



KÜTAHYA İLİNDE TİCARİ OLARAK TÜKETİME SUNULAN ÇEŞİTLİ GIDA  
ÜRÜNLERİNDE *ARCOBACTER* TÜRLERİNİN m-PCR İLE SAPTANMASI VE BİYOFİLM  
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Elif DİZDAROĞLU İNCE  
Yüksek Lisans Tezi  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Mayıs - 2016

KÜTAHYA İLİNDE TİCARİ OLARAK TÜKETİME SUNULAN ÇEŞİTLİ GIDA  
ÜRÜNLERİNDE *ARCOBACTER* TÜRLERİNİN m-PCR İLE SAPTANMASI VE BİYOFİLM  
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Elif DİZDAROĞLU İNCE

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

Danışman: Doç. Dr. Tuba İÇA

Mayıs-2016

**KABUL VE ONAY SAYFASI**

Elif DİZDAROĞLU İNCE'nin YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı 'Kütahya İlinde Ticari Olarak Tüketime Sunulan Çeşitli Gıda Ürünlerinde *Arcobacter* Türlerinin m-PCR ile Saptanması ve Biyofilm Özelliklerinin Belirlenmesi' başlıklı bu çalışma, jürimizce Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınavı Yönetmeliğinin İlgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

11/05/2016

Üye: Doç. Dr. Tuba İÇA

Üye: Doç. Dr. Aynur GÜLCAN

Üye: Doç. Dr. Esra ŞEKER

Fen Bilimleri Enstitüsün Yönetim Kurulu'nun ...../...../..... gün ve .....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasan GÖÇMEZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

Bu tezin hazırlanmasında Akademik kurallara riayet ettiğimizi, özgün bir çalışma olduğunu ve yapılan tez çalışmasının bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olduğunu, çalışma kapsamında teze ait olmayan veriler için kaynak gösterildiğini ve kaynaklar dizininde belirtildiğini, Yüksek Öğretim Kurulu tarafından kullanılmak üzere önerilen ve Dumlupınar Üniversitesi tarafından kullanılan İntihal Programı ile tarandığını ve benzerlik oranının %13 çıktığını beyan ederiz. Aykırı bir durum ortaya çıktığı takdirde tüm hukuki sonuçlara razı olduğumuzu taahhüt ederiz.

Doç. Dr. Tuba İÇA

İmzası

Elif DİZDAROĞLU İNCE

İmza

# KÜTAHYA İLİNDE TİCARİ OLARAK TÜKETİME SUNULAN ÇEŞİTLİ GIDA ÜRÜNLERİNDE *ARCOBACTER* TÜRLERİNİN m-PCR İLE SAPTANMASI VE BİYOFİLM ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Elif DİZDAROĞLU İNCE

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2016

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Tuba İÇA

## ÖZET

Bu çalışmada, Kütahya ilinde ticari olarak tüketime sunulan çeşitli gıda ürünlerinde *Arcobacter* spp. taşıyıcılığı, antibiyotik duyarlılıkları ve biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesi amaçlandı. Bu kapsamda, 35 adet kıyma, 35 adet tavuk eti, 35 adet peynir ve 10 adet su örneği incelendi.

Yapılan çalışma sonucunda, tavukta ve suda, sırası ile 6 (%17.1) ve 1 (%10) adet *Arcobacter* spp. identifiye edildi. Tavuk ve suda identifiye edilen *Arcobacter* spp.'lerin 6 (%17.1)'sının *Arcobacter butzleri* ve tavukta identifiye edilen *Arcobacter* spp.'lerin 1 (%10)'ünün *Arcobacter cryaerophilus* olduğu konvansiyonel ve moleküler yöntemler kullanılarak tespit edildi.

*Arcobacter* suşlarının tamamı streptomisin, gentamisin ve tetrasikline karşı duyarlı, eritromisine ise orta duyarlı bulundu. *Arcobacter* suşları siproflaksasine, sefalotine ve ampisiline sırasıyla %71.4, %71.4 ve % 28.5 oranında dirençli bulundu.

Yedi adet *Arcobacter* suşunun aerobik ve mikroaerofilik olarak farklı konsantrasyonlarda biyofilm oluşturma kapasiteleri incelendi. Suşlar, **aerobik** olarak, 0.07 başlangıç konsantrasyonunda zayıf biyofilm şekillendirdi. Konsantrasyonun arttırılması (0.15) aerobik koşullarda biyofilm oluşumu üzerine sadece bir adet suşta olumlu etki gösterdi. Suşlar **mikroaerofilik** olarak, 0.07 başlangıç konsantrasyonunda da zayıf biyofilm şekillendirdi. Konsantrasyonun arttırılması (0.15) ile mikroaerofilik koşullarda 3 suşun biyofilm oluşumu zayıftan ortaya, 2 suşun ki ise zayıftan güçlüye dönüştü.

**Anahtar kelimeler:** Antibiyotik direnci, Biyofilm oluşumu, *Arcobacter* spp.

**DETECTION OF *ARCOBACTER* SPECIES FROM VARIOUS RETAIL FOOD  
PRODUCTS WITH m-PCR AND DETERMINATION OF BIOFILM PRODUCING-  
ABILITIES IN PROVINCE OF KÜTAHYA**

Elif DİZDAROĞLU İNCE

Department of Biology, Master Thesis, 2016

Thesis Adviser: Assoc. Prof. Dr. Tuba İÇA

**SUMMARY**

In this study, it is intended to determine existence of *Arcobacter* spp. in various commercial food products along with their sensitivity to antibiotics and their abilities for biofilm formation. For this purpose, 35 ground meat samples, 35 chicken meat samples, 35 cheese samples and 10 water samples have been analyzed.

As a result of this study, 6 (17.1 %) and 1 (10 %) *Arcobacter* spp. was identified from chicken and water samples, respectively. Six identified *Arcobacter* spp. (17.1 %) from chicken and water samples were typed as *Arcobacter butzleri* and one *Arcobacter* spp. (10 %) from chicken samples were typed as *Arcobacter cryaerophilus* with conventional and molecular methods.

All of *Arcobacter* strains were found to be sensitive to streptomycin, gentamycin and tetracycline and intermediate sensitive to erythromycin. *Arcobacter* strain found to be resistant to ciprofloxacin, cefazolin and ampicillin at the rate of 71.4 %, of 71.4 %, and 28.5 % respectively.

Seven *Arcobacter* strains were investigated according to the capacity of biofilm formation under aerobic and microaerophilic conditions in different concentrations. Strains have formed weak biofilm formation in beginning concentration of 0.07 under **aerobic condition**. Increasing concentration to 0.15 has made positive effect in only one strain for development of biofilm under this condition. Strains have also formed weak biofilm formation in beginning concentration of 0.07 under **microaerophilic condition**. Increasing the concentration to 0.15 under this condition, 3 strains biofilm formation turn out from weak to medium and 2 strain from weak to strong.

**Key words :** Antibiotic resistance, Biofilm formation, *Arcobacter* spp.

## TEŞEKKÜR

Tez konusunun seçiminde ve çalışmamın tüm aşamalarında üstün bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, her konuda ilgi ve desteğini gördüğüm danışman hocam Sayın Doç. Dr. Tuba İÇA'ya çok teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde büyük emekleri olan, sevgilerini, desteklerini her zaman yanımda hissettiğim annem Zehra DİZDAROĞLU'na, babam Mehmet Salih DİZDAROĞLU'na ve her zaman yanımda olan ablama ve kardeşime çok teşekkür ederim,

Beni kızları olarak kabul edip, sevgilerini, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen annem Umahan İNCE'ye, babam Zeki İNCE'ye ve her zaman yanımda olan ablama ve yeğenime çok teşekkür ederim.

Yoğun çalışmalarım sırasında sabır ve hoşgörü gösteren, büyük fedakârlıklara katlanarak bana her zaman destek olan çok değerli eşim Süleyman Hidayet İNCE'ye ve çalışmam boyunca ihmal ettiğim biricik oğlum Emir Berk İNCE'ye çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım süresince desteğini ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Zeynep ÇAKIR'a ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

|                                                     |     |
|-----------------------------------------------------|-----|
| ÖZET .....                                          | v   |
| SUMMARY .....                                       | vi  |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                             | vi  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                | vii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....                 | vii |
| 1. GİRİŞ .....                                      | 1   |
| 1.1 <i>Arcobacter</i> 'lerin Genel Özellikleri..... | 2   |
| 1.2. Taksonomi .....                                | 4   |
| 1.3 <i>Arcobacter</i> Türleri.....                  | 6   |
| 1.3.1 <i>Arcobacter butzleri</i> .....              | 6   |
| 1.3.2. <i>Arcobacter cryaerophilus</i> .....        | 7   |
| 1.3.3. <i>Arcobacter skirrowii</i> .....            | 8   |
| 1.3.4. <i>Arcobacter nitrofigilis</i> .....         | 8   |
| 1.3.5. <i>Arcobacter halophilus</i> .....           | 9   |
| 1.3.6. <i>Arcobacter cibarius</i> .....             | 9   |
| 1.3.7. <i>Arcobacter mytili</i> .....               | 100 |
| 1.3.8. <i>Arcobacter thereius</i> .....             | 111 |
| 1.3.9. <i>Arcobacter trophiarum</i> .....           | 12  |
| 1.3.10. <i>Arcobacter marinus</i> .....             | 122 |
| 1.3.11. <i>Arcobacter defluvii</i> .....            | 133 |
| 1.3.12. <i>Arcobacter bivalviorum</i> .....         | 133 |
| 1.3.13. <i>Arcobacter venerupis</i> .....           | 144 |
| 1.3.14. <i>Arcobacter ellisi</i> .....              | 144 |
| 1.3.15. <i>Arcobacter anaerophilus</i> .....        | 14  |
| 1.3.16. <i>Arcobacter cloacae</i> .....             | 155 |
| 1.3.17. <i>Arcobacter suis</i> .....                | 155 |
| 1.3.18. <i>Arcobacter molluscorum</i> .....         | 16  |
| 1.3.19. <i>Arcobacter ebronensis</i> .....          | 166 |
| 1.3.20. <i>Arcobacter aquimarinus</i> .....         | 166 |

## İÇİNDEKİLER (devam)

|                                                                       | <u>Sayfa</u> |
|-----------------------------------------------------------------------|--------------|
| 1.3.21. <i>Arcobacter lanthieri</i> .....                             | 177          |
| 1.3.22. <i>Arcobacter valdiviensis</i> .....                          | 177          |
| 1.4 Epidemiyoloji .....                                               | 178          |
| 1.4.1. İnsanlarda <i>Arcobacter</i> .....                             | 188          |
| 1.4.2. Hayvan, gıda, su ve çevre örneklerinde <i>Arcobacter</i> ..... | 199          |
| 1.4.3. Bulaşma yolları .....                                          | 22           |
| 1.4.4. Patogenez ve virülens faktörler .....                          | 23           |
| 1.4.4.1. Konak hücrede adezyon ve invazyon .....                      | 23           |
| 1.4.4.2. <i>Arcobacter</i> 'ler tarafından üretilen toksinler .....   | 24           |
| 1.4.4.3. Claudin ekspresyonu .....                                    | 24           |
| 1.4.4.4. Plasmidler.....                                              | 26           |
| 1.4.4.5. Biyofilm .....                                               | 27           |
| 1.5. Fiziksel ve Kimyasal Ajanlara Duyarlılık .....                   | 30           |
| 1.5.1. Dezenfektanlar .....                                           | 30           |
| 1.5.2. Antibiyotikler .....                                           | 331          |
| 1.5.2.1. Antibiyotik direnci .....                                    | 331          |
| 2. TEŞHİS .....                                                       | 34           |
| 2.1. İzolasyon .....                                                  | 34           |
| 2.2. İdentifikasyon.....                                              | 37           |
| 2.2.1. Fenotipik tanı .....                                           | 37           |
| 2.2.2 Moleküler tanı .....                                            | 37           |
| 2.2.2.1. PCR .....                                                    | 37           |
| 2.2.3. Genotiplendirme.....                                           | 39           |
| 3. MATERYAL .....                                                     | 41           |
| 3.1 Numuneler.....                                                    | 41           |
| 3.2 Besiyerleri .....                                                 | 41           |
| 3.3. Gram Boyamada Kullanılan Kimyasal Maddeler .....                 | 43           |
| 3.4. Antibiyogram Testi İçin Kullanılan Malzemeler .....              | 44           |
| 3.5. PCR Testi İçin Kullanılan Malzemeler .....                       | 44           |
| 3.6. Agaro Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Malzemeler.....          | 45           |

## İÇİNDEKİLER (devam)

|                                                                                         | <u>Sayfa</u> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 3.7. Primerler.....                                                                     | 45           |
| 3.8 Makine ve Teçhizat .....                                                            | 45           |
| 4. METOT .....                                                                          | 47           |
| 4.1. <i>Arcobacter</i> ’lerin İzolasyonu.....                                           | 47           |
| 4.2. Membran Filtrasyon Tekniği.....                                                    | 47           |
| 4.3. İzolatların Bakterioskopisi .....                                                  | 48           |
| 4.4. DNA Ekstraksiyonu .....                                                            | 48           |
| 4.5. Multipleks PCR ile Tür Tayini.....                                                 | 49           |
| 4.6. Agaroz Jel Elektroforezi.....                                                      | 49           |
| 4.7. Antibiyogram Testi.....                                                            | 49           |
| 4.8. Biyofilm .....                                                                     | 50           |
| 5.BULGULAR.....                                                                         | 51           |
| 5.1 <i>Arcobacter</i> Türlerinin İzolasyonu ve Tanımlanması.....                        | 51           |
| 5.2. Bakterioskopi Sonuçları .....                                                      | 51           |
| 5.3 <i>Arcobacter</i> Şüpheli Bakterilerin Cins ve Tür Düzeyinde Moleküler Tanısı ..... | 53           |
| 5.4 Antibiyotik Test Sonuçları .....                                                    | 54           |
| 5.5. Biyofilm Test Sonuçları .....                                                      | 55           |
| 6. TARTIŞMA VE SONUÇ .....                                                              | 58           |
| KAYNAKLAR DİZİNİ .....                                                                  | 63           |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

| <b><u>Çizelge</u></b>                                                                                               | <b><u>Sayfa</u></b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 1.1. <i>Arcobacter</i> ’lerin bilimsel sınıflandırılması .....                                                      | 5                   |
| 1.2. <i>Arcobacter</i> cinsinde yer alan türler, izole edildikleri ortamlar ve ilişkili oldukları hastalıklar ..... | 20                  |
| 2.1. <i>Arcobacter</i> türlerinin izolasyonu.....                                                                   | 36                  |
| 2.2. <i>Arcobacter</i> cinsinde yer alan türlerin fenotipik özellikleri .....                                       | 37                  |
| 2.3. <i>Arcobacter</i> spp. izolatların tanımlanması için kullanılan genotipleme yöntemleri.....                    | 40                  |
| 3.1. Toplanan su örneklerinin lokasyonları sayıları ve örnekleme zamanları.....                                     | 41                  |
| 3.2. Primerlerin baz dizilimleri .....                                                                              | 45                  |
| 5.1. m-PCR ile pozitif oldukları saptanan <i>Arcobacter</i> türleri .....                                           | 52                  |
| 5.2. Elde edilen <i>Arcobacter</i> türlerinin prevalansı (%) .....                                                  | 53                  |
| 5.3. Elde edilen <i>Arcobacter</i> izolatlarının zon çapları (mm).....                                              | 54                  |
| 5.4. Biyofilm oluşumunun mikrotitrasyon plağı yöntemiyle değerlendirilmesi. ....                                    | 55                  |
| 5.5. Biyofilm oluşumunda meydana gelen artışın grafiksel gösterimi.....                                             | 56                  |
| 5.6. Tavuk ve su örneklerinden identifiye edilen 7 adet <i>Arcobacter</i> izolatının biyofilm sonuçları.....        | 57                  |
| 6.1. Türkiye’deki çeşitli gıda ürünlerinde <i>Arcobacter</i> spp. prevalansına ilişkin bazı çalışma sonuçları.....  | 59                  |
| 6.2. Dünya’ da çeşitli gıda ürünlerinde <i>Arcobacter</i> spp. Prevalansı ilişkin bazı çalışma sonuçları.....       | 60                  |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Sekil</u>                                                                                                                                                                                    | <u>Sayfa</u> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 1.1. <i>A.butzleri</i> 'nin 0.45 mikron gözenekli filtrede taramalı elektron mikroskobu görüntüsü.....                                                                                          | 2            |
| 1.2. <i>Arcobacter butzleri</i> 'nin elektron mikroskobunda görünümü.....                                                                                                                       | 6            |
| 1.3. <i>Arcobacter halophilus</i> hücrelerinin taramalı elektron mikroskobunda görünümü (a) ve Tek polar flagella gösteren <i>A. halophilus</i> hücrelerinin negatif boyanmış görünümü (b)..... | 9            |
| 1.4. LMG 21996T suşunun transmisyon elektron mikrografında görünümü.....                                                                                                                        | 10           |
| 1.5. F2075T suşuna ait hücrelerin taramalı elektron mikroskobunda görünümü (a) ve transmisyon elektron mikroskobunda negatif boyalı görünümü (b) .....                                          | 11           |
| 1.6. LMG24486T suşuna ait hücrelerin taramalı elektron mikrografisinde görünümü. ....                                                                                                           | 11           |
| 1.7. 64T Suşuna ait hücrelerin taramalı elektron mikrografisinde görünümü.....                                                                                                                  | 12           |
| 1.8. CL-S1 <sup>T</sup> suşuna ait negatif boyalı hücrelerin transmisyon elektron mikrografisinde görünümü .....                                                                                | 13           |
| 1.9. İntestinal epitel hücrelerinde ve farklı hücre hatlarında <i>Arcobacter</i> 'lerin virülans mekanizmaları.....                                                                             | 25           |
| 4.1. Steril stomacher poşedinde bulunan gıda örneği (a), Gaspack içerisinde yerleştirilmiş sıvı örnekler(b).....                                                                                | 47           |
| 4.2. Kanlı agara yerleştirilen selüloz memebran filtreler .....                                                                                                                                 | 48           |
| 5.1. <i>Arcobacter butzleri</i> T7g suşunun kanlı agar üzerindeki görünümü. ....                                                                                                                | 51           |
| 5.2. Gram boyalı <i>Arcobacter</i> suşunun ışık mikroskobundaki görünümü.....                                                                                                                   | 51           |
| 5.3. <i>Arcobacter</i> spp. m-PCR sonucu elde edilen elektroforez bant görüntüsü.....                                                                                                           | 52           |
| 5.4. <i>Arcobacter</i> T19 suşunun çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılığı. ....                                                                                                              | 53           |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### **Simgeler**      **Açıklama**

|     |               |
|-----|---------------|
| °C  | Derece        |
| bp  | Baz çifti     |
| kbp | Kilobaz çifti |
| µm  | Mikrometre    |
| mm  | Milimetre     |
| nm  | Nanometre     |

### **Kısaltmalar**      **Açıklama**

|          |                                                            |
|----------|------------------------------------------------------------|
| AEB      | Arcobacter Enrichment Broth                                |
| AFLP     | Amplifiye parça uzunluk polimorfizm analizi                |
| Caco-2   | İnsan epitel kolorektal adenokarsinom                      |
| CAT      | Caphoperazone-Amphotericin-Teicoplanin                     |
| DNA      | Deoksiribonükleik asit                                     |
| ERIC-PCR | Tekrarlayan enterobakteriyel intergenik konsensüs- PCR     |
| EPS      | Ekstrasellüler polimerik madde                             |
| EUCAST   | European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing |
| HeLa     | Henrietta Lacks orijinli servikal kanser hücre kültürü     |
| HEp-2    | İnsan Epitel Hücreleri                                     |
| ICMSF    | Gıda Mikrobiyolojik Şartları Uluslararası Komisyonu        |
| JMEB     | Johnson-Murano Enrichment Broth                            |
| MHA      | Mueller Hinton Agar                                        |
| MHB      | Mueller Hinton Broth                                       |
| mCCDA    | Modifiye Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar           |
| MIC      | Minimal inhibisyon konsantrasyonu                          |

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**

| <b><u>Kısaltmalar</u></b> | <b><u>Açıklama</u></b>                      |
|---------------------------|---------------------------------------------|
| MLST                      | Multilokus dizi tiplendirme                 |
| m-PCR                     | Multipleks Polimeraz zincir reaksiyonu      |
| CLSI                      | Clinical and Laboratory Standards Institute |
| PCR                       | Polimeraz zincir reaksiyonu                 |
| RAPD                      | Rastgele amplifiye edilen polimorfik DNA    |
| RNA                       | Ribonükleik asit                            |
| rRNA                      | Ribozomal ribonükleik asit                  |
| TSA                       | Triptik Soy Agar                            |
| OD                        | Optik dansite                               |

## 1. GİRİŞ

*Arcobacter*'ler ilk defa 1977 yılında Ellis ve arkadaşları tarafından aborte sığır ve domuz fetuslarından izole edilmiştir. Benzer fenotip özelliklerine göre, *Arcobacter*'ler 1991 yılında ayrı bir cins olarak tanımlanincaya kadar kökensel olarak Campylobacteriaceae genusu içerisinde aerotolerant *Campylobacter*'ler olarak sınıflandırılmış olup *Campylobacter nitrofigilis*, *Campylobacter cryaerophyla* ve *Campylobacter butzleri* türleri *Arcobacter* cinsine dâhil edilmiştir. *Arcobacter*'lerin ilk izolasyonlarında mikroaerofilik ortam gerektirmelerine rağmen aerob ortamda da üreyebilmeleri, 15–30°C sıcaklıkları arasında gelişebilmeleri ve yağ asidi profillerinin farklı olmasından dolayı *Campylobacter*'lerden ayrıldıkları bildirilmiştir (Kayman 2012, Ellis, vd., 1977; Ertaş ve Doğruer, 2009; Van den Abeele vd., 2014).

