995**; 9:881
10. **Butzler JP, Dekeyser P, Detrain M, Dehaen F.** Related vibrio in stools. *J Pediatr.* **1973**; 82:493–495.
11. **Öngen, B.** Türkiye'de ishal etkenleri. *ANKEM Derg* **2007**; 21(1):37-41
12. **Zarakolu P, Akba E, Levent B, Gözalan A.** İshalli çocuk hastalardan izole edilen bakteriyel patojenlerin dağılımı. *Flora* **1999**; 4(3):190-4.
13. **Wang G, Clifford G.** Colony Multiplex PCR Assay for Identification and Differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C.coli*, *C.lari*, *C upsaliensis* and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J. Clin. Microbiol* **2002**; 12:4744–4747
14. **Fermer CH, Engvall EO.** Specific PCR identification and differentiation of the thermophilic campylobacters, *Campylobacter jejuni*, *C.coli*, *C.lari* and *C.upsaliensis*. *J. Clin. Microbiol* **1999**; 37:3370–3373
15. **Blaser M J.** Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. *J. Infect. Dis.* **1997**; 176:103-105.
16. **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**.
17. **Smith T.** The etiological relation of Spirilla (*V.fetus*) to bovine abortion. *J Exp Med*, **1919**; 30:313–323.

18. **Jones FS, Orcutt M, Little RB.** Vibrios (*Vibrio jejuni* n.sp.) associated with intestinal disorders of cows and calves. *J Exp Med* **1931**; 53:853–864.
19. **Doyle LP.** A vibrio associated with swine dysentery. *Am J Vet Res* **1944**; 5:3–5.
20. **King EO.** Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related vibrio. *J Infect Dis* **1957**; 101:119-128.
21. **Dekeyser P, Gossuin-Detrain M, Butzler JP, Sternon J.** Acute enteritis due to a related vibrio: first positive stool cultures. *J Infect Dis* **1972**; 125:390–392.
22. **Skirrow MB.** *Campylobacter* enteritis: a ‘new’ disease. *BMJ* **1977**; 2:9–11.
23. **On SLW.** Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* **2001**; 90:1–115
24. **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 Journal of Systematic Bacteriology* **1973**; 23:122-134
25. **Goodwin CS, Armstrong JA.** Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology* **1989**; 39:397-405.
26. **Vandamme P, De Ley J.** Proposal for a new family, *Campylobacteraceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **1991**; 41:451-455
27. **Hansson I,** Bacteriological and Epidemiological Studies of *Campylobacter* spp.in Swedish Broilers. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, **2007**.
28. **Smibert R M.** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2<sup>th</sup> Ed. USA: Springer, **2005**; 145–1165.
29. **Blaser MJ.** *Campylobacter jejuni* and related species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and practice of infectious diseases*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, **2000**: 2276-85.
30. **Ketley MJ, Konkel ME.** *Campylobacter Molecular and Cellular Biology*. 1<sup>th</sup> ed Norfolk: Horizon Bioscience, **2005**.
31. **Karin G, Bart C. J, Wouter VR, Anne P,** et al. Functional polymorphisms in LPS receptors CD14 and TLR4 are not associated with disease susceptibility or *Campylobacter jejuni* infection in Guillain–Barre patients. *Journal of Neuroimmunology* **2004**; 150:132–138
32. **Karlyshev A V, Linton D, Gregson N A, Wren B W.** A novel paralogous gene family involved in phase-variable flagella-mediated motility in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology* **2002**; 148: 473–480.
33. **Mc Sweegan E, Burr DH, Walker RI.** Intestinal Mucus Gel and Secretory Antibody Are Barriers to *Campylobacter jejuni* Adherence to INT 407 Cells. *Infection And Immunity*. **1987**; 55 (6):1431-1435
34. **Karlyshev A, McCrossan M, Wren B.** Demonstration of polysaccharide capsule in *Campylobacter jejuni* using electron microscopy. *Inf. Immun.* **2001**; 69:5921–5924.
35. **Blaser M J, Smith P F, Repine J E, Joiner K.A.** Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections. Failure of encapsulated *Campylobacter fetus* to bind C3b explains serum and phagocytosis resistance. *J Clin Invest*. **1988**; 81(5):1434–1444.