Yakın zamanda izole edilen türler ile birlikte günümüzde *Arcobacter* cinsi; *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter nitrofigilis*, *Arcobacter skirrowii*, *Arcobacter cryaerophilus*, *Arcobacter cibarius*, *Arcobacter halophilus*, *Arcobacter mytili*, *Arcobacter thereius*, *Arcobacter marinus*, *Arcobacter trophiarum*, *Arcobacter defluvii*, *Arcobacter molluscorum*, *Arcobacter ellisii*, *Arcobacter bivalviorum*, *Arcobacter venerupis*, *Arcobacter anaerophilus*, *Arcobacter cloace*, *Arcobacter suis*, *Arcobacter ebronensis*, *Arcobacter aquimarinus*, *Arcobacter lanthieri*, *Arcobacter valdiviensis* olmak üzere toplam 22 tür içermektedir (Kayman, 2012; Sasi Jyothsna, vd., 2013; Levican, vd., 2013). Son zamanlarda Wirsén ve ark. (2002) tarafından, deniz kıyılarında sülfid oksitleyici ototrofik bakteriler olduğu ve bunların hidrofilik sülfür filamentleri ürettikleri tespit edilmiştir. Filogenetik inceleme sonucunda *Arcobacter* cinsi içerisinde yer aldıkları saptanan bu bakteri deniz izolatu olması sebebi ile “*Candidatus Arcobacter sulfidicus*” olarak isimlendirilmiştir (Lehner, vd., 2005).

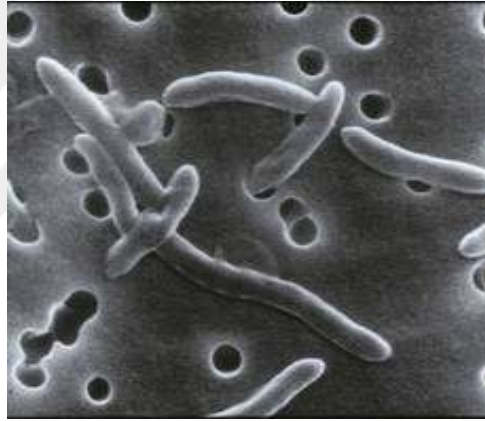
*A. butzleri*, *A. skirrowii* ve *A. cryaerophilus* türlerinin insanlarda gastroenterit veya bakteriyemiye, hayvanlarda ise gastroenterit ve abortlara neden olduğu bildirilmiştir. Bir tuzlu bataklık bitkisinin köklerinde bulunan *Arcobacter nitrofigilis* ise, nitrojen tutucu bir bakteri olmasından dolayı insan ya da hayvan hastalıklarıyla ilişkilendirilmemiştir (Lucia, vd., 2004; McClung, vd., 1983; Vandamme, vd., 1992a; Aydın, vd., 2007).

*Arcobacter* türlerinin hayvan kökenli kontamine gıdalara ve insan hastalıklarına neden olabilecekleri düşünüldüğünden gıda güvenliği konusunda ciddi bir potansiyel endişe olduğu öne sürülmektedir.

### 1.1. *Arcobacter*'lerin Genel Özellikleri

*Arcobacter*'ler *Campylobacter* ve *Helicobacter* türlerini içine alan Epsilonbacteria grubunun bir üyesidir. Patogen olan türleri arasında *A. butzleri* ve *A. cryaerophilus* yer almaktadır. Gram negatif, s-şeklinde, spor oluşturmeyen, 0.2-0.9 µm genişliğinde ve 1-3 µm uzunluğundadırlar. Tek polarlı flagella ile hareket sağlamaktadırlar (İrkin ve Korukluoğlu, 2008).

*Arcobacter* 'lerin koloni şekilleri ve renkleri türler arasında farklılık göstermektedir. *A. cryaerophilus* kolonileri sarı ve bej, *A. nitrofigilis* kolonileri beyaz, *A. butzleri* kolonileri beyaz-bej arası, *A. skirrowii* kolonileri ise gri renkte görülmektedirler. *Arcobacter* türlerinin çoğu nonhemolitiklidir. Ancak *A. skirrowii* suşlarının çoğu α hemoliz meydana getirmektedir (Savaşan ve Çiftci, 2003).



**Şekil 1.1.** *A. butzleri*'nin 0.45 mikron gözenekli filtrede taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (Manke ve Dickinson, 1996).

#### *Atmosfer*

*Arcobacter*'ler; *Helicobacter* ve *Campylobacter*'lerden farklı olarak aerobik ortamlarda üreyen mikroorganizmalardır. İlk izolasyonlarında türler arasında atmosferik gereksinimler bakımından farklılık vardır. *A. cryaerophilus* ilk izolasyonunda genellikle mikroaerofilik ortama ihtiyaç duyar. Diğer türler ise normal atmosferde üreyebilirler. Mikroaerofilik ortamda optimal üreme ısısı 37°C'dir, anaerobik ortamda üreme ise 35-37°C'de meydana gelmektedir (Ertaş, 2009).

### *Sıcaklık*

*Arcobacter*'lerin üremeleri için 15°C ile 37°C arasındaki sıcaklıkların uygun olduğu bildirilmiştir. Üremeleri için en düşük sıcaklık limitinin 5°C, optimal sıcaklığın ise inkübasyon koşullarına bağlı olduğu saptanmıştır. *Arcobacter* türleri *Campylobacter* türleri ile karşılaştırıldığında; optimal olarak 30°C'de atmosferik oksijen varlığında üreyebilmeleri ve 15°C'de gelişebilmeleri en tipik ayırıcı niteliklerdir. Ayrıca termofilik patojenik *Campylobacter*'lerin aksine *Arcobacter*'ler 42°C'de üreyebilirler (Ertaş, 2009; Doksanüçöğlü, 2006).

Vandamme ve arkadaşları (1992a) tarafından yapılan bir çalışmada, soğğun *Arcobacter*ler üzerine etkisi araştırılmıştır. 4°C'de hücrelerin durağan fazda muhafazası ile bakterilerin yoğunluğunun kademeli olarak 21 günde azaldığı tespit edilmiştir. Dondurma işleminde ise bakterilerin ilk 24 saat yaşama yeteneklerinin biraz azaldığı daha sonra ise sabit kaldığı bildirilmiştir (Lehner, vd., 2005; Doksanüçöğlü, 2006).

### *pH*

*Arcobacter* türlerinde üreme için gerekli olan optimal pH değerleri 5.5-9.5'tir. Fakat bunun yanında inkübasyon sıcaklığında önem taşımaktadır. Örneğin bu mikroorganizmalar 30°C'de pH 5'de üreyebilmelerine rağmen 37°C'de bu pH'da üreme göstermezler (Ertaş, 2009).

### *Nisin*

Etken nisine duyarlıdır. *Lactococcus lactis subs. lactis* tarafından üretilen bir bakteriyosin olan nisin özellikle gram pozitif bakterilere etkilidir. Ancak gram negatif bakterilerde 6.5°C ve altındaki sıcaklıklara duyarlıdır. Nisin *Arcobacter*'lere karşı geniş bir spekturuma sahiptir. Yine et ürünlerinde antimikrobiyal olarak kullanılan sodyum laktat, sitrik asit ve laktik asit tuzları gibi organik asitler ve onların tuzları da *Arcobacter* üzerinde inhibe edici özelliğe sahiptir. Sodyum laktat tek başına ya da nisin ile birlikte kullanıldığında *Arcobacter*'lerin gelişimini engelleyici bir etki göstermektedir (Ertaş, 2009).

### *Klor*

İçme suyunda bulunan *Arcobacter* türlerinin dezenfeksiyonu hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Rice ve ark.(1999) yaptıkları inaktivasyon deneyleri sonucunda *A.butzleri*'nin klora karşı duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir. Bu bulguların *Campylobacter jejuni* ve *Helicobacter pylori* ile benzerlik gösterdiğini ve normalde içme suyu dezenfeksiyonu için

kullanılan klor uygulamalarının, bu organizmaların kontrolünde de yeterli olduğunu saptamışlardır. Bununla birlikte, bir salgın durumunda, infeksiyöz ajanların kontamine su kaynakları içerisinde yayılmasına engel oluşturuncaya kadar klorla dezenfeksiyon işleminin devam ettirilmesi gerektiğini vurgulamışlardır (Rice, vd., 1999).

Yapılan bir araştırmada da klordioksit ile dezenfeksiyon işlemi sonucunda atık su içerisinde bulunan *A.cryaerophilus*' un % 97-98 oranında indirildiği bildirilmiştir (Stampi, vd., 1993).

### *Oksijen*

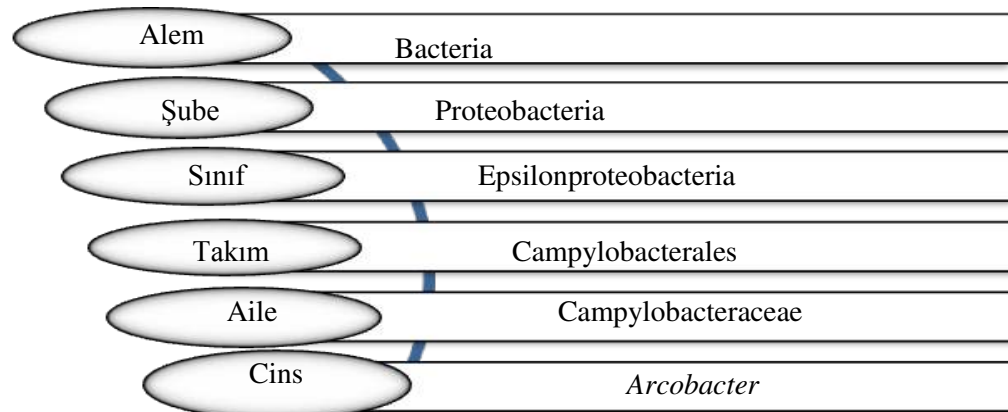
Stampi ve ark. (1993), İtalya'da yaptıkları bir çalışmada, almış oldukları işlem görmemiş atık su örneklerinin tamamında, saf oksijen uygulanan örneklerin ise % 67'sinde *A. cryaerophilus* saptamışlardır ve buna dayanarak da, her ne kadar aerotolerant olsalar da, bu mikroorganizmaların özellikle ilk izolasyon için mikroaerofilik bir ortam gerektirdiklerini, dolayısıyla saf oksijen uygulamasına termofilik *Campylobacter*'ler kadar olmasa da duyarlılık gösterdiklerini öne sürmüşlerdir (Stampi, vd., 1993; Doksanüçöğlü, 2006).

## **1.2. Taksonomi**

*Arcobacter* türü olarak kabul edilecek olan bir mikroorganizmanın bilinen ilk izolasyonu, Ellis ve arkadaşları tarafından 1977 yılında sığır ve domuz fetusunda spirillum benzeri organizmaların tanımlanmasıyla yapılmıştır (Ellis, 1977, 1978; Ferreira, vd., 2015). Bu organizmalar ilk izolasyonda mikroaerobik ortamda, daha sonra yapılan pasajlarında atmosferik oksijende ve 15°C'de üreyebilme yeteneğine sahiptiler. Benzer hareket ve morfoloji göstermelerine rağmen daha yüksek oksijen konsantrasyonuna ve daha düşük sıcaklıklara toleranslı olmalarıyla *Campylobacter* türlerinden ayrılmışlar ve aerotolerant *Campylobacter*'ler olarak tanımlanmışlardır. 1983 yılında, aerotolerant *Campylobacter nitrofigilis*, *Spartina alterniflora* adlı bitkinin köklerinde ve kök ilişkili sedimentlerde tanımlanmıştır. (McClung, vd., 1983; Ferreira, vd., 2015). İki yıl sonra, Neill ve ark. (1985) çoğunlukla hayvan abortlarından izole edilen aerotolerant suşlar tanımlamışlar ve *Campylobacter cryaerophila* adlı yeni bir tür önermişlerdir. Daha sonra, 1988 yılında, Kiehlbauch ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda *Campylobacter cryaerophila* ilk kez insan örneklerinde bildirilmiştir (Tee, vd., 1988). Çoğunluğu insan dışkıları olmakla beraber aynı zamanda hayvanlardan da izole edilen bir grup suş için ise *Campylobacter butzleri* adı önerilmiştir (Kiehlbauch, vd., 1991; Ferreira, vd., 2015).

Vandamme ve arkadaşları tarafından, 1991 yılında iki aerotolerant *Campylobacter* türü *Arcobacter* cinsi olarak tanımlanmıştır. *Campylobacter cryaerophila* (şimdi *Arcobacter cryaerophilus*) ve *Campylobacter nitrofigilis* (şimdi *Arcobacter nitrofigilis*). İlk tür farklı kökenlerden izole edilmiştir (dışkı, üreme yolları, çiftlik hayvanlarının aborte fetusu ve mastitisli ineklerin sütünden). İkinci tür ise bir tuzlu bataklık bitkisi olan *Spartina alterniflora*'nın (azot sabitleme bakterisi) kökleri ve kök ilişkili sedimentlerinden izole edilmiştir. Vandamme ve ark. (1992a) tarafından *Arcobacter skirrowii* türünün tanımlanması ve *Campylobacter butzleri*'nin *Arcobacter butzleri* olarak yeniden sınıflandırılması ile cins büyütülmüş ve değiştirilmiştir (Collado ve Figueras, 2011).

**Çizelge 1.1.** *Arcobacter*'lerin bilimsel sınıflandırılması.



O tarihten bu yana farklı ortamlardan birçok yeni tür tanımlanmıştır. *Arcobacter halophilus* hypersaline lagününden (Donachie, vd., 2005), *Arcobacter cibarius* tavuk karkaslarından (Houf, vd., 2005), *Arcobacter thereius* ördeklerin kloakından ve aborte domuz fetuslarının böbreklerinden (Houf, vd., 2009), *Arcobacter molluscorum* ve *Arcobacter mytili* kabuklu deniz ürünlerinden (Figueras, vd., 2011a, Collado, vd., 2009), *Arcobacter marinus* deniz yosunu denizyıldızları ve deniz suyundan oluşan bir karışımından (Kim, vd., 2010), *A. ellisii* midye ve yumuşakçalardan (Figueras, vd., 2011b), *A. bivalviorum* ve *A. venerupis* midye ve deniz tarağından (Levican, vd., 2012), *Arcobacter trophiarum* domuz dışkılarından (De Smet, vd., 2011), *Arcobacter defluvii* ve *Arcobacter cloacae* kanalizasyondan (Collado, vd., 2011; Levican, vd., 2013), *Arcobacter anaerophilus* ve *Arcobacter suis* yaban domuzu ve domuzdan (Sasi Jyothsna, vd., 2013; Levican, vd., 2013), *A. ebronensis* kabuklu deniz ürünlerinden, *A. aquimarinus* deniz suyundan (Levican, vd., 2015), *A. lanthieri* domuz ve süt sığır gübresinden (Whiteduck-Léveillé, vd., 2015), ve *A. valdiviensis* tavuk kloak sürüntü numunelerinden izole

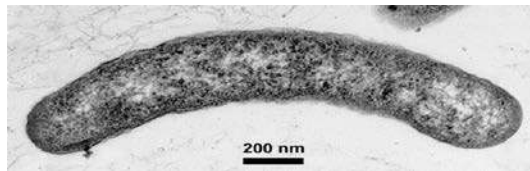
edilerek isimlendirilmiştir (Figueras ve Gonzalez, 2013; Kayman, 2012; Levican, vd., 2013; Sasi Jyothsna, vd., 2013).

Vandamme ve arkadaşları yaptıkları taksonomik çalışmaları sonunda *Campylobacter* leri Eubacteria grubuna bağlı Protobacteria sınıfındaki rRNA Süperfamilya VI içine dahil etmişlerdir. rRNA Süperfamilya VI üyeleri de kendi aralarında gösterdikleri filogenetik heterojeniteye göre üç rRNA homoloji grubuna ayrılmıştır. Birinci ve ikinci rRNA homoloji grubunu meydana getiren *Campylobacter* ve *Arcobacter* Campylobacteriaceae familyasına dahil edilirken üçüncü gruptaki *Helicobacter* bu familyaya dahil edilmemiştir (Vandamme, vd., 1991; Vandamme ve Goossens, 1992a; Ergüler, 2007).

### 1.3. *Arcobacter* Türleri

#### 1.3.1. *Arcobacter butzleri*

Önceleri aerotolerant *Campylobacter* olarak tanımlanan *C.butzleri* Vandamme ve ark. tarafından (1992a) *A.butzleri* olarak isimlendirilmiştir *A.butzleri* ilk kez 1986 yılında ishal hastalığı olan iki aylık rhesus maymunlarından izole edilmiştir. Bu çalışmada 8 izolat rapor edilmiştir. Araştırmacılar bu çalışmalarında *A.butzleri*'nin primat popülasyonunda endemik olarak seyrettiğini ve oluşturduğu infeksiyon ya da kolonizasyonun düşük insidanslı olduğunu belirlemişlerdir (Vandamme, vd., 1992b; Doksanüçoğlu, 2006).



**Şekil 1.2.** *Arcobacter butzleri*'nin elektron mikroskopunda görünümü.

*A.butzleri* gram negatif, hareketli, kıvrımlı ve çomak şekilli bakterilerdir. 0,2-0,4 x 1-3 µm boyutlarındadır. 15, 25, 30 ve 37°C'de mikroaerofilik ürerler. 42°C'de üremeleri değişkendir. Aerobik olarak 30°C'de ürerler. *A.butzleri* filtrasyon metodu ve Selektif *Arcobacter* medium kullanılarak izole edilebilir. Koloni morfolojisi, gram boyama, oksidaz ve katalaz aktiviteleri identifikasyonda öncelikle temel kabul edilmektedir. Kanlı agar da 3 gün inkubasyondan sonra yuvarlak, beyaz-bej, 2-4 mm çaplı koloniler oluşturmaktadır. *A.butzleri* çoğunlukla nonhemolitiktir. *A.butzleri* identifikasyonunda aerobik şartlarda üreme yeteneği,

zayıf katalaz aktivitesi, pozitif oksidaz, nitrat redüksiyonu, pozitif indoksil asetat, negatif hippurat hidrolizi kritik testlerdir (Lerner, vd., 1994; Savaşan ve Çiftci, 2003) .

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

Bu türe ait mikroorganizmaların çoğu diareli insan ve hayvan olmakla birlikte, aborte fetuslardan, insan kanından, su ve bataklıklardan izole edilmiştir. Yapılan çalışmalar *A.butzleri*'nin yaygın bir su bakterisi olduğunu göstermektedir (Jacob, vd., 1993; Al Rashid, vd., 2000). Hastalığın insanların, diğer primatların ve bazı çiftlik hayvanlarının kontamine sulara maruz kalması sonucunda ortaya çıktığı saptanmıştır. Ayrıca *A.butzleri* ile kontamine olan iyi pişirilmemiş kanatlı ya da domuz ürünlerinin insanlarda hastalığa sebep olduğu tespit edilmiştir. Etkenin görüldüğü hastalarda enteritis, diare, abdominal kramplar, ateş, kusma gibi klinik belirtiler gözlenmiştir (Savaşan ve Çiftci, 2003)..

### 1.3.2. *Arcobacter cryaerophilus*

Latince “soğuk havayı seven” anlamına gelen (Vandamme, vd., 1991) *Arcobacter cryaerophilus*, hayvan dışkıları, çiftlik hayvanlarının aborte fetusları ve üreme yolları, mastitisli ineklerin sütleri ile insanlarda doku ve dışkılarından izole edilen bir türdür (Stampi, vd., 1993; Buller, 2014).

*A.cryaerophilus* ilk tanımlanan *Arcobacter* türü olduğu için başlangıçta aerotolerant *Campylobacter* olarak isimlendirilmiştir. Bu tür iki alt grup içermektedir: *A. cryaerophilus* alt grup 1 ve alt grup 2. Bu iki alt grup için DNA-DNA ve DNA-rRNA hibridizasyon çalışmaları yapılmış ve DNA baz kompozisyonlarının benzer olduğu belirlenmiştir. Her iki alt grubun protein profilleri ve yağ asidi kompozisyonlarıyla birbirlerinden ayrıldığı bildirilmiştir (Savaşan ve Çiftci, 2003).

Bu tür 0.5-3.0 µm boyutlarında ve helikal şekillidir; sahip olduğu tek polar flagella ile aktif şekilde hareket eder. DNA baz kompozisyonları %28-29 moldür. İlk izolasyonlarında mikroaerobik ortama ihtiyaç duymalarına rağmen aerobik ve anaerobik ortamlarda da üredikleri gözlenmiştir. Optimal üreme ısıları 30°C'dir, ancak bazı suşlarda 5-40°C'de üreme olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra bütün suşlar 15°C'de ürer ve katı besiyerinde 48-72 saatlik

inkübasyon sonunda küçük, yaygın, sarı ya da bej renkte koloniler meydana getirirler (Boudreau, vd., 1991; Neill, vd., 1985; Vandamme, vd., 1992c; Tazegül, 2010).

### 1.3.3. *Arcobacter skirrowii*

*Arcobacter skirrowii* ismini, *C.jejuni* türüne ait bakterilerin ishal insanlardan alınan dışkı örneklerinden izole edilmesinde kullanılan basit izolasyon tekniğini ve bu bakterilerin önemini ilk kez tanımlayan İngiliz mikrobiyolog M.B. Skirrow' dan almıştır. *Arcobacter skirrowii*, sağlıklı ya da klinik olarak hasta bazı çiftlik hayvanlarından izole edilebilen ve patojen olan üç *Arcobacter* türünden birisidir. Düşük yapmış sığır, domuz ve koyunların fetuslarından, diareli dışkılarından ve boğaların prepusyal yıkantı sıvılarından izole edilmiştir (Collins, vd., 1996; Suarez, vd., 1997; Vandamme, vd., 1992c; Savaşan ve Çiftci, 2003; Doksanüçoğlu, 2006).

*A. skirrowii* gram negatif, 1-3 µm uzunluğunda ve 0.2-0.4 µm genişliğinde helikal şekilli çomaklardır. DNA baz kompozisyonları %29-30 mol'dür. Kanlı agarda 3 gün inkübasyondan sonra 2-3 mm çapında, grimsi renkte düz ya da yassı ve düzensiz şekilli koloniler oluşturur. Türün bütün suşları kanlı agarda α hemoliz meydana getirirler (Savaşan ve Çiftci, 2003).

### 1.3.4. *Arcobacter nitrofigilis*

Latince “ (nitrojeni) nitrata fiske edebilme yeteneğinde olan” anlamını taşır (Vandamme, vd., 1991). 1980 yılında, bir tuzlu bataklık bitkisi olan *Spartina alterniflora*'nın köklerinden ve kök ilişkili sedimentlerinden izole edilen *Campylobacter* benzeri mikroorganizmalara *Campylobacter nitrofigilis* ismi verilmiştir. Daha sonra *Arcobacter* cinsinin tanımlanmasıyla söz konusu bakteri bu cins içerisinde değerlendirilmiş ve *Arcobacter nitrofigilis* adını almıştır. İnsan ve hayvanlarda bulunmayan ve patojen olmayan tek *Arcobacter* türüdür.

Diğer *Arcobacter*'lerin oluşturduğu koloniler bejden sarıya değişen renklerde ve düzensiz, nemli bir morfolojiye sahip iken bu türe ait mikroorganizmalar beyazımsı ve düzgün koloniler oluştururlar. Klasik fenotipik testlerden yararlanıldığında *A. nitrofigilis* tipik koloni morfolojisi ve nitrojenaz aktivitesi ile diğer *Arcobacter*'lerden ayrılmaktadır. Ayrıca *A. nitrofigilis*, *A. skirrowii* ve *A. cryaerophilus* 'tan % 1.5 NaCl varlığında üreme yeteneği ile ayrılmaktadır. rRNA Süperfamilya VI taksonu içinde nitrojeni metabolizmasında direkt olarak kullanabilen tek türdür. Genellikle kavisli ya da spiral şeklinde, 1-3 µm uzunluğunda ve 0.2-0.9 µm genişliğindedirler. Tek polar kılıfsız flagellumları ile hareket ederler. DNA baz

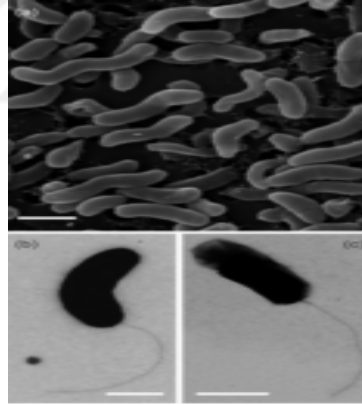
kompozisyon oranları G+C içeriği bakımından %28-31 mol'dür (McClung, vd., 1983; Doksanüçoğlu, 2006).

### 1.3.5. *Arcobacter halophilus*

Latince “ tuzu seven” anlamına gelen ve ilk zorunlu halofilik üye olan *Arcobacter halophilus* gram negatif, helikal şekilli ve 0.4-0.5 µm x 1.5-2.5µm boyutlarında bir *Arcobacter* türüdür. *Arcobacter halophilus*, %3.5 NaCl içeren %5'lik kanlı agarda 18-22°C'de mikroaerobik koşullar altında 72 saat inkübe edildikten sonra yaklaşık 1-2 mm çapında, tam beyaz olmayan, konveks ve düz kenarlı koloniler oluşturur.

Üreme, 37°C'de ve oda sıcaklığında aerobik ve mikroaerobik, 37°C'de anaerobik koşullar altında görülürken 42°C de mikroaerobik koşullar altında kan agarda üreme gözlenmez.

Tek polar flagellasıyla hareket eder. Oksidaz üretimi ve indoksil asetat hidrolizi gerçekleşir fakat hippurati hidroliz edemezler. Nitratı indirger katalaz üreaz, alkalın fosfataz veya DNAaz üretmezler (Donachie, vd., 2005).



**Şekil 1.3.** *Arcobacter halophilus* hücrelerinin taramalı elektron mikroskopunda görünümü (a) ve Tek polar flagella gösteren *A. halophilus* hücrelerinin negatif boyanmış görünümü (b) (Donachie, vd., 2005).

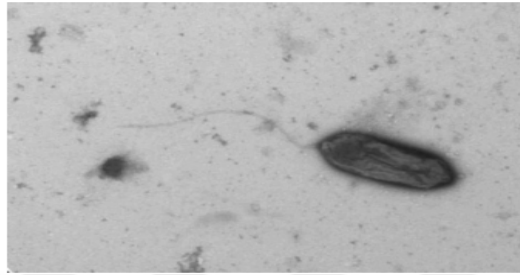
### 1.3.6. *Arcobacter cibarius*

Latince “gıda ile ilgili” anlamına gelen *Arcobacter cibarius* türü gram negatif, hafif kavisli, 1.5 µm uzunluğunda ve 0.5 µm genişliğinde olan çubuklar şeklindedir.

*Arcobacter cibarius* mikroaerobik koşullar altında 28°C'de 72 saat inkübe edildikten sonra, kanlı agar üzerinde çapı yaklaşık 2 µm beyaz, konveks, yayılmayan, düz kenarlı koloniler

oluşturur. Suşlar *Arcobacter* selektif agar üzerinde 1-2µm çapında, düz kenarlı, opak koloniler meydana getirirler.

Mikroaerobik koşullarda, 37°C'de ve oda sıcaklığında (18-22°C) üreme gözlenirken 42°C'de üreme gözlenmez. Anaerobik koşullar altında hem supplementsiz %5'lik kanlı agarda hemde %1 oranında trimetilamin N-oksit içeren kanlı agarda zayıfta olsa üreme meydana gelmiştir.



**Şekil 1.4.** LMG 21996T suşunun transmisyon elektron mikrofrafında görünümü.

Aerobik şartlarda 37°C'de üreme görülmezken, bazı suşlarda aerobik şartlarda 25°C'de üreme görülmüştür. Kanlı agarda hemoliz görülmez.

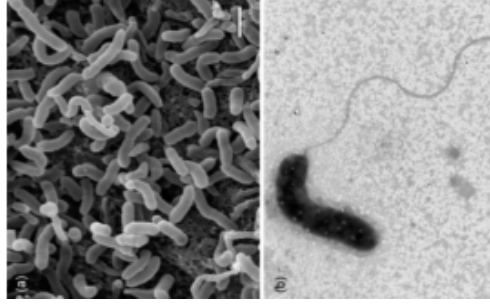
Suşlar oksidaz üretirler ve indoksil asetatı hidroliz ederler. Bazı suşlarda katalaz aktivitesi görülür. Alkalen fosfataz, üreaz, DNaz ve hippurikaz aktiviteleri belirlenmemiştir. Suşların MacConkey agarda üreme kabiliyetleri ise farklılık gösterir (Houf, vd., 2005).

### **1.3.7. *Arcobacter mytili***

*Arcobacter mytili* gram negatif, kapsül oluşturmeyen hafif kavisli, bazıları S şekilli olan, sporsuz, 0.4-0.6 µm genişliğinde ve 1-3 µm uzunluğunda bir *Arcobacter* türüdür. Tek polar flagellasıyla hareket ederler. Aerobik şartlarda 30°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra kanlı agarda çapı 2-4 µm olan, bej, dairesel, konveks ve yayılmayan koloniler meydana getirirler. Pigment üretilmez. Tüm suşların aerobik veya mikroaerobik kültür koşulları altında oda sıcaklığında (18-22°C) ve 30 ile 37 °C de kanlı agarda üremesinde önemli bir farklılık görülmektedir.

Suşlar aerobik koşullar altında, MacConkey agarı üzerinde 30°C'de ve % 2.0-4.0 NaCl içeren ortam üzerinde üreme gösterirler. Anaerobik ortamda 30°C'de ve aerobik ortamda 42°C'de az da olsa üreme gözlenirken, 4°C'de üreme gözlenmemiştir. Oksidaz üretimi

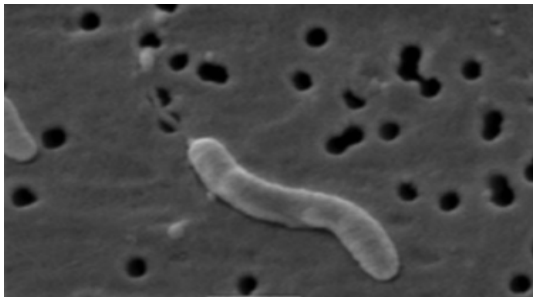
ve zayıfta olsa katalaz aktivitesi pozitifken indoksil asetat hidrolizi negatiftir. Suşlar hemolitik değildir. Nitrat indirgenmez ve üreaz üretilmez (Collado, vd., 2009).



**Şekil 1.5.** F2075T suşuna ait hücrelerin Taramalı elektron mikroskobunda görünümü (a) ve transmisyon elektron mikroskobunda negatif boyalı görünümü (b) (Collado, vd., 2009).

#### 1.3.8. *Arcobacter thereius*

*Arcobacter thereius* türü gram-negatif, 0,5 µm genişliğinde ve 2.5 µm uzunluğunda hafif kavisli hücrelere sahiptir. Mikroaerobik koşullar altında 28°C’de 72 saat inkübe edildikten sonra kanlı agar üzerinde yaklaşık 2 µm çapında, düzgün-yuvarlak, beyazımsı, yarı konveks ve yayılmayan koloniler oluşturur. *Arcobacter* selektif agar üzerinde 1-2µm çapında düzgün yuvarlak, opak, ve saydam formda koloniler meydana gelir. Mikroaerobik ortamda 30°C’de ve oda sıcaklığında (18-22°C) üreme gözlenirken, 37°C’de 3 gün inkübasyonda sonra üreme gözlenmemiştir. Nitrat indirgenirken selenit indirgenmez.



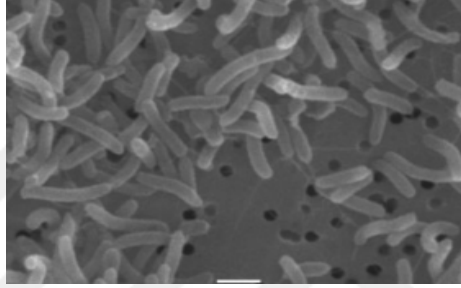
**Şekil 1.6.** LMG24486T (*A. thereius* sp. nov.) suşuna ait hücrelerin taramalı elektron mikrografisinde görünümü (Houf, vd., 2009).

Oksidaz ve katalaz üretimi ile indoksil asetat hidrolizi pozitifdir. Alkalen fosfataz, üreaz, DNaz ve hippurikaz faaliyetleri belirlenmemiştir. Hemoliz ve üreme, kanlı agar üzerinde 32 mg nalidiksik asit  $I^{-1}$  ihtiva eden suşa bağlıdır (Houf, vd., 2009).

### 1.3.9. *Arcobacter trophiarum*

*Arcobacter trophiarum* gram negatif, hafif kavisli 1.4-2.0µm x 0.3-0.5µm boyutlarında hücrelere sahip bir *Arcobacter* türüdür. Mikroaerobik koşullar altında 28°C’ de 48 saat inkübasyondan sonra kanlı agar üzerinde çapı yaklaşık 2µm olan, beyaz hafif, konveks, düzgün, yuvarlak, yayılmayan ve *Arcobacter* seçici agar üzerinde çapı yaklaşık 1-2µm olan, opak, düzgün-yuvarlak, yarı saydam koloniler oluştururlar.

Mikroaerobik ortamda, 30°C ve oda sıcaklığında (18-22°C) üreme gözlenirken, 37 veya 42°C’de üreme gözlenmez.



**Şekil 1.7.** 64T Suşuna ait hücrelerin taramalı elektron mikrofrafisinde görünümü (De Smet, vd., 2011).

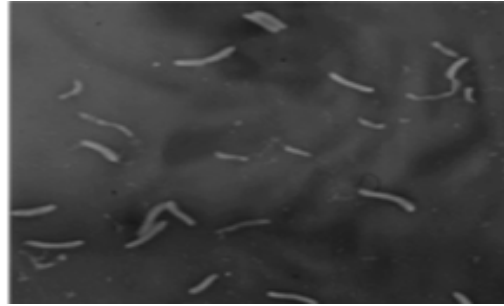
Aerobik şartlar altında 37°C üreme gözlenmez ancak kanlı agarda 25 ve 30°C’ de üreme gözlenmektedir. Oksidaz ve katalaz üretimi ile indoksil asetat hidrolizi pozitifdir. Nitrat indirgenmez. Üreaz aktivitesi bilinmemektedir. Kanlı agarda alfa hemoliz görülmez (De Smet, vd., 2011).

### 1.3.10. *Arcobacter marinus*

*Arcobacter marinus* hem aerobik hem de mikroaerobik şartlarda üreme gösteren bir türdür. Gram negatif, hafif kavisli, yaklaşık 0.5-1.7µm uzunluğunda ve 0.1-0.3µm genişliğinde hücrelere sahiptir. Tek polar flagellasıyla hareket eder. MacConkey Agar plakalarında 37°C’de 3 gün inkübasyonun sonunda, dairesel, konveks, kremi beyaz renkte ve yaklaşık 1mm çapında koloniler meydana getirirler. Koyun kanlı agar plaklarında ise 37°C’de 3 gün inkübasyonun sonunda, düzensiz, düğme şeklinde, gri ve yaklaşık 4mm çapında koloniler meydana getirirler.