36. **Parkhill J, Wren B W, Mungall K, Ketley J M, Churcher C, Basham D, Chillingworth T, Davies R M, Feltwell T, Holroyd S, Jagels K, Karlyshev A V, Moule S,** et al. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*. **2000**; 403:665–668

37. **Dorrell N, Mangan JA, Laing KG, Hinds J, Linton D, Al-Ghusein H, Barrell BG, Parkhill J, Stoker NG, Karlyshev AV, Butcher PD, Wren BW.** Whole genome comparison of *Campylobacter jejuni* human isolates using a low-cost microarray reveals extensive genetic diversity. *Genome Res.* **2001**; 11(10):1706-1715
38. **Leonard EE, Takata T, Blaser MJ, Falkow S, Tompkins LS, Gaynor EC.** Use of an open-reading frame-specific *Campylobacter jejuni* DNA microarray as a new genotyping tool for studying epidemiologically related isolates. *J Infect Dis.* **2003**; 15:187(4):691-694
39. **Hazeleger W, Wouters J, Rombuts F, Abee T.** Physiological activity of *Campylobacter jejuni* far below the minimal growth temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**. 64:3917–3922.
40. **Corry JEL, Post DE, Colin P, Laisney M J.** Culture media for the isolation of campylobacters. *Int J Food Microbiol.* **1995**; 26(1):43-76.
41. **Kelly D.J, et al.** The physiology and metabolism of *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*. *J. Appl. Microbiol.* **2001**; 90(6):16-24
42. **Gun M, Rennie J R.P, Thornley J., Richardson H H R, Hodge D, Lynch J.** Laboratory and clinical evaluation of media for *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* **1987**; 25:2274-2277.
43. **Hutchinson DN, Bolton F J.** Improved blood free selective medium for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faecal specimens. *J. Clin. Pathol.* **1984**; 37:956-957.
44. **Wang WL, Blaser M J.** Detection of pathogenic *Campylobacter* species in blood culture systems. *J Clin Microbiol.* **1986**; 23(4):709–714.
45. **Cappelletti JM, 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.* **1999**; 65:5154-5157.
46. **Hebert G, Hollis D, Weaver R, Lambert M, Blaser M, Moss C.** 30 years of *Campylobacter*: Biochemical characteristics and a biotyping proposal for *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* **1982**; 15:1065–1073.
47. **Doyle M P, Roman D J.** Sensitivity of *Campylobacter jejuni* to drying. *J. Food Protect.* **1982**; 45:507-510.
48. **Obiri-Danso K, Paul N, Jones K.** The effects of UVB and temperature on the survival of natural populations and pure cultures of *Campylobacter jejuni*, *Camp. coli*, *Camp. lari* and urease-positive thermophilic campylobacters (UPTC) in surface waters. *J. Appl. Microbiol.* **2001**; 90 (2):256-267.
49. **Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G eds.** Curved Gram negative bacilli and oxidase positive fermenters: *Campylobacteraceae* and *Vibrionaceae*. In: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6<sup>th</sup> ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, **2006**: 321-361.
50. **Buswell CM, Herlihy YM, Lawrence M L, McGuiggan JT, et al.** Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. in water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent-antibody and -rRNA staining. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**; 64 (2):733-741.
51. **Allos BM, Blaser MJ.** *Campylobacter jejuni* and the expanding spectrum of related infections. *J Clin Infect Dis* **1995**; 20:1092–101.

52. **Altekruse S.F, Stern N.J, Fields PI, Swerdlow DL.** *Campylobacter jejuni*-an emerging foodborne pathogen. *Emerg. Infect. Dis.* **1999**; 5:28-35.
53. **Moore J E, Wilson T S, Wareing D R A, Humphrey T J, Murphy P G.** Prevalence of thermophilic *Campylobacter* spp. in ready- to-eat foods and raw poultry in Northern Ireland. *J. Food Protect.* **2002**; 65 (8):1326-1328.
54. **Darka Ö, Yılmaz Y A.** Tavuk eti ve campylobacteriosis. *Hacettepe Tıp Dergisi* **2004**; 35:100-102.