Üreme, 10-40°C (optimum 30-37°C)’de ve 5.9-8.5 (optimum 7.0) pH aralığında gerçekleşir. Oksidaz üretilirken, katalaz, üreaz, alkalın fosfataz ve H<sub>2</sub>S üretilmez. Nitrat indirgenir. İndoksil

asteat hidrolizi pozitif iken hippurat negatiftir. Hemoliz görülmez (Kim, vd., 2010).



**Şekil 1.8.** CL-S1T suşuna ait negatif boyalı hücrelerin transmisyon elektron mikrografisinde görünümü (Kim, vd., 2010).

#### 1.3.11. *Arcobacter defluvii*

*Arcobacter defluvii* türü gram negatif, kapsülsüz, spor oluşturmeyen, 0.3-0.5 µm genişliğinde ve 1-2 µm uzunluğunda hafif kavisli çubuklar şeklinde hücrelere sahiptir. Tek polar flagellasıyla hareket ederler. Aerobik koşullar altında 30°C’ de 48 saat inkübe edildikten sonra kanlı agar üzerinde 2mm çapında, bej, dairesel, konveks ve yayılmayan koloniler meydana getirirler. Üreme kanlı agar üzerinde oda sıcaklığında (18-22°C) ve aerobik ortamda 30 ve 37°C’de gerçekleşir. Mikroaerobik koşullarda önemli bir farklılık görülmemektedir. Gerek anaerobik şartlarda 30°C’de gerekse aerobik şartlarda 42°C’de zayıfta olsa üreme meydana gelmiştir. %5 koyun kanı içeren TSA’da hemoliz görülmemiştir. Oksidaz üretimi ve İndoksil asetat hidrolizi pozitifdir. Zayıfta olsa katalaz aktivitesi görülmüştür. Kazein, lesitin veya nişasta hidrolizi negatiftir. Üre hidrolizi pozitifdir. Nitrat indirgenmiştir (Collado, vd., 2011).

#### 1.3.12. *Arcobacter bivalviorum*

*Arcobacter bivalviorum* türüne ait F4T, F118-2, F118-4 suşları, gram-negatif, hafif kavisli, kapsülsüz, spor oluşturmeyen, 0.3-0.5µm genişliğinde ve 0,9-2,0µm uzunluğunda hücrelere sahiptir. Tek polar flagellasıyla hareket ederler. Aerobik koşullar altında 30°C’de 48 saat inkübe edildikten sonra kanlı agar üzerinde 2-4 mm çapında, bej, dairesel, konveks ve yayılmayan koloniler meydana getirirler. Pigment üretilmez. Tüm suşlarda oda sıcaklığında (18-22°C), 30 ve 37°C’de kanlı agar üzerinde, hem aerobik hem de mikroaerobik koşullar altında 42°C’de üreme gözlenmiş, ayrıca anaerobik koşullar altında 30°C’de zayıfta olsa üreme meydana gelmiştir. %5 koyun kanı içeren TSA besiyerinde hemoliz görülmemektedir. Oksidaz

üretimi ve katalaz aktivitesi pozitifdir. İndoksil asetat hidrolizi pozitifken, kazein, lesitin veya nişasta hidrolizi negatiftir. Nitrat indirgenmez. Üreaz üretimi görülür (Levican, vd., 2012).

#### 1.3.13. *Arcobacter venerupis*

*Arcobacter venerupis* türüne ait F67-11T suşu, gram negatif, hafif kavisli, kapsülsüz, spor oluşturmayan, 0.3-0.6 m genişliğinde ve 0.9-2.2 m uzunluğunda hücrelere sahiptir. Tek polar flagellasıyla hareket eder. Aerobik koşullar altında 30°C'de 48-72 saat inkübe edildikten sonra kanlı agar üzerinde çapı 1-3mm olan, bej, yuvarlak, konveks ve yayılmayan koloniler meydana getirirler. Pigment üretilmez. Suşların üremesi kanlı agar üzerinde oda sıcaklığında (18-22°C), 30°C ve 37°C'de ya da 42°C'de mikroaerobik koşullar altında gerçekleşmiştir. Suşlar aerobik koşullar altında oda sıcaklığında (18-22°C) ve 30°C'de iyi, 37 ve 42°C'de zayıf üreme gösterirler. Anaerobik koşullar altında ise 30°C'de üreme gözlenmez. %5 koyun kanı içeren TSA besiyerinde hemoliz görülmemektedir. Oksidaz üretimi ile katalaz ve üreaz aktivitesi pozitifdir. Nitrat indirgenir. İndoksil asetat hidrolizi pozitifken, kazein, lesitin veya nişasta hidrolizi negatiftir (Levican, vd., 2012).

#### 1.3.14. *Arcobacter ellisi*

*Arcobacter ellisi* adını, aborte sığır fetuslarından spirillum/vibrio benzeri bir organizma olarak *Arcobacter*' in ilk üyelerini tanımlayan W. A. Ellis'den almıştır.

*Arcobacter ellisi* gram negatif, hafif kavisli, kapsülsüz, spor oluşturmayan, 0.3-0.9µm genişliğinde ve 1-1.8µm uzunluğunda hücrelere sahip bir *Arcobacter* türüdür. Bazı hücreler 7µm uzunluğuna varan ipliksi formlara sahiptir. Hareket tek polar flagella ile sağlanır. Aerobik koşullar altında 30°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra kanlı agar üzerinde çapı 2-4mm olan, bej, dairesel, konveks ve yayılmayan koloniler oluştururlar. Pigment üretilmez. Tüm suşlar oda sıcaklığında (18-22°C) kanlı agarda üreme gösterirler. Suşların mikroaerobik koşullar altında 30 ve 37°C'de üremesinde önemli farklılık görülmemektedir. Anaerobik koşullarda 30°C ve aerobik koşullarda 42°C'de zayıfta olsa üreme görülmektedir. %5'lik koyun kanı içeren TSA besiyerinde hemoliz görülmez. Oksidaz üretimi ile katalaz aktivitesi pozitifdir. Nitrat indirgenir. İndoksil asetat hidrolizi pozitifken, kazein, lesitin veya nişasta hidrolizi negatiftir (Figueras, vd., 2011b).

#### 1.3.15. *Arcobacter anaerophilus*

*Arcobacter anaerophilus* gram negatif, spor oluşturmayan, hareketsiz, flagellasız, 1.0-2.0µm uzunluğunda ve 0.1-0.3µm genişliğinde hücrelere sahiptir. Nitrat agar üzerinde,

anaerobik olarak üreyen pürüzsüz, düzgün, yuvarlak ve soluk sarı renkte koloniler meydana getirirler. Anaerob broth kültürü soluk sarı renkte ve jelatinimsi olup alt kısmında sedimentler bulunur. Katalaz aktivitesi negatif iken oksidaz üetimi pozitifdir. Sitrat kullanılır, kazein hidrolize edilir. Nitrat indirgenir ve H<sub>2</sub>S üretilir. Amilaz, üreaz ve jelatinaz üretilmemektedir. Üreme sınırlı karbon kaynakları üzerinde oluşur ve iyi bir üreme için kompleks ortam gereklidir (Sasi Jyothsna, vd., 2013).

#### **1.3.16. *Arcobacter cloacae***

*Arcobacter cloacae* türüne ait SW28-13T suşları gram negatif, hafif kavisli, kapsülsüz, spor oluşturmeyen, 1.0-1.5µm uzunluğunda ve 0.3–0.5µm genişliğinde hücrelere sahiptir. Hareketleri tek polar flagellayla sağlanır. Aerobik koşullar altında 30°C'de 48 saat inkübasyon sonunda kanlı agar üzerinde çapı 2-4 mm olan, bej, dairesel, konveks ve yayılmayan koloniler oluştururlar. Pigment üretilmez. Tüm suşların hem aerobik hem de mikroaerobik şartlar altında, oda sıcaklığında (18-22°C), 30 ve 37°C'de kanlı agarı üzerinde üremesinde önemli bir farklılık görülmemektedir. Anaerobik şartlarda 30°C'de ya da aerobik ve mikroaerobik şartlarda 42°C'de üreme görülmemektedir. %5'lik koyun kanı içeren TSA besiyerinde hemoliz görülmez. Oksidaz üetimi ile katalaz aktivitesi pozitifdir. Nitrat indirgenir. İndoksil asetat hidrolizi pozitifken, üre, kazein, lesitin veya nişasta hidrolizi negatiftir (Levican, vd., 2013).

#### **1.3.17. *Arcobacter suis***

*Arcobacter suis* türüne ait F41T suşu gram negatif, hafif kavisli, kapsülsüz, spor oluşturmeyen, 0.3–0.6 µm genişliğinde ve 1.2–2.1 µm uzunluğunda hücrelere sahiptir. Bazı hücreler 7µm uzunluğuna varan ipliksi formlara sahiptir. Tek polar flagellasıyla hareket eder. Aerobik koşullar altında 30°C'de 48-72 saat inkübasyonun sonunda kanlı agar üzerinde çapı 1-3 mm olan, bej, dairesel, konveks, yayılmayan koloniler oluştururlar. Pigment üretilmez. Suşların 30°C aerobik ve mikroaerobik şartlar altında ve oda sıcaklığında (18-22°C) kanlı agarda üremesinde önemli bir farklılık görülmemektedir. Bununla birlikte, 30°C'de anaerobik koşullarda ya da 37 veya 42°C'de üreme görülmemektedir. %5'lik koyun kanı içeren TSA besiyerinde hemoliz görülmez. Oksidaz üetimi ile katalaz aktivitesi pozitifdir. Nitrat indirgenir. İndoksil asetat hidrolizi pozitifken, üre, kazein, lesitin veya nişasta hidrolizi negatiftir (Levican, vd., 2013).

### 1.3.18. *Arcobacter molluscorum*

Hücreler gram negatif, hafif kavisli, kapsülsüz, spor oluşturmeyan, 0.3-0.5 µm genişliğinde ve 1-3.4µm uzunluğundadır. Bazı hücreler 7m uzunluğuna kadar filamentoz formlara sahiptir. Tek polar flagellasıyla hareket ederler. 30°C’ de 48 saat aerobik koşullarda kanlı agarda inkübe edildikten sonra, 2-4mm çapında, bej, dairesel, konveks, yayılmayan koloniler oluştururlar. Kanlı agar üzerinde pigment üretilmemektedir. Suşların oda sıcaklığında (18-22°C), 37°C ve 30°C de aerobik ve mikroaerobik koşullarda kanlı agarda üremesinde önemli bir farklılık görülmemektedir. Ancak kanlı agara % 2 NaCl eklendiği zaman üremede artış meydana gelmektedir. 42°C aerobik koşullarda ve 30°C de anaerobik koşullarda üreme zayıftır. %5’lik koyun kanı içeren TSA besiyerinde hemoliz görülmez. Oksidaz ve katalaz aktivitesi pozitifken, hidroliz indoksil asetat, kazein, lesitin, nişasta ya da üre negatiftir. Sırasıyla mikroaerobik koşullar altında 72 saat ve anaerobik koşullar altında 5 gün sonra tüm izolatlar için nitrat indirgenmektedir (Figueras, vd., 2011a).

### 1.3.19. *Arcobacter ebronensis*

*Arcobacter ebronensis* türüne ait F128-2T suşu gram negatif, hafif kavisli, kapsülsüz, spor oluşturmeyan, 0.3-0.5µm genişliğinde ve 1.5-2.5µm uzunluğunda hücrelere sahiptir. Tek polar flagellasıyla hareket eder. Aerobik koşullar altında kanlı agarda 30°C’de 48 saat inkübe edildikten sonra, çapı 2-4mm olan bej, dairesel, konveks ve yayılmayan koloniler oluştururlar. Pigment üretilmemektedir. Suşun 30°C’de aerobik ve mikroaerobik şartlar altında ve oda sıcaklığında (18-22°C) kanlı agarda üremesinde önemli bir farklılık görülmemektedir. Ortama %1 NaCl ilave edilmesi ile bu suşun üremesinde az da olsa bir artış gözlemlenmiştir. Hem aerobik ve mikroaerobik (37°C veya 42°C’ de) hem de anaerobik koşullar altında üreme görülmemektedir. %5’lik koyun kanı içeren TSA besiyerinde hemoliz görülmemektedir. Oksidaz üretimi pozitif iken katalaz üretimi negatiftir. İndoksil asetat hidrolizi ve üre pozitifken, kazein, lesitin ya da nişasta hidrolizi negatiftir (Levican, vd., 2015).

### 1.3.20. *Arcobacter aquimarinus*

*Arcobacter aquimarinus* türüne ait suşların hücreleri, gram negatif, hafif kavisli, kapsülsüz, spor oluşturmeyan 0.4-0.6µm genişliğinde ve 1.0-2.0µm uzunluğundadır. Tek polar flagellasıyla hareket ederler. Aerobik koşullar altında kanlı agarda 30°C’de 48 saat inkübe edildikten sonra, çapı 2-4mm bej, dairesel, konveks ve yayılmayan koloniler oluştururlar. Pigment üretilmemektedir. Suşların oda sıcaklığında (18-22°C) kanlı agarda, 37°C ve 30°C de aerobik ve mikroaerobik şartlar altında ve 30°C’de anaerobik koşullarda üremesinde önemli bir

farklılık görülmemektedir. 42°C’de herhangi bir inkübasyon koşullarında üreme görülmemektedir. %5’lik koyun kanı içeren TSA besiyerinde hemoliz görülmemektedir. Suşların oksidaz ve katalaz aktivitesi pozitifdir. İndoksil asetat hidrolizi pozitifken üre, kazein, lesitin veya nişasta hidrolizi negatiftir. Nitrat indirgenir (Levican, vd., 2015).

### **1.3.21. *Arcobacter lanthieri***

Hücreler gram negatif, mikroaerobik, hafif kavisli, çubuk şeklinde 0.2-0.4µm genişliğinde ve 1.4-2.0µm uzunluğundadır. Tek polar flagellasıyla hareket ederler. 3 gün boyunca 30°C’ de m-AAM besiyerinde üredikten sonra, bej, yarı saydam ve küçük koloniler meydana getirirler. Hücreler 25–37°C’de m-AAM, ASIA, CCDA, MacConkey agar üzerinde (optimum 30°C) ve TSA plus 1% glisinde iyi büyüme gösterirler. Voges-Proskauer testi, trifeniltetrazolyum klorür (TTC) indirgenmesi ve nitrat indirgenmesi için pozitifdir. Suşları oksidaz, katalaz, esterase, nitrat üretim ve indoksil asetat hidrolizi için pozitif iken jelatin hidrolizi, H<sub>2</sub>S üretimi, sodyum süksinat asimilasyonu, hippurat hidroliz, c-glutamil transferaz, pirrolidonil arilamidaz, L-arginin arilamidaz, L-aspartat arilamidaz, alkalın fosfataz, beta-galaktozidaz, arginin dihidrolaz, lizin dekarboksilaz, ornitin dekarboksilaz, sitrat kullanımı, tripton deaminaz ve indol üretimi için hiç bir aktivite göstermemektedir (Whiteduck-Léveillé, vd., 2015).

### **1.3.22. *Arcobacter valdiviensis***

Hücreler gram-negatif, hafif eğimli çubuklar şeklinde, kapsüllenmemiş, spor oluşturmayan ve 0.3-0.5 µm genişliğinde ve 1.3-2 µm uzunluğundadır. Eski kültürlerinde küresel olmayan ya da kokoid hücreler gözlenmiştir. Tek polar flagellasıyla hareket ederler. Anaerobik koşullar altında kanlı agarda 30°C’de 72 saat boyunca inkübe edildikten sonra, çapı 2 mm olan, kirli beyaz, yarı saydam, tüm marjları ile konveks, dairesel koloniler meydana getirirler. Katı ortam üzerinde hiçbir yayılma gözlenmemiştir. Pigment üretilmemektedir. Suşların oda sıcaklığında (18-22°C) kanlı agarda ve 30°C 'de aerobik veya mikroaerobik kültür koşulları altında üremesinde önemli bir farklılık gözlenmezken suşların 37°C 'de üreme göstermediği bildirilmiştir. Aerobiyoz üzerinde 35°C’ de ve anaerobik koşullar altında 30°C’de zayıf büyüme gözlenmiştir. Kanlı agarda hemoliz görülmez. Suşların hidroliz indoksil asetat, oksidaz ve katalaz aktivitesi pozitifdir. Üreaz üretilmez ve nitrat indirgenmez (Collado, 2010).

#### 1.4. Epidemiyoloji

*Arcobacter*'ler hayvanlar ve hayvansal gıdalar (sığır, koyun, kümes hayvanları, sığır eti, süt, domuz eti vb.), hayvanların aborte fetusleri, insanlar ve insanlardan alınan klinik örnekler, tatlı sular ve deniz suları, midye ve istiridye gibi birçok farklı kaynaktan izole edilirken (Etonsi 2013), en yüksek yaygınlık domuz ve sığırları takip eden tavuk etinde bildirilmiştir. Ayrıca içme su rezervlerinde, su dağıtım hatlarının yüzeylerinde, kirlenmiş akarsu ve kanal sularında da bulunabildiği belirtirmektedir (Shah, vd., 2011).

##### 1.4.1. İnsanlarda *Arcobacter*

*Arcobacter*'ler Gıda Mikrobiyolojik Şartları Uluslararası Komisyonu (ICMSF) tarafından, gelişmekte olan patojenler olarak sınıflandırılmıştır. Günümüze kadar 22 *Arcobacter* türü tanımlanmış olup yalnızca 3 türün insanları enfekte ettiği bildirilmiştir: *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* ve *A. skirrowii* insan enfeksiyonları ile ilişkili birincil tür olarak belirtilmiştir (Rice, vd., 1999; Van den Abeele, vd., 2014).

Atabay ve Corry (1998) özellikle kendini sınırlayan enterit ve nadiren bakteremi ya da apandisit gibi insan hastalıklarının zoonotik bir kökenden meydana geldiğini bildirmişlerdir. *Arcobacter* türlerinin temel bulaşma yollarının gıda ve su olduğunu öne sürmüşler, ayrıca hastalığın çoğunlukla kişiden kişiye temas, çapraz bulaşma, hijyenik olmayan gıdaların uygulama alanları ve gelişmekte olan bölgeler / ülkelere seyahat yoluyla edinildiği bildirilmiştir (D'Sa, 2002).

Taylor ve arkadaşları (1991), Tayland'da yaptıkları çalışmada gastroenteritli çocukların sindirim sistemlerinden %2.4 oranında *A. butzleri* izolasyonu bildirmiştir.

Vandamme ve arkadaşlarının (1992b) İtalya'da yaptıkları bir çalışmada; aynı okulda bulunan 10 çocuğun 3'ünde ishal belirtisi bulunmaksızın, tekrarlayan karın krampları şikâyetleri sonucunda *A. butzleri* izolasyonu bildirilmiştir.