55. **De Boer E, Hahne M.** Cross-contamination with *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* spp. from raw chicken products during food preparation. *J. Food Protect.* **1990**; **53 (12)**:1067-1068.
56. **Fahey T, Morgan D, Gunneburg C, Adak GK, Majid F, Kaczmariski E.** An outbreak of *Campylobacter jejuni* enteritis associated with failed milk pasteurization. *J. Infect.* **1995**; 31(2): 137-143.
57. **Metzing L.** Waterborne outbreaks of *Campylobacter* enteritis in central Sweden. *Lancet.* **1981**; 8:352-354.
58. Preliminary Food Net data on the incidence of food-borne illnesses-selected sites, US, **2001**.MMWR Morb mortal Wkly Rep. 51; 325-329.
59. **Wj Snelling, Matsuda M, Moore JE** .Under the Microscope *Campylobacter*ler *jejuni*. *J.Appl. Microbiol* **2005**; 41:297-302.
60. **Poly F, Threadgill D, Stintzi A.** Genomic Diversity in *Campylobacter jejuni*: Identification of *C. jejuni* 81-176 Specific Genes. *J Clin Microbiol.* **2005**; 43(5):2330–2338.
61. **Murphy C, Carrol C.** Induction of an adaptive tolerance response in the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni*. *FEMS Microbiology* **2003**; 223: 89-93
62. **Elvers KT, Guanghui W.** Role of an Inducible Single-Domain Hemoglobin in Mediating Resistance to Nitric Oxide and Nitrosative Stress in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* *Journal Of Bacteriology* **2004**; 8:5332–5341.
63. **Lin J , Sahin O, Michel LO, Zhang Q.** Critical role of multidrug efflux pump CmeABC in bile resistance and in vivo colonization of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun.* **2003**; 71 (8):4250-4300.
64. **Monteville MR, 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. *Microbiology* **2003**; 149:153– 165 .
65. **Pei Z, Burucoa C, Grignon B, Baqar S, Huang X.** Mutation in the *peb1A* locus of *Campylobacter jejuni* reduces interactions with epithelial cells and intestinal colonization of mice. *Infect Immun.* **1998**; 66:938–943.
66. **Jin S, Song YC, Emili A, Sherman PM. Chan VL.** 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.* **2003**;5:165—174.
67. **Zilbauera M, Dorrell N, W. Wrenb B, Bajaj-Elliott M.** *Campylobacter jejuni*-mediated disease pathogenesis: an update. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **2008**; **102**: 123—129.
68. **Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM.** *Vibrio* and related species, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Campylobacter*, *Helicobacter* and others. In. *Diagnostic Microbiology* 9<sup>th</sup>. Ed. London: Mosby Year Book, **1994**: 429-444.

69. **Allos B M.** *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. *Clin. Infect. Dis.* **2001**; 32:1201—1206.
70. **Blakelock RT.** Beasley SW. Infection and the gut. *Semin. Pediatr. Surg.* **2003**; 12:265—274.
71. **Kendell EJ, Tanner EI.** *Campylobacter* enteritis in general practice. *J Hyg* **1982**; 88:155–63.
72. **Rees JH, Soudain SE, Gregson NA, Hughes RAC.** A prospective case control study to investigate the relationship between *Campylobacter jejuni* infection and Guillain-Barre syndrome. *N Engl J Med* **1995**; 333:1374-1379.
73. **Nachamkin I, Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA.** *Campylobacter* and *Arcobacter*. *Manual of Clinical microbiology*. 3.<sup>th</sup> ed, **1999**:716-722.
74. *Campylobacter* İzolasyonu ve İdentifikasyonu Standart İşletim Prosedürü. Refik Saydam Hıfızssıhha Merkezi Başkanlığı Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarı.
75. Park CH, Hixon DL, Polhemus AS, Ferguson CB, Hall SL, Risheim CC, et al. A rapid diagnosis of *Campylobacter* enteritis by direct smear examination. *Am J Clin Pathol* **1983**; 80:388-90.
76. **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* **1984**; 16:263–265
77. **Piersimoni C, Bornigi A S, Curzi L, De Sio G.** Comparison of two selective media and a membrane filter technique for isolation of *Campylobacter* species from diarrhoeal stools. *Eur. J Clin. microbiol and infect dis.* **1995**; 14:539-542
78. **Engberg J, Gerner-Smidt P, On S.L.W, Harrington CS.** Efficient isolation of *ampylobacter* from stools. *J. Clin. Microbol*, **2000**; 38 (7):2798-2799
79. **Cheryl A, et al.** Trimethoprim Activity in Media Selective for *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbol* **1982**; 11:808-812
80. **Aspinall S T, Wareing D R, Hayward P G, Hutchinson D N.** Selective medium for thermophilic campylobacters including *Campylobacter upsaliensis*. *J Clin Pathol.* **1993**; 46(9): 829–831.
81. **Bolton FJ, Coates D, Hinchliffe PM, Robertson L.** Comparison of selective media for isolation of *Campylobacter jejuni/coli*. *J Clin Pathol.* **1983**; 36(1):78-83.
82. **Karmali MA, Simor AE, Roscoe M, Fleming PC, Smith SS, Lane J.** Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces. *J Clin Microbiol.* **1986**; 23(3):456–459
83. **Merino F J, Agulla A, Villasante P A, et al.** Comparative Efficacy of Seven Selective Media for Isolating *Campylobacter jejuni* *J. Clin. Microbol*, **1986**; 9:451-452
84. **On S L W.** Identification Methods for *Campylobacters*, *Helicobacters* and Related Organisms *Clinical Microbiology Reviews*, **1996**:405–422
85. **Morris G K. et all.** Comparison of four hippurate hydrolysis methods for identification of thermophilic *Campylobacter* spp. *J. Clin. Microbol* **1985**; 22: 714–718
86. **Hindiyeh M, Jense S.** Rapid Detection of *Campylobacter jejuni* in Stool Specimens by an Enzyme Immunoassay and Surveillance for *Campylobacter upsaliensis* in the Greater Salt Lake City Area. *J. Clin. Microbol.* **2000**; 8:3076–3079

87. **Tolcın R, Lasalvia MM, Kirkley BA, Vetter EA, et al.** Evaluation of the Alexon-Trend ProSpecT Campylobacter Microplate Assay *J. Clin. Microbiol.* **2000**; 10:3853–3855
88. **Hodinka RL, Gilligan PH** Evaluation of the Campyslide agglutination test for confirmatory identification of selected *Campylobacter* species. *J Clin Microbiol* **1988**; 26:47–49
89. **Nachamkin I, Barbagallo S.** Culture confirmation of *Campylobacter* spp. by latex agglutination. *J Clin Microbiol* **1990**; 28:817–818
90. **Fermér C, Engvall EO.** Specific PCR Identification and Differentiation of the Thermophilic Campylobacters, *Campylobacter jejuni*, *C.coli*, *C.lari*, and *C.upsaliensis* *J. Clin. Microbiol.* **1999**; 37(10): 3370-3373
91. **Kärenlampi RI, Tolvanen TP, Hänninen M L.** Phylogenetic Analysis and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Identification of *Campylobacter* Species Based on Partial *groEL* Gene Sequences, *J Clin Microbiol* **2004**; 42:5731-5738.
92. **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.* **1998**; 121, 547-553.
93. **Kulkarni SP, Lever S, Logan J M J, Lawson A J, Stanley J, Shafi M S.** Detection of campylobacter species: a comparison of culture and polymerase chain reaction based methods *J Clin.Pathol.* **2002**; **55**:749-753
94. **Houng HS, Sethabutr O, Nirdnoy W, Katz DE, Pang LW.** Development of a *ceuE*-based multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for direct detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Thailand. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2001**; 40(1-2):11-9
95. **Eastwood K, Schuster H, Gascoyne-Binzi D.** Comparison of real-time PCR and direct culture for the detection of *Campylobacter* spp. from human faecal samplesç *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ICC, Munich, Germany, **2007**: Abstract number: 17339
96. **On SLW, Jordan PJ** Evaluation of 11 PCR Assays for Species-Level Identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Clin. Microbiol.* **2003**; 41(1): 330-336
97. **Hill JE, Paccagnella A, Law K, Melito PL.** Identification of *Campylobacter* spp. and discrimination from *Helicobacter* and *Arcobacter* spp. by direct sequencing of PCR-amplified *cpn60* sequences and comparison to *cpnDB*, a chaperonin reference sequence database. *J Med. Microbiol.* **2006**; 55:393–399
98. **Marshall SM, Melito PL, Woodward DL, Johnson WM, Rodgers FG, Mulvey MR.** Rapid identification of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter* isolates by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* **1999**; 37:4158-60.