İnsanlarda, *A. butzleri* ve *A. cryaerophilus* akut ishal olan hastaların dışkı örneklerinden izole edilirken, *A. skirrowii* sadece iki kez insan hastalıklarıyla ilişkilendirilmiştir. Bunlardan biri Wybo ve ark. (2004) tarafından, kronik gastrointestinal hastalığı olan yaşlı bir hastadan alınan örneklerde bir diğeri ise Samie ve ark. (2007) tarafından Güney Afrika'da (HIV veya HIV olmaksızın) hastalardan alınan dışkı numunelerinde saptanmıştır (Lehner, vd., 2005; Wybo, vd., 2004; Collado, 2010).

*Arcobacter* türlerinin akut apandisit olan hastalardan ve periton sıvısı veya kandan izole edilebildiği bildirilmiştir (Pervical, vd., 2004).

Bununla birlikte, insan ishal nedeni olarak *Arcobacter*'lerin önemi henüz netlik kazanmamıştır.

#### **1.4.2. Hayvan, gıda, su ve çevre örneklerinde *Arcobacter***

*Arcobacter*'ler sıklıkla farklı çiftlik hayvanlarının (tavuk, domuz, sığır, koyun, kaz ve hindi gibi) dışkı numunelerinden ve bağırsak sistemlerinden izole edilmiş, fakat yalnızca bazı türlerin hastalık yapıcı özelliklere sahip oldukları belirlenmiştir. Hayvansal ürünler arasında tavuk, sığır, domuz, hindi etleri ve bunlardan hazırlanan kıymaların *Arcobacter* türleri ile kontamine olduğu bildirilmiştir. Bu hayvanlara ait etlerin *Arcobacter* türleri ile kontaminasyonunun, kesimhanelerde meydana geldiği saptanmıştır. Ayrıca market ve kasaplarda kontamine etler aracılığıyla diğer ürünlerin çapraz kontaminasyonu da söz konusudur. Hayvanlarda *Arcobacter*'lerin en ciddi etkilerinin düşükler, mastisit ve ishal olduğu saptanmıştır (Logan, vd., 1982; Vandamme, vd., 1992c; Collado, 2010). Schroeder-Tucker ve arkadaşları tarafından (1996), *Arcobacter* enfeksiyonu ile ilgili patolojik bulguların kısırlık, östrus sırasında kronik akıntı, kronik ölü doğan sorunları ve geç dönem abortus olarak belirlenmiştir (Ho, vd., 2006; Schroeder-Tucker, vd., 1996).

##### **Kanatlı etlerinde (broylerler'de);**

*Campylobacter*'ler gibi hem domuz etinden hem de sığır kıymasından elde edilen *Arcobacter*ler kırmızı ete oranla tavuklarda ve kümes hayvanlarında daha sık görülmektedir (Atabay, vd., 1998; Gonzalez, vd., 2000).

Atabay ve Corry (1998), süpermarketten alınan 10, kesimhaneden toplanan 15 adet tavuk karkas örneklerini *Campylobacter* ve *Arcobacter* suşları açısından incelemişlerdir. Yapılan bu incelemeler sonucunda süpermarketten alınan karkaslardan *A. butzleri* ve *A. cryaerophilus*, kesimhaneden alınan karkaslardan *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* ve *A. skirrowii* izole etmişlerdir.

Belçika'da yapılan bir çalışmada (2001); kanatlı ürünlerinde *Arcobacter* ve termofilik *Campylobacter* prevalansı incelendiğinde *Arcobacter* türünün yaygınlığının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmada yumurta tavuklarının boyun derisinden %100 ve broylerlerden alınan benzer örneklerde %90 oranında *Arcobacter* izole edilmiş, broyler göğüs eti örneklerinin de %65'inin *Arcobacter* ile kontamine olduğu belirlenmiştir (Houf, vd., 2001).

**Çizelge 1.2.** *Arcobacter* cinsinde yer alan türler, izole edildikleri ortamlar ve ilişkili oldukları hastalıklar.

| Türler                  | Kaynaklar                                                         | İnsan<br>Hayvan          | Hastalıklar                                                    |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------|----------------------------------------------------------------|
| <i>A. butzleri</i>      | Tavuk eti                                                         | Gastroenterit, septisemi | Domuz, sığır ve primatlarda gastroenterit, domuzlarda abortus  |
| <i>A. nitrofigilis</i>  | Bitki kökü                                                        | *-                       | -                                                              |
| <i>A. skirrowii</i>     | Atık sığır, domuz ve koyun fötüsleri                              | Gastroenterit            | Koyun ve sığırlarda gastroenterit, domuz ve sığırlarda abortus |
| <i>A. cryaerophilus</i> | Atık sığır fötüsü                                                 | Gastroenterit, septisemi | Domuz, sığır, koyun ve atlarda abortus, sığırlarda mastit      |
| <i>A. cibarius</i>      | Tavuk eti                                                         | -                        | -                                                              |
| <i>A. halophilus</i>    | Tuzlu göl suyu                                                    | -                        | -                                                              |
| <i>A. mytili</i>        | Midye, tuzlu su                                                   | -                        | -                                                              |
| <i>A. thereius</i>      | Atık domuz fötüsü, domuz sindirim sistemi, ördek sindirim sistemi | -                        | -                                                              |
| <i>A. marinus</i>       | Deniz suyu, deniz yıldızı, deniz yosunu                           | -                        | -                                                              |
| <i>A. trophiarum</i>    | Domuz karkası                                                     | -                        | -                                                              |
| <i>A. defluvii</i>      | Lağım suları                                                      | -                        | -                                                              |
| <i>A. molluscorum</i>   | Midye, istiridye                                                  | -                        | -                                                              |
| <i>A. ellisii</i>       | Midye, yumuşakça                                                  | -                        | -                                                              |
| <i>A. bivalviorum</i>   | Midye, deniz tarağı                                               | -                        | -                                                              |
| <i>A. venerupis</i>     | Midye, deniz tarağı                                               | -                        | -                                                              |
| <i>A. anaerophilus</i>  | Yaban domuzu ve domuzdan                                          | -                        | -                                                              |
| <i>A. cloace</i>        | Lağım suları                                                      | -                        | -                                                              |
| <i>A. suis</i>          | Yaban domuzu ve domuzdan                                          | -                        | -                                                              |
| <i>A. ebronensis</i>    | Kabuklu deniz ürünleri                                            | -                        | -                                                              |
| <i>A. aquimarinus</i>   | Deniz suyu                                                        | -                        | -                                                              |
| <i>A. lanthieri</i>     | Domuz ve süt sığır gübresi                                        | -                        | -                                                              |
| <i>A. valdiviensis</i>  | Tavuk kloak sürüntü numuneleri                                    | -                        | -                                                              |

Atabay ve arkadaşları (2003) yaptıkları çalışmada, 75 tavuk karkas (44 taze ve 31 dondurulmuş) örneği incelemiştir. İncelenen 44 adet taze tavuk karkaslarının 42'sinden ve 31 adet dondurulmuş tavuk karkaslarının 7'sinden (%23) *A. butzleri* izole etmiştir.

Hollanda'da yapılan bir çalışmada (2008), tavukların Gastrointestinal sistemlerinde *Arcobacter* prevalansı araştırılmıştır. Yumurta tavuklarında % 20 ila % 85 ve broylerlerde % 3.3 ila % 51 arasında değişen oranlarda *Arcobacter* tespit edilmiştir (Ho, vd., 2008).

### Kırmızı etlerde;

Her ne kadar kanatlı etleri ve su örneklerinin *Arcobacter* ile kontamine olma riski yüksek olsa da tüketim bakımından önemli bir yer tutan kırmızı etler de *Arcobacter*'ler ile konatmine olma riski bulunan gıda çeşitleridir.

Wesley ve arkadaşları (2000), yaptıkları bir çalışmada mandıra sığırlarında *Arcobacter*'lerin bulunma sıklığını araştırmışlardır. İnceledikleri 1682 sığırın % 14,3'ünde *Arcobacter* türünün bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Rivas ve arkadaşları (2004), domuz, kuzu, sığır ve kuzu etlerinde *Arcobacter* prevalansını belirlemek amacıyla bir araştırma yapmışlardır. Bu çalışmada farklı tesislerden topladıkları domuz etlerinin % 29'undan sığır etlerinin % 22'sinden ve kuzu etlerinin % 15'inden *A.butzleri* izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Öngör ve arkadaşları (2004), Türkiye'nin doğu kesiminde yaptıkları bir çalışmada marketlerden topladıkları 97 sığır kıyması örneğini incelemişlerdir. İnceledikleri örneklerin %5'inin *Arcobacter* ile kontamine olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışma Türkiye'deki sığır eti örneklerinden *Arcobacter* spp. izole edilen ilk çalışma olmasıyla önem kazanmıştır.

#### **Süt ve süt ürünleri;**

İtalya'da yapılan bir çalışmada 14 çiftliğin 12'sindeki 49 adet süt filtresinden toplamda 52 adet örnek izole edilmiştir. Bunların 22'sini *A.butzleri*, 14'ünü *A.cryaerophilus* geri kalanını da *Campylobacter* türleri oluşturmaktadır (Serraino, vd., 2013).

*Arcobacter* türlerinin sağlıklı ruminantların sindirim sisteminde herhangi bir semptomu sebep olmadan varlığını sürdürmesi, kesim sırasında karkasların ve muhtemelen de çiftliklerdeki sütlerin fekal kontaminasyonunda önemli bir paya sahiptir (Shah, vd., 2011).

#### **Sularda;**

Suyun bu organizmaların iletiminde önemli bir rol oynayabileceği öne sürülmüş ve içme suyu *Arcobacter* ile ilişkili ishal hastalığı ediniminde önemli bir risk faktörü olarak gösterilmiştir (Moreno et al. 2003). *Arcobacter* hücrelerinin paslanmaz çelik, bakır ve plastik gibi çeşitli su dağıtım borularının yüzeyine yapışabildiğini tespit etmiştir. Yapılan incelemede 72 saat sonra paslanmaz çelik yüzeylerde ekstrasellüler fibrillerin meydana geldiği saptanmıştır (Lehner, vd., 2005).

Rice ve arkadaşları (1999) yaptıkları bir çalışmada, kontamine bir yeraltı suyundan *Arcobacter* izole etmişlerdir.

Diergaardt ve ark. (2003), tarafından yapılan bir çalışmada çevresel su örneklerinden izole edilen 221 örneğin 8'i *Campylobacter* cinsine ait olurken, 4'ü *Arcobacter* cinsine dahil olan *A.butzleri* olarak tanımlanmıştır.

Collado ve arkadaşları (2008), İtalya’da yaptıkları bir çalışmada tatlısu, deniz suyu ve kanalizasyondan topladıkları 205 su örneğini incelemişlerdir. Bu bakteri örneklerinin %55.1’inde ilk defa fekal kirlenmenin bakteriyel indikatörlerle ilişkili olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışma sonucunda *A.skirrowii* (% 1.8), *A.cryaerophilus* (30%) ve baskın tür olarak *A.butzleri* (% 94) izole edilmiştir.

Driessche ve Houf (2007), yaptıkları bir çalışmada inceledikleri su örneklerinden yalnızca *A.cryaerophilus* izole etmişlerdir. Haşlama tanklarından aldıkları örneklerde 3 farklı genotipte ve dağıtım borularından aldıkları örneklerde de 2 farklı genotipte izolat elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Nijerya’ da yapılan bir çalışmada kanatlı et kesimhanesindeki atık sular *Arcobacter* türünün izole edilebilmesi için uygun bulunmuştur. İncelenen numunelerin 26’sında (%14) pozitif sonuç elde edilmiştir (Amisu, vd., 2003).

#### **Dışkı;**

Driessche ve Houf (2003) Belçika’da yaptıkları bir çalışmada çiftlik hayvanlarının dışkısında *Arcobacter* bulunma sıklığını araştırmışlardır. 51 sığır dışkı örneğinden 5’i (%10) *Arcobacter* varlığı açısından pozitif bulunmuştur.

Fera ve arkadaşları (2009), yaptıkları bir çalışmada 85 kedinin 67’sinde *Arcobacter* DNA’sı tespit etmişler ve *A.butzleri*’nin kedilerde en sık saptanan türler olduğunu belirlemişlerdir.

Houf ve arkadaşları (2008), Belçika’da yaptıkları bir çalışmada 267 evcil köpek ve 61 evcil kediden dışkı ve bukkal swab örnekleri toplamışlardır. Kedilerden alınan bukkal swab ve dışkı örneklerinin hiçbirinde *Arcobacter*’e rastlanmamıştır. Buna karşılık 5 köpeğin (%1.9) boşaltım atıklarında ve 2 köpeğin (%0.7) bukkal boşluğunda *Arcobacter* izole edilmiştir.

#### **1.4.3. Bulaşma yolları**

Her ne kadar kanıtlanmış olmasa da, *Arcobacter* ile kontamine olmuş su ve gıdaların tüketimi insan ve hayvanlar için bulaşma yolu olarak kabul edilmiştir. *A.butzleri*’nin kişiden kişiye bulaşması, bir İtalyan okulunda tekrarlayan karın krampları salgını meydana gelmesiyle öne sürülmüştür. Epidemiyolojik veriler, enfekte hastalardan alınan dışkı örneklerinden toplanan bütün suşların aynı fenotip ve genotipe sahip olduğunu göstermektedir.

*A.butzleri*'nin plasenta yolu ile bir yenidoğana bulaşmasının da diğer bir kişiden kişiye bulaşma yolu olduğu düşünülmektedir (Vandamme, vd., 1992b; On, vd., 1995).

Hayvan kökenli gıda ürünleri *Arcobacter* türlerinin bulaşmasında önemli bir potansiyel iletim yolu olarak gösterilmiştir. Bu hipotez birçok perakende et ürününde, sağlıklı çiftlik hayvanlarının dışkı örnekleri ve bağırsak sisteminde bu bakterilerin yüksek prevalansına dayanmaktadır. Et ürünlerindeki *Arcobacter* kontaminasyonunun kesim işlemi sırasında karkaslara kontamine hayvan dışkısının temas etmesiyle gerçekleştiği belirtilmiştir. Evcil hayvanların tükürük ya da dışkısı ile temas da bir diğer potansiyel bulaşma yolu olarak öne sürülmüştür (Collado ve Figueras, 2011).

Suyun da *Arcobacter* türlerinin hayvanlara ve insanlara bulaşmasında önemli bir rol oynayabileceği öne sürülmüştür. İçme suyu *Arcobacter* ile ilişkili ishal hastalığı ediniminde önemli bir risk faktörü olarak gösterilmektedir (Moreno, vd., 2003).

#### **1.4.4. Patogenez ve virülens faktörler**

*Arcobacter* türleri insan enfeksiyonlarından enterit ve bakteriyemi ile ilişkilendirilmiştir. Sağlıklı çiftlik hayvanlarının barsaklarında kommensal olarak bulunmalarına karşın, enterit ve abortuslardan da izole edildiği bildirilmiştir. In vitro insan ve hayvan hücre kültürü deneyleri *Arcobacter* türlerinin ökaryotik hücre kültürlerine yapışabildiğini, bu hücreleri istila edebildiğini ve yine bu hücrelere zarar veren toksinler üretebildiğini göstermiştir. Maalesef, *Arcobacter* türlerinin patofizyolojik ve patolojik potansiyelini açıklığa kavuşturacak in vivo çalışmaların sayısı oldukça azdır (Ferreira, vd., 2015). Birçok çalışmada *Arcobacter*'lerin çeşitli hücre hatlarında, sitotoksikite ve yapışma kapasitesi özellikleri araştırılmasına karşın, türlerinin patojenite ve virülans mekanizmaları hala tam olarak anlaşılamamıştır.

##### **1.4.4.1. Konak hücrede adezyon ve invazyon**

Konak hücrelerde *Arcobacter* türlerinin adezyon, invazyon ve sitotoksik potansiyelini karakterize etmek için in vitro kültürlerin kullanıldığı çeşitli çalışmalar yapılmış fakat elde edilen veriler arasında farklılıklar olduğu saptanmıştır. Gözlemlenen bu farklılıkların nedeninin *Arcobacter* suşlarının orjinlerine ve kullanılan hücre hatlarının farklılığına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Musmanno ve ark. (1997), yaptıkları çalışmada nehirden izole ettikleri *A.butzleri* izolatlarının Afrika yeşil maymunu böbrek hücreleri (Vero) ve Çin hamster ovaryumu (CHO)

hücrelerinde sitotonik, sitotoksik ve sitoletal distending faktörlerin üretildiğini saptamışlardır. *Arcobacter*lerin adezyon ve invazyon özellikleri HeLa ve Barsak 407 hücreleri üzerinde incelenmiş ve sadece bir suşun hücreler üzerinde sitotoksik etkisi olduğu belirlenmiştir. Sitotoksik olmayan diğer suşların ise CHO hücrelerinde uzamaya (sitotonik benzeri etki) neden olduğu belirlenmiştir. İncelenen suşlardan yalnızca birinin in vitro olarak hücrelere adhere olduğu tespit edilmiş ve suşların hiçbirinde invazyona rastlanmamıştır. Bütün bu veriler ışığında çevreden izole edilen *Arcobacter*lerin fenotipik olarak heterojenite gösterdiği ve bazı suşların virulent oldukları saptanmıştır (Lehner, vd., 2005; Collado ve Figueras , 2011).

#### **1.4.4.2. *Arcobacter*'ler tarafından üretilen toksinler**

Birçok bakteriyel patojenin hastalık yapmasındaki temel mekanizma toksinlerin üretimidir. Toksinler doğrudan epitel sekresyona işaret edebilir, epitel hücrelere ya da intestinal bariyer fonksiyonuna zarar verebilir veya ikincil hücreler ya da mediatörleri toplayabilir. Bu da daha sonra intestinal sekresyon, enflamasyon veya hasar oluşumunu tetikler (Ferreira, vd., 2015, Guerrant, vd., 1999).

Johnson ve Murano (2002) tavuk, sığır, su ve ishali insan dışkılarından izole ettikleri *Arcobacter* spp.'de PCR ile cytolethal distending toksin (CDT) genlerinin varlığını araştırmış, incelediği suşların hiç birisinde bu gene rastlayamamıştır. Bununla birlikte suşların HeLa ve INT407 hücreleri üzerine toksik etkisi olduğu tespit (Collado ve Figueras, 2011; Lehner, vd., 2005).