99. **Eyers M, Chapelle S, Van Camp G, Goossens H, De Wachter R.** Discrimination among thermophilic *Campylobacter* species by polymerase chain reaction amplification of 23S rRNA gene fragments. *J Clin Microbiol.* **1993**; **31**(12):3340–3343
100. **Rönner AC, Engvall EO, Andersson L, Kaijser B.** Species identification by genotyping and determination of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from humans and chickens in Sweden. *Int J Food Microbiol* **2004**; 96:173-9.
101. **Denis MC, Soumet K, Rivoal G, et al.** Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *J.Appl Microbiol* **1999**; 29: 406–410
102. **Al Amri A, Senok AC, Ismaeel AY, Al-Mahmeed A E, Botta G A** Multiplex PCR for direct identification of *Campylobacter* spp. in human and chicken stools. *J Med Microbiol* **2007**; **56**: 1350-1355

103. **Nayak R, Stewart TM, Nawaz MS.** PCR identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by partial sequencing of virulence genes *Molecular and Cellular Probes*, **2005**; 19(3):187-193
104. **Klena J D, Parker C T, Konkel M E et al.** Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* by a multiplex PCR developed from the nucleotide sequence of the lipid A gene *lpxA*. *J Clin Microbiol* **2004**; 42(12): 5549-5557
105. **Burnett TA, Hornitzky M A, Kuhnert P, Djordjevic S P.** Speciating *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from poultry and humans using six PCR-based assays. *FEMS Microbiology Letters* **2002**; 216: 201–209.
106. **Persson S, Olsen KEP.** **Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples** *Med Microbiol* 2005; 54:1043-1047
107. **Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL et al.** Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* **1990**; 28(3):495–503.
108. **Schmidt OR, Brass F.** Improved serodiagnosis of *Campylobacter jejuni* infections using recombinant antigens. *J Med Microbiol* **2005**; 54:761–767
109. **İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M., Nobel Matbacılık, 2. Baskı 2002**; 1638-1643
110. **Gibreel A, Taylor D.E.** Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Antimicrob Chemother* **2006**; 58:243-255
111. **D'lima CB, Miller WG, Mandrell RE, Wright SL, Siletsky R M, Carver D K, Kathariou S.** Clonal Population Structure and Specific Genotypes of Multidrug-Resistant *Campylobacter coli* from Turkey. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**; 73: 2156-2164
112. **Tenkate T D, Stafford RJ.** Risk factors for campylobacter infection in infants and young children a matched case-control study *Epidemiol. Infect.* **2001**; 127:399-404
113. **The Increasing Incidence of Human Campylobacteriosis. Report and Proceedings of a WHO Consultation of Experts Copenhagen, Denmark 21-25 November 2000**
114. **Jiang ZD, Lowe B, Verenkar MP, Ashley D, Steffen R, Tornieporth N, et al.** Prevalence of enteric pathogens among international travelers with diarrhea acquired in Kenya (Mombasa), India (Goa), or Jamaica (Montego Bay). *J Infect Dis* **2002**; 185:497-502.