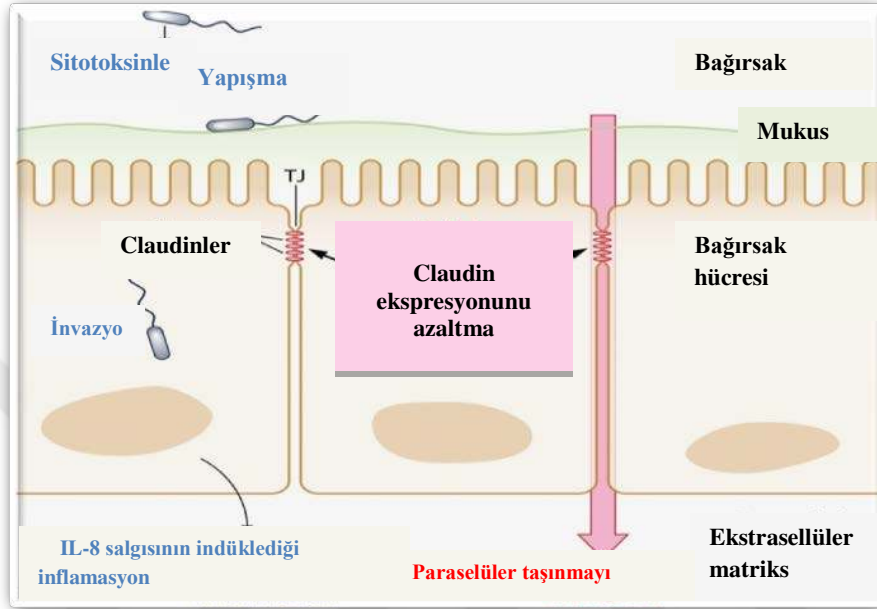
Carbone ve ark. (2003) yaptıkları bir çalışmada, elde ettikleri 17 adet *Arcobacter* suşundan 6'sının hem HEp-2 hem de HeLa hücre hatları üzerinde adeziv etkiye sahip olduklarını bildirmişlerdir (Carbone, vd., 2003).

#### **1.4.4.3. Claudin ekspresyonu**

Vücut boyunca iç ve dış yüzeyleri kapsayan hücresel sınırlar epitelyal ve endotel tabakalar tarafından sağlanmaktadır. Bu tabakalar ile komşu hücreler arasındaki kompleksler gap junction, dezmozomlar, aderans bağlantıları ve sıkı bağlantılar (TJs) olarak bilinmektedir (Turksen ve Troy, 2004).

Claudin multigen ailesi paraselüler geçirgenliği düzenleyen ve epitel ve endotel hücre katmanları arasında hücre polaritesinin korunmasında önemli rolleri olan sıkı bağlantıların yapısal ve işlevsel bileşenleri olan tetraspan membran proteinlerini kodlamaktadır. TJs birden çok bileşenden oluşur, ancak claudin olarak bilinen tetraspan membran proteinleri TJ oluşumu

ve işlevi için önemlidir. TJ oluşumundan sorumlu olan bu protein, paraselüler permeabilite geçirgenliğinin düzenlenmesinde, epitel ve endotel hücrelerdeki hücre polaritelerinin korunması ve devamlılığının sağlanmasında rol oynamaktadır (Lal-Nag ve Morin, 2009).



**Şekil 1.9.** İntestinal epitel hücrelerinde ve farklı hücre hatlarında *Arcobacter*'lerin virülans mekanizmaları. *Arcobacter* türlerinin suşlarının, interlökin-8 (IL-8) aracılığıyla inflamasyon, yapışma, invazyon ve sitotoksite üretebilme kapasitesi gösterilmiştir. Epitel bariyer disfonksiyonu ve paraselüler taşınmaya eşlik eden artış ile sıkı bağlantı bölgelerinde (tight junctions) Claudin ekspresyonunu azaltma yeteneği (diyarenin fluks tip sızıntısına neden olur) insan kolonik epitel hücrelerinde *A.butzleri* için gösterilmiştir (Collado ve Figueras, 2011).

*A.butzleri*'nin diyareye yol açma mekanizmasının anlaşılması için bazı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda enfekte insan kolon epitel hücre kültürleri kullanılmıştır (HT-29/B6). *Arcobacter*'lerin, TJ proteinleri olan claudin -1, -5, ve -8'in ekspresyonu azalttığı saptanmıştır. Bu proteinlerin azalması epitel bariyer bozukluklarına ve epitel hücrelerde apoptozise yol açar. Bunun sonucu olarak sızıntı şeklinde diyare oluşumuna neden olur. Bunlara ilaveten, *H.pylori* ve *Campylobacter spp*'lerde, bir proinflamatuvar sitokin türü olan IL-8'in ekspresyonunun uyarılması ana virülens faktör olarak düşünülmektedir. Bu sitokin uyarımının *A.butzleri*, *A.cryaerophilus*, *A.skirrowii* ve *A.cibarius*'ta da virülens faktör olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte *Arcobacter*'lerin, insan Caco-2 hücreleri ve domuz barsak epitel hücrelerinde

IL-8 üretiminin uyarılmasına ilişkin yapılan deneylerde, IL-8 ve adezyon ve invazyon arasında herhangi bir korelasyona rastlanmamıştır (Collado ve Figueras, 2011) (Şekil 1.9.).

#### **1.4.4.4. Plasmidler**

Plasmidler kromozomdan bağımsız olarak kendini eşleyebilen bir DNA parçasıdır. Birçok bakteriyel türde bulunabilmesinin yanı sıra, arkelerde, ökaryotik türlerde ve hemen hemen tüm ekosistemlerde bulunmaktadır. Plasmidlerin bir diğer özelliği de taşıdığı genetik bilgileri başka hücrelere aktarabilmesidir. Bunun sonucu olarak alıcı hücre, kendi dışındaki başka bir hücrenin (verici) fenotipini kazanabilir. Aktarılan bu plazmid, horizontal gen transferi ile yeni jenerasyonlara aktarılabilir, kromozomdan bağımsız olarak replike olabilir, boyutları 1kbp ile 100 kbp arasında değişebilir. Plasmidler; antimikrobiyal ve ağır metal direnç genleri, toksin genler ve virülens genler gibi taşıdıkları ilave fenotipler nedeni ile bakteriyel patojenler için önemlidirler (Slater, vd., 2008).

*Arcobacter*lerde plasmid varlığına ilişkin az sayıda çalışma bulunmaktadır (Doudah, vd., 2014; Toh, vd., 2011; Harrass, vd., 1998; Ferreira, vd., 2015). Yeni kesim yapılmış broylerlerden izole edilen *Arcobacter*'lerin %24'ünde 2.0-5.0 kbp büyüklüğünde plasmidler saptanmıştır. Bu çalışmada tüm suşlarda tek plasmid izole edilmiş olup, tüm plasmidlerin aynı restriksiyon şekillerine sahip olduğu bildirilmiştir (Harrass, vd.,1998). Mikrobiyal yakıt hücresi (kimyasal enerjiyi- elektrik enerjisine çeviren doğal bakteri toplulukları) olarak kullanılan sistemlerden izole edilen *Arcobacter* spp. plasmidlerinin üzerinde 3 ana protein kodlama bölgesi saptanmıştır. Bunlardan biri tahminen replikasyon ilişkili protein bölgesi olup diğer ikisi hipotetik protein bölgesidir (Toh, vd., 2011).

Son yıllarda insan ve hayvanlardan izole edilen *Arcobacter* türlerindeki plazmidler incelenmiş ve sekans analizleri yapılmıştır. Tavuk, domuz ve sığırlardan izole edilen *A.butzleri*, *A. cryaerophilus* ve *A. skirrowii*'de plazmid saptanırken, insan, koyun ve attan elde edilen izolatlarda plazmid saptanamamıştır. Üç *A.butzleri* ve bir *A. cryaerophilus*'tan elde edilen küçük plazmidlerin sekansı sonucu, bu genlerin; plazmidin replikasyonundan ve gelecek nesillere aktarımından sorumlu olduğu varsayılan genler oldukları gösterilmiştir. Doudah ve ark (2014) , broylerlerden izole ettikleri bir *A.butzleri* suşunda 27.5 kbp büyüklüğünde bir plazmid saptamışlardır. Bu plazmid sekans verileri *Wolinella succinogenes* türlerinde tip IV sekresyonundan sorumlu olan genlerle ilişkili bulunmuştur (Doudah, vd., 2014; Ferreira, vd., 2015; Toh, vd., 2011).

#### **1.4.4.5. Biyofilm**

Biyofilm, geri dönüşümsüz olarak katı bir yüzeye tutunan, belirli bir yapısal bütünlük içerisinde kendi ürettikleri ekstrasellüler polimerik maddelerden oluşan bir matriks içinde gömülü olarak yaşayan, büyüme hızları ve gen transkripsiyonları açısından serbest dolaşan türdeşleri ile aralarında farklılıklar bulunan mikrobiyal hücrelerin oluşturduğu bir topluluktur (Donlan, 2002).

Bakterilerin belirli çevresel uyaranlara (besin durumu, sıcaklık, ozmolarite, pH, demir ve oksijen) bir yanıt olarak biyofilm gelişimini başlatabildiği düşünülmektedir (O'Toole, vd., 2000; Kokare, vd., 2009).

#### **Biyofilmin Yapısı;**

Polisakkarit, protein, DNA ve sudan oluşan ekstraselüler matriks, biyofilm hücrelerinin yüzeye tutunmasını sağlar. Yüzeye sıkıca tutunan bakteri burada çoğalarak önce mikrokolonileri, mikrokolonilerde büyüyerek ve genişleyerek biyofilm tabakasını oluşturur. Su, bakteriyel hücre kapsülleri içinde bulunmakta ve mikroorganizmaların monosakkaritlerden oluşturduğu yüksek molekül ağırlıklı polimerler olan ekzopolisakkarite (EPS) bağlanmaktadır. EPS üretimi, organizmanın yüzeye dönüşümsüz olarak tutunması için gereklidir ve bu biyofilm oluşumunun bir göstergesidir. Olgun bir biyofilmin kütlesinin %75–90'ını EPS oluşturmaktadır (Gün ve Ekinci, 2009; Akan ve Kınık, 2014).

#### **Biyofilm Oluşum Evreleri;**

**1. Tutunma:** Bakteri hücresinin yüzeye ilk tutunmasında bakteri hücresi yüzey ile tam olarak temas etmemekte, ancak bakteri hücresi ile yüzey arasında uzun mesafeli etkileşimler meydana gelmektedir. Bu aşamada bakterinin yüzeye tutunması bakteriyel hücre yüzeyinin (tekstür, hidrofobiklik, pH, sıcaklık, besin maddelerinin varlığı) fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Yüzeye tutunan hücreler çok az miktarda EPS'ye sahiptirler ve bağımsız hareket etme yeteneğindedirler (Akan ve Kınık, 2014).

**2. Yapışma:** Yüzeye tutunan hücreler bakteri hücre zarındaki proteinlerin uyarımı sonucunda ekzopolisakkarid yapıda materyal sentezlemeye başlar ve bu da hücrelerin birbirine ve yüzeye tutunmasını sağlar. Ekzopolisakkarid aynı zamanda bakterinin olumsuz çevre koşullarından korunmasını da sağlamaktadır. Mikroorganizmalar yüzeye dönüşümlü olarak bağlanırken, yüzeyde yaşamak için yeterli besin maddesini olup olmadığını araştırır. Bakteri

hücreleri flagella ve pili gibi organelleri ile ve EPS oluşturarak yüzeylere dönüşümsüz olarak bağlanabilirler (Gün ve Ekinci, 2009).

**3. Kolonizasyon:** Yüzeye tutunan bakteriler bölünüp çoğalarak biyofilmin en küçük organizasyon birimi olan mikrokolonileri oluşturur. Bu mikrokolonilerin üzerine ortamdaki planktonik bakteriler de yapışarak kolonizasyon sağlanır. Yüzeye tutunan bakteri hücreleri, membrana bağlı proteinlerden EPS üretir. Ancak EPS oluşturmayan bazı bakteri türlerinin de yüzeylere bağlanabildiği belirtilmektedir (U. Altun ve Şener, 2008).

**4. Olgun Biyofilm:** Bu aşamada biyofilm hücreleri besin maddelerinin etkisiyle apartman yada mantar şeklinde yapılara dönüşürler. Çeşitli yüksekliklerde kuleler oluşturan mikrokolonilerin aralarında besinlerin ulaştırılması ve metabolik atık ürünlerin uzaklaştırılması için dolaşım sistemi olarak görev yapan su kanalları bulunmaktadır. Hücrelerin bu yapıya ulaşılabilmesi için yaklaşık 10 gün yada daha uzun bir süre gerekmektedir (Akan ve Kınık, 2014; Fernandez, vd., 2008).

**5. Kopma veya Ayrılma Evresi:** Biyofilm oluşumunun son aşaması yüzey kolonizasyonudur. Tutunan bakteri gelişir ve daha sonra bölünür. EPS de, diğer planktonik hücrelerin yakalanması da sağlanır. Bu aşamada bir bakteri hücresi yüzeyde koloni oluşturduktan sonra (ilk koloni), aynı yüzeye diğer bakteriler de koloni oluşturur (ikincil koloni). Biyofilm büyüdükçe, polimer matriksinde kapsül oluşturmuş mikroorganizmalarda da artış görülür (Gün ve Ekinci, 2009; Poulsen, 1999).

### **Quorum Sensing;**

Bakterilerin birçoğu kommunitelerde yaşam birlikleri şeklinde yaşamaktadırlar. Buralarda kimyasal sinyaller üreterek ve bu sinyallere yanıt vererek iletişim kurmaktadırlar. Hücreler arasındaki bu iletişim “Quorum Sensing” mekanizmasıyla gerçekleştirilmektedir. Bakteriler ürettikleri sinyal moleküllerinin yoğunluğunu ölçerek çevrelerindeki diğer mikroorganizmaların miktarını hissedebilmektedirler. Çevre koşulları değiştiğinde, metabolizmalarında bir takım değişiklikler yaparak yeni ortama kendilerini adapte etmeye çalışmaktadırlar (Karaboz ve Sukatar, 2004; Saraçlı, 2006).

“Quorum sensing” sistemi sayesinde;

- Bakteri davranışlarını koordine ederek, besin kaynaklarına karşı adaptasyon geliştirir.
- Aynı besin için yarışan diğer bakterilere karşı savaşabilir.
- En önemlisi, infeksiyon sırasında virülans faktörlerinin regülasyonu sonucu konakta immün yanıttan kaçabilir.

Biyofilm tabakasının oluşturulma nedenleri (Gülgör ve Korukluoğlu, 2014)

- Çevreden almış olduğu sinyaller sonucunda tehlikede olduğunu algılayan bakterinin kendisini koruma altına almak istemesi,
- Besinlere erişilebilirliğin artırılması ve metabolik olarak diğer mikroorganizmalar ile işbirliği içinde bulunmak,
- Yeni genetik özelliklerin kazanılması ve farklı davranış şekillerinin ortaya çıkabilmesi

*A. butzleri* ATCC 49616’nin ve 6 adet saha izolatının (kesimhaneden izole edilen) kullanıldığı, Kjeldgaard ve arkadaşlarının çalışmasında (2009), suşların tamamının mikropleytlerde biyofilm oluşturduğu gözlemlenmiştir.

Portekiz’de yapılan bir araştırmada ise, kümes hayvanları ve çevresinden ayrıca mezbahadan elde edilen 36 adet *Arcobacter* izolatının mikroaerofilik atmosferde sadece 26 sının biyofilm oluşturdukları saptanmıştır. Biyofilm oluşumu değerlendirildiğinde bu örneklerin 21 tanesi zayıf, 5 tanesi ise orta düzeyde biyofilm şekillendirmiştir (Ferreira, vd., 2013).

Tavuk ve tavuk ilişkili ortamlardan izole edilen *Arcobacter* türlerinin biyofilm oluşumlarına ilişkin oldukça az sayıda makale olup, veriler arasında ise farklılıklar bulunmaktadır. Bu nedenle konu üzerine yapılan çalışmaların artırılması ve *Arcobacter*’lerin çevresel stres faktörlerine direnmede biyofilmlerin rolü üzerinde durulması gerekmektedir.

#### ***Arcobacter*’lerin canlı fakat kültürü yapılamayan formları;**

Canlı fakat kültürü yapılamayan (VBNC) tanımlaması, olumsuz çevre koşulları altında hayatta kalmak için, birçok gram-negatif bakteri tarafından geliştirilen bir stratejidir. Bu şartlarda bakteriler katı besiyerinde koloni oluşturma yeteneklerini kaybetse bile canlılıklarını korurlar. Bakterilerin VBNC durumuna geçmesine neden olan 2 temel faktör vardır. Bunlar; soğuğa maruz kalmak ve besin yoksuludur.

Çevresel çalışmalar, sucul ortamlardan alınan numunelerde kültürel yöntemler ve PCR teknikleri ile *Arcobacter* tespitinde farklı sonuçlar bulunduğunu ortaya koymuştur. Kısacası

PCR ile pozitif olduğu saptanan bazı örneklerde kültürel yöntemler ile bakteri izolasyonu gerçekleştirilememiştir. Bu bilgilerin ışığında bazı *Arcobacter*'lerin sucul ortamlarda VBNC formunda bulunabileceğini akıllara getirmiştir. Yapılan araştırmalara göre, patojenik bakterilerin VBNC durumunda kendi virulans faktörlerini ve yeniden üreyebilme yeteneklerini korudukları bildirilmiştir. *Arcobacter*'lerin bir ortamda hayatta kalma stratejilerinin bilinmesi hem su kalitesinin kontrolü hem de hastalığın bulaşmasının anlaşılması açısından çok önemlidir (Fera, vd., 2008; Ayaz ve Erol, 2004).

Fera ve arkadaşları (2008) deniz suyu mikrokosmlarında *Arcobacter*'leri iki farklı sıcaklıkta inkübe etmiş (20 gün 4°C 'de ve 14 gün oda sıcaklığında) ve *A.butzleri*'nin VBNC formunda geliştiğini göstermiştir. VBNC formundaki bu *A.butzleri* hücreleri 270 gün besin ilave edilmesinin ardından kültüre edilebilen formalarını geri kazanmışlardır. Bu çalışmada *A.butzleri*'nin besinlerin yokluğunda deniz suyunda hayatta kalmak için bazı stratejiler geliştirdiği ve uygun koşullar bulunana kadar ortamda VBNC durumda varlığını sürdürdüğü belirlenmiştir.

## **1.5. Fiziksel ve Kimyasal Ajanlara Duyarlılık**

### **1.5.1. Dezenfektanlar**

Dezenfektanlar, hemen hemen tüm patojenik mikroorganizmaları inaktif etmek için kullanılan kimyasal maddelerdir.

Dezenfektanların etki mekanizmasının kullanılan biyosit tipine bağlı olduğu sayısız araştırmada bildirilmiştir (McDonnell ve Russell 1999). Dezenfeksiyon tedavileri yüzeylerin biyokontaminasyonunu kontrol etmek için, tıbbi, endüstriyel ve evsel ortamlarda kullanılmaktadır. Bu biyosit tedavilerinin çoğu yüzey kontaminasyonunu ortadan kaldırırsa da, bazı mikroorganizmaların hayatta kalarak halk sağlığı açısından önemli sorunlara yol açabileceği bildirilmiştir (Bridier, vd., 2011).

*Arcobacter* türlerinin mezbahalarda bulunma sıklığının yüksek yaygınlıkla dezenfeksiyon işleminde yapılan hatalardan kaynaklandığı bildirilmiştir. *A.butzleri*'nin paslanmaz çelik yüzeylere yapıştığında ve % 5etanol içeren kültür içinde hayatta kalabildiği gözlemlenmiştir. Yeni yapılan bir çalışmada *A.butzleri* izolatlarının Sodyum hipoklorit konsantrasyonlarını tolere edebildiği bildirilmiştir. Kesimhanede, PCR ile %20 oranında tespit edilen *Arcobacter*'lerin, 200 -500 ppm aktif chlorine içeren hipoklorid ile yapılan temizlik

işlemi sonrasında %2.5 oranında düştüğü saptanmış ve bu oranlarda uygulanan hipkloridin *Arcobacter* türlerini tamamen temizleyemediği vurgulanmıştır (Rasmussen, vd., 2013).