115. **Adachi JA, Jiang ZD, Mathewson JJ, Verenkar MP, Thompson S, Martinez-Sandoval F, et al.** Enteraggregative *Escherichia coli* as a major etiologic agent in traveler's diarrhea in 3 regions of the world. *Clin Infect Dis.* **2001**; 32:1706-1710
116. **Mead PS, et al.** Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* **1999**; 5(5): 607-25
117. **Centers for Disease Control and Prevention, Preliminary FoodNet data on the incidence of food –borne illnesses–selected sites.US,2001 .MMWR Morb Mortal Wkly Rep.51:325-329.**
118. **Miller G, Dunn M.** Does age acquired immunity confer selective protection to common serotypes of *Campylobacter jejuni* ? *BMC infectious diseases* **2005**; 5:66
119. **EFSA report on animal diseases transmissible to humans** [www.efsa.europa.eu/en/press\\_room/press\\_release](http://www.efsa.europa.eu/en/press_room/press_release). **2005**:1279

120. **Köksal F.** Bölgemizde görülen akut diyarelerdeki *Campylobacter jejuni*'nin rolü.,Uzmanlık tezi, Çukurova Üniversitesi, ADANA, **1984**
121. **Kılıç.B** Çocukluk Çağı Gastroenteritlerinde *Campylobacter jejuni* insidansının kültür ve ELİSA testi ile araştırılması. Uzmanlık tezi, ADANA,**1992**.
122. **Chowdhury M N H.et al.** *Campylobacter* Gastroenteritis in Children in Riyadh, Saudi Arabia *Journal of Tropical Pediatrics* **1992**; 38(4):158-161;
123. **Rajan D P and Mathan VI.** Prevalence of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in healthy populations in southern India. *J Clin Microbiol.***1982**; 15(5):749-751
124. **Gurtler M, Alter T, Kasımır S, Fehlhaber K.** The importance of *Campylobacter coli* in human campylobacteriosis: prevalence and genetic characterization. *Epidemiol. Infect.* **2005**; 133:1081–1087.
125. **Tabak F.** Erişkinlerde görülen akut gastroenteritlerin epidemiyolojisi.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Yaz ishalleri -Besin Zehirlenmeleri Sempozyumu., İstanbul, **1998**: 73-88.
126. **Evans J.S, et al.** Introduction and spread of termofilik *Campylobacters* important in veterinary medicine *.Vet.Record.* **1992**; 131:574-576.
127. **Beery JT, Hugdahl MB, Doyle MP** Colonization of gastrointestinal tracts of chicks by *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol.* **1988**; 54(10):2365-70
128. **Newell DG, Fearnley C.** Sources of *Campylobacter* Colonization in Broiler Chickens. *Appl Environ Microbiol.* **2003**; 69:4343-4351.
129. **Pearson A, Greenwood M, Feltham R, Healing T, Donaldson J, Jones D, Colwell R.** Microbial ecology of *Campylobacter jejuni* in a United Kingdom chicken supply chain: intermittent common source, vertical transmission, and amplification by flock propagation. *Appl Environ Microbiol* **1996**; 62(12):4614.
130. **Figura N.** *Campylobacter* spp. isolated from dog faeces. *Lancet* **1991**; 338:1403.
131. **Sandstedt K, Ursing J, Walder M.** Thermotolerant *Campylobacter* with no or weak catalase activity isolated from dogs. *Curr. Microbiol.* **1983**; 8:209–213
132. **Jones K et al.** *Campylobacters* in water, sewage and the environment . *J Appl Microbiol.* **2001**; 90:68-79
133. **Levin RE.** *Campylobacter jejuni*: A Review of its Characteristics, Pathogenicity, Ecology, Distribution, Subspecies Characterization and Molecular Methods of Detection. *Food Biotechnology*, **2007**; 21:271–347.
134. **Penner JL, Hennessy JN.** Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens. *J Clin Microbiol.* **1980**; **12**:732-737
135. **Frost JA. Oza AN, Thwaites R T, Rowe B** .Serotyping Scheme for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Based on Direct Agglutination of Heat-Stable Antigens. *J Clin Microbiol.* **1998**; 335–339
136. **Lior H, Woodward DL, Edgar J A, Laroche LJ, Gill P.** Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. *J Clin Microbiol.* **1982**; **15**:761-768.