Rice ve ark.(1999) yaptıkları inaktivasyon deneyleri sonucunda *A.butzleri*'nin klora karşı duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir.

Shah ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, incelenen su örneklerinin % 11.11'i *Arcobacter* için pozitif bulunmuştur. Sudaki kontaminasyonun suyun ya da su borularının hatalı dezenfeksiyonundan kaynaklandığı bildirilmiştir. Bu nedenle insan ve hayvanlara *Arcobacter* bulaşma riskinin en aza indirilmesi için suyun uygun şekilde klorlanması gerektiği belirtilmiştir.

### **1.5.2. Antibiyotikler**

Antibiyotikler bakterilerin çoğalmasını engelleyen (bakteriyostatik) ya da bakterileri öldüren (bakteriyosidal) biyolojik kaynaklı veya sentetik olarak elde edilen maddelerdir .

Antibiyotiklerin keşfi Alexander Fleming 1928 yılında penisilini bulmasıyla başlamıştır. Bunu takiben antibakteriyel tedavi 1935 yılında Domagk'ın sulfonamidleri tedavide kullanmasıyla gelişmeye başlamıştır. 1929'da Fleming'in gözlemlediği ve 1940'da Chain ve Flarey'in *Penicillium notatum*'dan elde ettiği bir maddenin bakteriler üzerine öldürücü etkisinin belirlenmesi ile antibiyotikler üzerindeki çalışmalar artış göstermiştir (Çiftci ve Aksoy, 2015).

#### **1.5.2.1. Antibiyotik direnci**

Bakteriler çevrelerinde meydana gelen değişikliklere hızla uyum sağlayabilen canlılardır. Antibiyotik direnci de bunun bir örneğidir. Antibiyotik direnci, patojen mikroorganizma ve suşun, kemoterapötik maddelerin kullanıldığı doz aralığında meydana getirmiş olduğu etkili ilaç yoğunluğundan etkilenmemesidir. Bu direnç doğal olabildiği gibi, kromozomal genlerde meydana gelen mutasyon veya kromozom dışı (plazmid, transpozon) genetik materyalin kazanılması sonucu da meydana gelebilmektedir. Bir antibiyotiğe dirençli mikroorganizma benzer yapı ve etki şekline sahip diğer antibiyotiklerle çapraz direnç gösterebilir. Ayrıca bir mikroorganizma sahip olduğu direnci çeşitli yollarla diğerlerine aktarabilir (Daş ve Atmaca, 2015).

*Arcobacter* türlerinin antibiyotiklere direnci üzerine yapılmış çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Atabay ve Aydın; 39 *Arcobacter* izolatına (broyler) antibiyotik duyarlılık testleri uygulamışlardır. Yapılan çalışmada, tüm izolatların sefuroksim sodyum, aztreonam,

sefalotin, orbenin, amoksisilin, penisilin G ve trimetoprim / sulfametoksazole dirençli bulunmuştur. Test edilen 39 izolatın 26'sı amoksisilin, amoksilin / klavulanik asit ve ampisiline dirençli olduğu ve izolatlardan birinin eritromisine tam direnç gösterdiğini belirtmişleridir. Bütün örnekler; amikasin, kloramfenikol, danofloksasin, enrofloksasin, nitrofurantoin, nalidiksik asit, tetrasiklin ve tobramisine duyarlı bulunmuştur (Atabay ve Aydin, 2001).

Fera ve arkadaşları (2003) Messina yakınlarındaki tuzlu su ortamından izole ettikleri *A.butzleri* ve *A.cryaerophilus* suşlarını antibiyotik duyarlılığı yönünden incelemişlerdir. İzole edilen *Arcobacter* suşlarının ampisilin, amoksisilin ve piperasiline karşı yüksek düzeyde antimikrobiyal direnç gösterdiği saptanmıştır. Tüm *A.butzleri* izolatlarına karşı bir sefalosporin antibiyotik türevi olan sefepimin yüksek düzeyde etkin olduğu (MIC<sub>90</sub> 8mg/l) ve *A. cryaerophilus* izolatlarına karşı sefepimin MIC<sub>90</sub> değerinin 64 mg / l olduğu tespit edilmiştir. İmipenemin hem *A.butzleri* hem de *A. cryaerophilus* izolatlarına karşı en etkin antimikrobiyal madde olduğu saptanmıştır. *A.butzleri* suşlarının meropeneme *A.cryaerophilus* suşlarından daha duyarlı olduğu bulunmuştur. Test edilen iki türden *A.butzleri*'nin florokinolonlara daha az duyarlı olduğu saptanmıştır. *A.butzleri* izolatlarının florokinolon grubu antibiyotiklere duyarlılıkları açısından farklar bulunmaktadır. Etkenlerin norfloxacin, ciprofloxacine, difloxacine ve marbofloxacine duyarlılığı enrofloksasine göre daha baskındır. *A. cryaerophilus*'a karşı en iyi performans gösteren florokinolonların levofloksasin ve marbofloksasin olduğu saptanmıştır. Tüm *A. cryaerophilus* suşları amikasine tamamen duyarlı iken *A.butzleri suşları*'nın amikasine duyarlılığının daha düşük seviyelerde görüldüğü saptanmıştır. Test edilen *A.butzleri* izolatlarında klindamisin, kloramfenikol, trimetoprim ve vankomisine yüksek oranda direnç gösterdiği belirlenmiştir. Rokitamisin için, belirleyici bir değerin bulunmadığı ancak *A.butzleri* ve *A. cryaerophilus* için MIC<sub>90</sub> değerinin 128 mg / l 'den fazla olduğu bildirilmiştir.

Doksanüçoğlu (2006), tarafından yapılan antibiyotik duyarlılık testi sonucunda, tavuk eti örneklerinden izole edilen 49 *A.butzleri* izolatının sefalotin ve vankomisine tam direnç gösterdiği, gentamisin ve tetrasikline ise tam duyarlı olduğu saptanmıştır. Bu izolatların, eritromisine, kloramfenikole, nalidiksik aside ve ampisiline belli oranlarda dirençli olduğu tespit edilmiştir. Yine tavuk eti örneklerinden izole edilen *A. cryaerophilus*'un ise, ampisilin, eritromisin, gentamisin, kloramfenikol, nalidiksik asit ve tetrasikline karşı tam duyarlı olduğu vankomisine ise tam direnç gösterdiği saptanmıştır. Sefalotine ise belli oranda direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

Ünver ve Atabay (2008), Kars'ta yaptıkları çalışmada yerli kazların kloaklarından toplanan 90 örnekte *A. cryaerophilus* (7), *A. skirrowii* (7), ve *A.butzleri* (2) de dahil olmak

üzere toplam 16 *Arcobacter* türü izole etmişler ve bu türleri 20 farklı antibiyotiğe karşı duyarlılıkları açısından incelemişlerdir. Elde edilen izolatların tümünün kloksasilin, sefazolin, optokine, vankomisin ve fusidik asite dirençli, oksitetrasiklin, nitrofurantoin, amikasin (*A. skirrowii*'nin 1 suşu hariç) ve ofloksasine (*A. cryaerophilus*'un 1 suşu hariç) duyarlı olduğunu saptamışlardır. Tüm *Arcobacter* izolatlarının; *A. cryaerophilus*'un bir suşu hariç enrofloksasine duyarlı olduğu ve hem *A. skirrowii* suşları hem de *A. cryaerophilus* (1 suş hariç) suşlarının amoksisiline karşı duyarlı olduğunu saptamışlardır. Bununla birlikte *A. butzleri* izolatının referans suşu da dahil olmak üzere amoksisiline dirençli olduğunu saptamışlardır. *A. cryaerophilus*'un 1 suşu hariç olmak üzere, hem *A. cryaerophilus* hem de *A. skirrowii* ampisiline dirençli bulunurken, *A. butzleri*'nin 2 kaz izolatlarından 1 tanesinin bu antibiyotiğe karşı duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir.

Shah ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, *A. butzleri*'nin en yüksek direnci ampisilin/sefotaksim ve siprofloksasin olarak belirlenirken en az direnç gentamisin ve enrofloksasin olarak saptanmıştır.

Ferreira ve arkadaşlarının (2013) Portekiz'de yaptıkları çalışmada mezhabalardan, kümes hayvanlarından ve çevreden izole ettikleri 43 *A. butzleri* örneğine antimikrobiyal duyarlılık testleri uygulayarak dokuz antibiyotiğe karşı dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. Biri hariç tüm izolatların (%97.7), en az altı antimikrobiyal maddeye eş zamanlı direnç gösterdiği saptanmıştır. (ampisilin, vankomisin, trimetoprim, piperasilin, sefoperazon ve amoksisilin). Ayrıca, bir suşta kloramfenikol direnci, 43 izolatın (% 55.8) 24'ünde siprofloksasin direnci tespit edilmiştir. Elde edilen izolatların tümünün gentamisine duyarlı olduğu saptanmıştır.

Rahimi (2014) tarafından İran' da yapılan bir çalışmada, 540 kanatlı eti örneğinin 71'inde (%13.1) *Arcobacter* spp. tespit edilmiştir. Tespit edilen 71 *Arcobacter* izolatının bir veya daha çok antimikrobiyal ajana dirençli olduğu belirlenmiştir. *Arcobacter* izolatlarının yüksek oranda sefalotin, vankomisin, metisilin, azitromisin, klindamisin ve ampisiline daha düşük oranda ise nalidiksik asit, kloramfenikol, eritromisin ve siprofloksasine karşı direnç gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca tüm *Arcobacter* türlerinin gentamisin, streptomisin, tetrasiklin ve kanamisine, *A. skirrowii* izolatlarının ise azitromisin, klindamisin, kloramfenikol, nalidiksik asit ve siprofloksasine duyarlı olduğu bulunmuştur.

## 2.TEŞHİS

*Arcobacter* türlerinin gıdalarda, çevresel ve klinik örneklerde varlığını belirlemek için hızlı ve özgün izolasyon ve identifikasyon yöntemleri geliştirilmiştir.

### 2.1. İzolasyon

*Arcobacter* türlerini izole etmek için Arcobacter Enrichment Broth (AEB), modifiye Cefoperazone Amfoterisin Teikoplanin agar (CAT), Modified Charcoal Cefoperazone Desoxycholate Agar (mCCDA), Cefsulodin – Irgasan – Novoniosin (CIN) agar, Johnson ve Murano (JMEB) agar ve broth gibi katı, yarı katı yada sıvı besiyerleri kullanılmaktadır. CIN (cefsulodin-irgasan-novobiocin) agar *Yersina* türleri için seçici olduğu halde, domuz eti örneklerinde ve insanlarda enterit olgusuna sebep olan *Arcobacter* türlerinin belirlenmesinde de kullanılmıştır (Corry ve Atabay, 1997, 1998; Ridsdale, vd., 1999; Ertaş, 2009).

*Arcobacter* izolasyonu amacıyla uygulanan bir diğer yöntem de membran filtrasyon tekniğidir. Ön zenginleştirmeyi takiben uygulanan bu metot *Arcobacter* türlerinin hareket yeteneklerini kullanarak membran filtreden geçmesi esasına dayanmaktadır. Bu teknik kontamine mikroorganizmaları bloke ederken aynı zamanda arkobakterlerin izolasyonunu kolaylaştırmaktadır (Collins, vd., 1996; Tazegül, 2010).

Ellis ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada *Leptospira* izolasyonu amacıyla kullanılan 100µg/ml 5-flourourasil saplementli *Leptospira* medium EMJH-P80'i kullanarak vibrio-benzeri mikroorganizmalar izole etmişlerdir. Bu, 5-folurourasil ile desteklenmiş yarı katı besiyeri doğal olarak aborte domuz dokularından *Arcobacter* spp.'yi zenginleştirmek için kullanılmaktadır. EMJH-P80 besiyerinin kullanımı, *Leptospira* spp.'nin izolasyonu için kullanılan diğer selektif besiyerlerinin, et örneklerinden *Arcobacter* spp. izolasyonu için uygun olabileceğini göstermiştir (Collins, vd., 1996; Atabay ve Corry, 1998; Tazegül, 2010).

Houf ve arkadaşları (2001) yaptıkları bir çalışmada, içerisinde amfoterisin B (10mg/), sefoperazon (16mg/L), 5-flourourasil (100mg/L), novobiosin (32mg/L) ve trimetoprim (64mg/L) nin bulunduğu yeni bir izolasyon yöntemi bildirmişlerdir. Bu yeni izolasyon yönteminde, selektif saplementli Arcobacter broth içerisinde zenginleştirilen örnekler mikroaerobik koşullar altında, 28 C'de, 24-48 saat inkübe edilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda yumurta tavuklarının boyun derilerinden alınan 34 örneğin tamamından (%100) ve broylerlerden alınan 71 tane benzer örneğin % 90'ından *Arcobacter*'ler izole edilmiştir. Bu yeni

izolasyon yöntemi kümes hayvanlarından *Arcobacter* türlerinin izolasyonu için hızlı ve güvenilir bir metot olduğunu kanıtlamakta ve daha kapsamlı epidemiyolojik araştırmalara katkıda bulunabilmektedir.

Eifert ve arkadaşları (2003) yaptıkları bir çalışmada, 3, 5 veya 7 haftalık tavuklardan aldıkları kloakal swab örnekleri, dışkı örnekleri ve çevresel yüzey swab örneklerini incelemiştir. Bu örneklerin izolasyon işlemleri için Johnson-Murano enrichment broth (JMEB) kullanmışlardır. Tüpler 30°C'de 24 saat inkübe edilmiş ve identifikasyon için de PCR tekniği uygulanmıştır. Çalışma sonunda alınan tüm örneklerde *A.butzleri* izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Rivas ve arkadaşları (2003) tavuk, domuz, sığır ve kuzu kıymalarında *Arcobacter* yaygınlığını tespit etmek için yaptıkları çalışmada, örnekleri sefoperazon, amfoterisin ve teikoplanin (CAT) saplement içeren *Arcobacter* broth (AB) içinde zenginleştirmişlerdir. Örnekler kanlı ve selektif agarda izole edilmiş ardından m-PCR tekniği ile identifiye edilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda kıyma örneklerinde sadece *A.butzleri* izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Atabay ve arkadaşları (2007) Kars'ta yetiştirilen sağlıklı yerli kazların kloaklarından alınan örnekleri incelemiştir. *Arcobacter* türlerini daha geniş bir yelpazede izole etmek için *Arcobacter* enrichment broth (AEB) ile zenginleştirdikten sonra selektif olmayan bir kanlı agarda membran filtrasyon tekniği uygulamışlardır. Daha sonra izolatları m-PCR analizi yapılarak tür düzeyinde belirlenmeleri sağlanmıştır. Çalışma sonunda *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* ve *A.butzleri* izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 2.1.** *Arcobacter* türlerinin izolasyonu (Kayman 2012).

| <b>ÖN ZENGİNLEŞTİRME</b>    |                                                                                                       |                                      | <b>İZOLASYON</b>                          |                                                                                                      |                                                 | <b>Rf.</b> |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------|
| <b>Besiyeri</b>             | <b><i>İçerdiği antimikrobiyal (mg/litre)</i></b>                                                      | <b><i>İnkübasyon</i></b>             | <b><i>Pasaj yapılan katı besiyeri</i></b> | <b><i>İçerdiği antimikrobiyal (mg/litre)</i></b>                                                     | <b><i>İnkübasyon</i></b>                        |            |
| EMJBH                       | 5-Florourasil (100)                                                                                   | 30°C,<br>48-72 saat,<br>mikroaerobik | Kanlı<br>agar                             | Antibiyotik<br>içermiyor                                                                             | 30°C,<br>48-72 saat,<br>mikroaerobik<br>aerobik | 1          |
| ASB                         | Sefoperazon (32)<br>Piperasilin (75)<br>Trimetoprim (20)<br>Sikloheksimid (100)                       | 24°C,<br>48 saat,<br>aerobik         | ASM                                       | Sefoperazon (32)<br>Piperasilin (75)<br>Trimetoprim (20)<br>Sikloheksimid (100)                      | 24°C,<br>48 saat, aerobik                       | 2          |
| EMJH                        | 5-Florourasil (200)                                                                                   | 30°C,<br>9 gün,<br>aerobik           | CVA                                       | Sefalotin (20)<br>Vankomisin (10)<br>Amfoterisin B (5)                                               | 30°C,<br>48-72 saat,<br>mikroaerobik            | 3          |
| CAT<br>buyyon               | Sefaperazon (8)<br>Amfoterisin B (10)<br>Teikoplanin (4)                                              | 30°C,<br>48 saat,<br>mikroaerobik    | Kanlı<br>agar                             | Antibiyotik<br>içermiyor.<br>Membran<br>filtrasyon yöntemi                                           | 30°C,<br>7 güne kadar,<br>aerobik               | 4          |
| JMEB                        | Sefaperazon (32)<br>5-Florourasil (200)                                                               | 30°C,<br>48 saat,<br>aerobik         | JMEB<br>agar                              | Sefaperazon (32)                                                                                     | 30°C,<br>48 saat, aerobik                       | 5          |
| <i>Arcobacter</i><br>buyyon | Sefaperazon (16)<br>Amfoterisin B (10)<br>Trimetoprim (64)<br>Novobiosin (32)<br>5-Florourasil (100)  | 28°C,<br>48 saat,<br>mikroaerobik    | <i>Arcobacter</i><br>besiyeri             | Sefaperazon (16)<br>Amfoterisin B (10)<br>Trimetoprim (64)<br>Novobiosin (32)<br>5-Florourasil (100) | 30°C,<br>24-72 saat,<br>mikroaerobik            | 6          |
| Brucella<br>buyyon          | Sefoperazon (25)<br>Piperasilin (75)<br>Trimetoprim (20)<br>Sikloheksimid (100)<br>Amfoterisin B (10) | 25°C,<br>24 saat,<br>mikroaerobik    | ASM                                       | Sefoperazon (32)<br>Piperasilin (75)<br>Trimetoprim (20)<br>Sikloheksimid (100)                      | 25°C,<br>3 gün<br>mikroaerobik                  | 7          |

EMJH:Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris, CAT:Sefoperazon-Amfoterisin B-Teikoplanin, JMEB: Johnson-Murano broth, ASB: Arcobacter selective broth, ASM: Arcobacter selective medium, CVA: Cephalotin Vancomycin Amphotericin B agar, 1.(Ellis, vd., 1977), 2.(de Boer, vd., 1996), 3.(Collins, vd., 1996), 4.(Atabay ve Corry 1997), 5.(Johnson ve Murano 1999) 6.(Houf, vd., 2001) 7.(Vandenberg, vd., 2004)

## 2.2. İdentifikasyon

### 2.2.1. Fenotipik tanı

Bazı suşların atipik reaksiyon göstermesi ve değişken özelliğe sahip olması nedeniyle, standart biyokimyasal testler kullanılarak *Arcobacter* cinsi içinde farklı türlerin belirlenmesi zorlaşmaktadır. Bu testler *Arcobacter* türlerinde çoğunlukla negatif veya değişken sonuçlar vermektedir (Collado ve Figueras, 2011).