137. **Wassenaar T, Newell D.** Genotyping of *Campylobacter* spp. *Appl Environ Microbiol.* **2000**; 66:1-9
138. **Grajewski B A, Kusek J W, Gelfand H M.** Development of a bacteriophage typing system for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* *J Clin Microbiol.* **1985**; 22(1):13-18

139. **Salama S, Bolton FJ, Hutchinson DN.** Evaluation of methods for the enumeration of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* bacteriophages. *Letters in Appl Microbiol.* **1990**; 10:193
140. **Khakhria R, Lior H.** Extended phage-typing scheme for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Epidemiol Infect.* **1992**; 108:403-414
141. **Wittwer M, Keller J, Wassenaar TM.** Genetic Diversity and Antibiotic Resistance Patterns in a *Campylobacter* Population Isolated from Poultry Farms in Switzerland. *Appl Environ Microbiol.* **2005**; 1:2840–2847
142. **Sung Sik Jang HK et al.** Prevalence, genetic diversity, and antibiotic resistance patterns of *Campylobacter jejuni* from retail raw chickens in Korea. *Int J food microbiol.* **2007**; 114:50-59
143. **On SLW, Nielsen EM, Engberg J, Madsen M.** Validity of *Sma*I-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *Sal*II, *Kpn*II, and *Bam*HI polymorphisms: evidence of identical clones infecting humans, poultry, and cattle. *S. Epidemiol. Infect.* **1998**; 120:231-237
144. **Dingle KE, Colles FM, Wareing DRA, Ure R, Fox AJ, Bolton FE et al.** **Multilocus Sequence Typing System for *Campylobacter jejuni*.** *J. Clin. Microbol* 2001; **39**:14-23.
145. **Lindstedt BA, Heir E, Vardund T, Melby KK, Kapperud G.** Comparative Fingerprinting Analysis of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* Strains by Amplified-Fragment Length Polymorphism Genotyping. *J. Clin. Microbol* **2000**; 38:3379-3387.
146. **Champion OL, Best EL, Frost JA.** Comparison of pulsedfield gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism techniques for investigating outbreaks of enteritis due to *Campylobacters*. *J. Clin Microbiol.* **2002**; 40:2263–2265.
147. **Schouls L M., Reulen S, Duim B, et al.** Comparative Genotyping of *Campylobacter jejuni* by Amplified Fragment Length Polymorphism, Multilocus Sequence Typing, and Short Repeat Sequencing: Strain Diversity, Host Range, and Recombination. *J. Clin. Microbol* **2003**; 1:15–26
148. **Ono K, Kurazono T, Niwa H, Itoh K.** Comparison of Three Methods for Epidemiological Typing of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Current Microbiology* **2003**; 47:364–371
149. **Meinersmann R J, Helsel LO, Fields P I, Hiett KL.** Discrimination of *Campylobacter jejuni* isolates by *fla* gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.* **1997**; 35:2810–2814
150. **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.* **2000**; 38:1940–1946.
151. **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* **2006**; 8
152. **Olesen B, Neimann J, Bottiger B, et al.** Etiology of Diarrhea in Young Children in Denmark: a Case-Control Stud. *J Clin Microbiol.* **2005**; 8:3636–3641
153. **Klein EJ, 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.* **2006**; 43:807–813
154. **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.* **2004**; 12 (4): 239-44.
155. **Lopez L, Castillo FJ, Clavel A, Rubio M C.** Use of a Selective Medium and a Membrane Filter Method for Isolation of *Campylobacter* Species from Spanish Paediatric Patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **1998**; 17:489–492

156. **Cabrita J, Pires I, Vlaes L, et al.** Campylobacter Enteritis in Portugal: Epidemiological Features and Biological Markers. *Eur J Epidemiol.* **1992**; 8(1): 22-26
157. **Wardak S, Duda U, Szych J.** Epidemiological analysis of campylobacteriosis reported by Sanitary Epidemiological Station in Bielsko-Biala, Silesia, in Poland. *Przegl Epidemiol.* **2007** ; 61 (2):417-24
158. **Haq JA, Rahman KM.** Campylobacter jejuni as a cause of acute diarrhoea in children: a study at an urban hospital in Bangladesh. *J Trop Med Hyg.* **1991**; 94(1):50-54.
159. **Ali AM, A, Qureshi H, Rafi S, Roshan E, Khan I, Malik AM, Shahid S.** A Frequency of Campylobacter Jejuni in Diarrhoea/Dysentery in Children in Rawalpindi and Islamabad. *J Pak Med Assoc.* **2003**; 53:11.
160. **Koulla-Shiro S, Loe C, Ekoe T.** Prevalence of Campylobacter enteritis in children from Yaounde (Cameroon). *Cent Afr J Med.* **1995**; 41(3):91-4.
161. **Abu Elamreen FH, Abed AA, Fadel A.** Sharif Detection and identification of bacterial enteropathogens by polymerase chain reaction and conventional techniques in childhood acute gastroenteritis in Gaza, Palestine. *Int Soc Infect. Dis.* **2007**
162. **Öngen B, Nazik. H, Kaya I.** Rutin dışkı kültürlerinde üretilen Campylobacter türleri ve Antibiyotik Duyarlılıkları: 5 Yıllık Sonuçların Değerlendirilmesi. *Ankem dergisi* **2007**; 21(1): 37-41
163. **Taş E, Ardiç N.** Akut Gastroenteritli Olgularda Termofilik Campylobacter, Escherichia coli O157:H7 ve Rotavirus Sıklığı. *Klinik Dergisi* **2004**; 17(3):186-190
164. **Yılmaz A, Tuğrul M** Edirne’de İshal Etkenleri arasında Campylobacter türlerinin yerinin ve antimikrobiklere duyarlılıklarının araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)* 2005; 19 (1):53-59
165. **Aspinall ST, Wareing DRA, Hayward PG, Hutchinson DN.** A comparison of a new campylobacter selective medium (CAT) with membrane filtration for the isolation of thermophilic campylobacters including Campylobacter upsaliensis. *Journal of Applied Microbiology* 1996; 80(6):645-650
166. **Endtz H P, et al.** Comparison of Six Media, Including a Semisolid Agar, for the Isolation of Various Campylobacter Species from Stool Specimens. *J Clin Microbiol* **1991**; 5:1007-1010
167. **Enberg J, et al.** Prevalence of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, and *Sutterella* spp. in Human Fecal Samples as Estimated by a Reevaluation of Isolation Methods for Campylobacters *J Clin Microbiol* 2000; 1:286–291
168. **Byrne C, Doherty D,** Basis of the Superiority of Cefoperazone Amphotericin Teicoplanin for Isolating *Campylobacter upsaliensis* from Stools. *J Clin Microbol* **2001**; 39:2713–2716
169. **Debruyne L, Samyn E, De Brandt E, Vandenberg O, Heyndrickx M, Vandamme P.** Comparative performance of different PCR assays for the identification of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli. *Res Microbiol.* **2008** ; 159(2):88-93
170. **Steinhausserova I, et al.** Identification of thermophilic Campylobacter spp. by phenotypic and molecular methods. *J Appl. Microbiol.* **2001**; 90:470-475
171. **Smith KE, Bender JB, Osterholm MT.** Antimicrobial resistance in animals and relevance to human infections. In Campylobacter ed. Nachamkin, I. and Blaser, M.J. Washington: ASM Press. 2000:483-495.
172. **On S LW.** Identification methods for campylobacters, helicobacters and related organisms. *Clin Microbiol Rev.* **1996**; 9:405-422.

173. **Kolackova I, Karpiskova R.** Species level identification of thermotolerant *Campylobacters* *Vet. Med. Czech*, **2005**; 50 (12):543–547

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : Esra Polat  
**Doğum Tarih ve Yeri** : 19.03.1974  
**Medeni Durumu** : Evli  
**Adres** : Güzelyalı mah. 40.sok. Sun 2 apt.Kat:2 No: 4  
Seyhan/ADANA  
**Telefon** : 0322 232 68 09  
**Faks** :  
**E.posta** : dresrapolat@yahoo.com.  
**Mezun Olduğu Tıp Fakültesi** : Çukurova Üniversitesi  
**Varsa Mezuniyet Derecesi** : İyi  
**Görev Yerleri** : Sivas Doğum Evi ve Çocuk Bakım Hastanesi.  
Bursa Ataevler Sağlık Ocağı  
**Dernek Üyelikleri** : Yok.  
**Alınan Burslar** : Yok.  
**Yabancı Dil(ler)** : İngilizce.  
**Diğer Hususlar** :