**Çizelge 2.2.** *Arcobacter* cinsinde yer alan türlerin fenotipik özellikleri.

|                           | <i>A. butzleri</i> | <i>A. cryaerophilus</i> | <i>A. nitrofigilis</i> | <i>A. skirrowii</i> | <i>A. halophilus</i> | <i>A. cibarius</i> | <i>A. mytili</i> | <i>A. thereus</i> | <i>A. trophiarum</i> | <i>A. marinus</i> | <i>A. defluvi</i> | <i>A. ellisi</i> | <i>A. bvalviorum</i> | <i>A. venerupis</i> | <i>A. anaerophilus</i> | <i>A. cloace</i> | <i>A. suis</i> | <i>A. molluscorum</i> | <i>A. ebronensis</i> | <i>A. aquimarinus</i> | <i>A. lanthieri</i> | <i>A. valdiviensis</i> |
|---------------------------|--------------------|-------------------------|------------------------|---------------------|----------------------|--------------------|------------------|-------------------|----------------------|-------------------|-------------------|------------------|----------------------|---------------------|------------------------|------------------|----------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|------------------------|
| Üreme                     |                    |                         |                        |                     |                      |                    |                  |                   |                      |                   |                   |                  |                      |                     |                        |                  |                |                       |                      |                       |                     |                        |
| 15°C                      | +                  | +                       | +                      | *                   | *                    | *                  | *                | *                 | *                    | +                 | *                 | *                | *                    | *                   | -                      | *                | *              | *                     | -                    | *                     | *                   | *                      |
| 25°C                      | +                  | +                       | +                      | +                   | +                    | +                  | +                | +                 | +                    | +                 | +                 | +                | +                    | +                   | -                      | +                | +              | +                     | -                    | +                     | +                   | +                      |
| 30°C                      | +                  | +                       | +                      | +                   | +                    | +                  | +                | +                 | +                    | +                 | +                 | +                | +                    | +                   | -                      | +                | +              | +                     | +                    | +                     | +                   | +                      |
| 37°C, aerobik             | +                  | d                       | d                      | +                   | +                    | -                  | +                | *                 | -                    | +                 | +                 | +                | +                    | +                   | -                      | +                | -              | +                     | -                    | +                     | +                   | -                      |
| 37°C, anaerobik           | +                  | d                       | +                      | +                   | +                    | +                  | +                | *                 | -                    | -                 | d                 | *                | *                    | +                   | -                      | -                | -              | -                     | -                    | +                     | *                   | *                      |
| 37°C, mikroaerobik        | +                  | d                       | -                      | +                   | +                    | +                  | +                | -                 | -                    | +                 | d                 | +                | *                    | +                   | -                      | +                | -              | +                     | -                    | +                     | *                   | *                      |
| 42°C, mikroaerobik        | d                  | d                       | -                      | d                   | -                    | -                  | *                | *                 | -                    | -                 | +                 | *                | +                    | +                   | -                      | -                | -              | -                     | -                    | -                     | *                   | *                      |
| Oksidaz                   | +                  | +                       | +                      | +                   | +                    | +                  | +                | +                 | +                    | +                 | +                 | +                | +                    | +                   | +                      | +                | +              | +                     | +                    | +                     | +                   | +                      |
| Katalaz                   | *                  | +                       | +                      | +                   | -                    | +                  | +                | +                 | +                    | -                 | +                 | +                | +                    | +                   | -                      | +                | +              | +                     | -                    | +                     | +                   | +                      |
| Üreaz                     | -                  | -                       | +                      | -                   | -                    | -                  | -                | -                 | -                    | -                 | +                 | *                | +                    | +                   | -                      | -                | -              | -                     | +                    | *                     | -                   | -                      |
| Nitrat redüksiyonu        | +                  | -                       | +                      | +                   | +                    | -                  | -                | +                 | -                    | -                 | +                 | +                | -                    | +                   | +                      | +                | +              | +                     | -                    | +                     | +                   | -                      |
| İndoksil asetat hidrolizi | +                  | +                       | +                      | +                   | +                    | +                  | -                | +                 | +                    | +                 | +                 | +                | +                    | +                   | +                      | +                | +              | -                     | +                    | +                     | +                   | +                      |

+, pozitif, -, negatif, d; değişken, \*, bilinmiyor

### 2.2.2. Moleküler tanı

Moleküler tanı yöntemlerinin çoğu konvansiyonel kültür yöntemleri için gereken süreyi azaltıp duyarlılığı arttırmak amacıyla geliştirilmiştir.

#### 2.2.2.1. PCR

Polimeraz zincir reaksiyonu moleküler biyolojide kullanılan, spesifik bir DNA molekülünün belirli bir segmentinin amplifiye edilmesi ve enzimatik olarak sentezlenmesi

şeklinde tanımlanan bir in vitro DNA replikasyon tekniğidir (Shams El-Din 2013). Polimeraz zincir reaksiyonunun doğal spesifitesi, yüksek duyarlılığı ve hızlılığı yaygın olarak gıda, su ve çevresel örneklerde mikroorganizma türlerini tespit etmek için, uygun mikrobiyolojik kültür yöntemlerine bir alternatif olarak uygulanmıştır (Gonzalez, vd., 2000).

Fenotipik testlerle *Arcobacter* türlerinin belirlenmesi zordur. Bunun nedeni ise, *Arcobacter* türlerinin *Campylobacter* türleriyle kolayca karışabilmesidir. Bu karışıklığı ortadan kaldırmak için *Arcobacter* türlerinin moleküler tanısı yapılabilmektedir. Bunların başında konvansiyonel PCR teknikleri gelmektedir. Çoğaltılması istenilen DNA dizisinin bulunduğu durumlarda kullanılan moleküler yöntemler; Multipleks PCR, Real-Time PCR, Revers Transkripsiyon PCR, Nested-PCR'dır. Bu yöntemlerden bazıları (Levican ve Figueras, 2013);

### **Multipleks PCR (m-PCR)**

*Arcobacter* türlerinin belirlenmesi ve identifikasyonu amacıyla PCR teknikleri geliştirilmiştir. Bu tekniklerden 16S ve 23S rRNA genlerini hedef alan m-PCR tekniği farklı *Arcobacter* türlerinin eş zamanlı olarak belirlenmesi ve identifikasyonu için geliştirilen bir PCR tekniğidir.

Bakteriyemi ve insanlarda ishal hastalığına *Arcobacter butzleri* ve *Arcobacter cryaerophilus*'un neden olduğu ve bu mikroorganizmaların çiftlik hayvanlarında, sularda ve hayvan kaynaklı gıdalarda tespit edildiği bildirilmiştir. Yapılan araştırmalar ile Multipleks PCR ile bu hastalık etmenlerinin tanımlanması ve teşhisi sağlanmıştır (Akıncıoğlu, 2011; Sevindik, vd., 2013).

Rice ve arkadaşları (1999) tarafından yapılan bir çalışmada yeraltı suyundan alınan örneklerin, PCR ile *Arcobacter* cinsine ait olduğu tespit edilmiş ve izolatlar m-PCR yöntemi ile *A.butzleri* olarak identifiye edilmiştir.

Houf ve arkadaşları (2000) *A.butzleri*, *A. cryaerophilus* ve *A. skirrowii*'nin eş zamanlı identifikasyonu için 16S ve 23S rRNA genlerini hedef alan primerler ile türlerin her bir bant amplifiyesi için bir m-PCR tekniği bildirmişlerdir

Ünver ve arkadaşlarının (2006) yaptıkları bir çalışmada atık kuzu örneğinden *Arcobacter* benzeri mikroorganizmalar izole edilmiş ve bu izolatlar *Arcobacter* yönünden m-PCR ile incelenmiştir.

Gonzalez ve arkadaşlarının (2007) yaptıkları çalışmada, tavuk ciğeri, tavuk karkası ve atık su örnekleri incelenmiştir. Uygulanan m-PCR işlemi sonunda atık su örneklerinden *A.butzleri* ve *A. cryaerophilus*, tavuk örneklerinden ise sadece *A.butzleri* suşu identifiye edilmiştir.

Ertaş ve Doğruer (2009) tarafından yapılan çalışmada, sığır ve koyun kıyma örneklerine uygulanan m-PCR işlemi sonucunda *A.butzleri* ve *A.skirrowi* identifiye edilmiştir.

Tazegül (2010), farklı su kaynaklarından topladığı örnekleri *Arcobacter* yönünden incelemiştir. İncelenen örneklerin tamamı *Arcobacter butzleri* olarak identifiye edilmiştir.

### **Real-Time PCR**

Real – Time PCR amplifikasyon ürünlerinin gözlemlenmesini sağlayan boyalar ya da floresan probalar kullanılarak gerçek zamanlı olarak DNA'nın belirlenmesi ve miktarının gösterilmesi tekniğidir.

Abdelbaqi ve arkadaşları (2007), flüoresan rezonans enerji transferi teknolojisini kullanarak, prob hibridizasyon yöntemi ve erime eğrisi analizi ile türleri identifiye etmişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda *A.butzleri*, *A.cryaerophilus*, *A.cibarius* ve *A.nitrofigilis* türlerinin karakteristik erime sıcaklıklarına karşılık gelen erime noktaları anlamlı farklılıklar göstermiştir.

Ramees ve arkadaşları (2014), farklı kasaplardan topladıkları tavuk eti örneklerini Real-Time PCR tekniğini kullanarak *Arcobacter* varlığı yönünden incelemişlerdir. İncelenen örneklerin bir kısmı *Arcobacter* spp. için pozitif bulunmuştur.

### **2.2.3. Genotiplendirme**

*Arcobacter* türünün bir suşunu diğerinden ayırt etmek, bulaşma yollarını incelemek ve salgın kaynaklarını takip etmek amacıyla González ve arkadaşları (2012) tarafından derlenen, ERIC-PCR (Tekrarlayan enterobakteriyel intergenik konsensüs), RAPD-PCR (rastgele amplifiye edilen polimorfik DNA), AFLP (Amplifiye parça uzunluk polimorfizm analizi), PFGE (Pulsed-Field Jel Elektroforezi), MLST (Multilokus dizi tiplendirme) ve genomik sekansların tamamı da dahil olmak üzere birçok farklı yöntem kullanılmaktadır. *Arcobacter* türlerinin tanımlanması için kullanılan genotiplendirme yöntemleri Çizelge 2.3.'te verilmiştir.

**Çizelge 2.3.** *Arcobacter* spp. izolatların tanımlanması için kullanılan genotipleme yöntemleri.

| Yöntem                   | Kullanılan alan                     | Türler                                             | Referans              |
|--------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------|
| <b>AFLP</b>              | Epidemiyolojik                      | <i>A.butzleri</i> ve <i>A.cryaerophilus</i>        | (Scullion, vd., 2001) |
|                          | çalışmalar,                         | <i>A.cryaerophilus</i> türüne ait                  | (On, vd., 2003)       |
|                          | Yeni türlerin tanımlanması          | <i>farklı alt gruplar</i>                          | (Hume, vd., 2001)     |
| <b>PFGE</b>              | Salgınların izlenmesi ve            | <i>A.butzleri</i> ve <i>A.cryaerophilus</i>        | (Shah, vd., 2012)     |
|                          | neden olan kaynakların belirlenmesi |                                                    | (Lucia, vd., 2004)    |
| <b>MLST</b>              | Suşların ayırt edilmesi;            | <i>A.butzleri</i> ve <i>A.cryaerophilus</i>        | (Miller, vd., 2009)   |
|                          | Epidemiyolojik çalışmalar           | <i>A.skirrowii</i> , <i>A.thereius</i> , <i>A.</i> |                       |
|                          | İzolatların çeşitliliği             | <i>cibarius A.butzleri</i>                         |                       |
| <b>RAPD-PCR</b>          | Aynı örnekte, birden fazla          | <i>A.butzleri</i> , <i>A.cryaerophilus</i> ve      | (Houf, vd., 2002)     |
|                          | türün genotip tanımlanması          | <i>A.skirrowii</i>                                 | (Merga, vd., 2013)    |
| <b>ERIC-PCR</b>          | Suşların ayırt edilmesi;            | <i>A.butzleri</i> , <i>A.cryaerophilus</i> ve      | (Houf, vd., 2002)     |
|                          | Epidemiyolojik çalışmalar           | <i>A.skirrowii</i>                                 | (Ho, vd., 2008)       |
| <b>Genomik sekanslar</b> | Fenotipik farklılıklar              | <i>A.butzleri</i>                                  | (Merga, vd., 2013)    |

### 3. MATERİYAL

#### 3.1. Numuneler

Çalışmada, Kütahya ilinde, Ocak 2014- Şubat 2015 tarihleri arasında farklı parekende satış noktalarından toplanan 35 adet kıyma, 35 adet tavuk kanat derisi ve 35 adet peynir örneği ile farklı lokasyonlardan toplanan 10 adet su örneği soğuk zincir altında laboratuvara getirildi ve hemen izolasyon prosesine başlandı.

**Çizelge 3.1.** Toplanan su örneklerinin lokasyonları sayıları ve örnekleme zamanları.

| Alınan lokasyon   | Örneğin cinsi | Toplanma tarihi | Örnek sayıları |
|-------------------|---------------|-----------------|----------------|
| Söğütlü Çeşmesi   | Yalak suyu    | Mart 2014       | 2              |
| Alaattin Çeşmesi  | Yalak suyu    | Mart 2014       | 1              |
| Aslan Çeşmesi     | Yalak suyu    | Mart 2014       | 1              |
| Laleli Çeşmesi    | Yalak suyu    | Mart 2014       | 1              |
| Meydan Mahallesi  | Çeşme suyu    | Mart 2014       | 2              |
| DPU Gölet         | Göl suyu      | Nisan 2014      | 1              |
| Aslanapa/Bezirgan | Kuyu suyu     | Nisan 2014      | 1              |
| Aslanapa Çayı     | Çay           | Nisan 2014      | 1              |

#### 3.2. Besiyerleri

##### Blood Agar Base No:2

| Bileşimi             | gr/lt   |
|----------------------|---------|
| Peptone              | 15 gr   |
| Liver digest         | 2,5 gr. |
| Yeast Extract        | 5 gr    |
| NaCl                 | 5 gr    |
| Agar                 | 12 gr   |
| pH 7,4 ± 0,2 at 25°C |         |

*Arcobacter* spp. izolasyonu için selektif katı besiyeri olarak kullanıldı.

### Hazırlanışı

Blood Agar'dan 20 gram tartılıp 500ml distile su içerisinde çözdürüldü. Daha sonra 121°C'de 15 dakika otoklavda tutularak sterilize edildi. 50°C'ye kadar soğuması beklenerek içerisine % 5 oranında koyun kanı ilave edildi. Hazırlanan koyun kanlı agardan steril petrilere aseptik koşullarda 25'er ml döküldü. Petriler oda ısısında 24 saat kontrol için bekletildikten sonra izolasyon çalışması doğrultusunda kullanıldı.

### Arcobacter Enrichment Broth (AEB)

| Bileşimi             | gr/lt |
|----------------------|-------|
| Pepton               | 18 gr |
| Yeast extract        | 1 gr  |
| NaCl                 | 5 gr  |
| pH 7,2 ± 0,2 at 25°C |       |

### Hazırlanışı

Arcobacter broth 6 gr. tartılıp 250ml distile su içinde çözdürüldü. Daha sonra 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildi. 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine, 4ml steril suda çözündürülmüş CAT saplamentinden (LAB M X112) 2ml ilave edildi. Elde edilen AEB steril tüplere 9'ar ml dağıtıldı ve zenginleştirme için kullanıma hazır hale getirildi.

### Mueller Hinton Broth (MHB)

| Bileşimi             |          |
|----------------------|----------|
| Et infüzyonu         | 300 g/L  |
| Kazein hidrolizat    | 17,5 g/L |
| Nişasta              | 1,5 g/L  |
| pH 7,3 ± 0,1 at 25°C |          |

### Hazırlanışı

Muller Hinton broth 10.5 gr. tartılıp 500ml distile su içinde çözdürüldü. Ardından 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildi. 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril tüplere aseptik koşullarda 25'er ml MHB döküldü. Tüpler biyofilm çalışması için kullanıma hazır hale getirildi.

### **Mueller Hinton Agar (MHA)**

#### **Bileşimi**

|                      |          |
|----------------------|----------|
| Et infüzyonu         | 300 g/L  |
| Kazein hidrolizat    | 17,5 g/L |
| Nişasta              | 1,5 g/L  |
| Agar                 | 17 g/L   |
| pH 7,3 ± 0,1 at 25°C |          |

#### **Hazırlanışı**

Mueller Hinton agar 17 gr. tartılıp 500ml distile su içinde çözdürüldü. Ardından 121°C’de 15 dakika otaklavda steril edildi. 50°C’ ye kadar soğutulduktan içerisine % 5 oranında koyun kanı ilave edildi. Steril petrilere aseptik koşullarda 25’er ml MHA döküldü. Petriler oda ısısında 24 saat kontrol için bekletildikten sonra antibiyotik duyarlılığını belirlemek amacıyla kullanıma hazır hale getirildi.

### **3.3. Gram Boyamada Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Gram boyama yönteminde kristal viyole, gram iyot eriyiği (lugol), etil alkol, sulu fuksin (safranin) kullanıldı.

#### **Kristal viyole**

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Kristal viyole    | 0.5gr. |
| %5’lik etil alkol | 100ml. |

Kristal viyole steril bir erlene konuldu ve üzerine yavaş yavaş alkol ilave edildi. Boyanın çözünmesi için steril bir cam pipet yardımıyla karıştırıldı. 24 saat oda ısısında bekletildikten sonra cam kapaklı kahverengi şişelere aktarıldı.

#### **Lugol solüsyonu**

|                      |        |
|----------------------|--------|
| İyot                 | 5 g.   |
| Potasyum iyodür (KI) | 10 g.  |
| Distile su           | 100 cc |

10 gr Potasyum iyodür kahverengi cam kapaklı şişeye konularak 100ml distile su ile çözdürüldü. Üzerine 5gr. İyot kristali ilave edilerek oda sıcaklığında tam olarak çözününceye kadar karıştırıldı.

### **Etil alkol**

Gram boyamada kullanılan etil alkol piyasada ticari olarak satılan % 96'lık saflıkta temin edildi.

### **Bazik fuksin stok solüsyonu**

|              |        |
|--------------|--------|
| Bazik fuksin | 0.8 g  |
| Distile su   | 100 mL |

Kahverengi cam bir şişeye bazik fuksin konuldu. Yavaşça distile su ilave edildi ve bir yandan karıştırılarak çözünmesi sağlandı.

### **Sulu fuksin solüsyonu**

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Bazik fuksin (stok) | 10 ml  |
| Distile su          | 100 ml |

Fuksin distile suda iyice karıştırılır ve filtre kağıdında süzülür.

## **3.4. Antibiyogram Testi İçin Kullanılan Malzemeler**

McFarland standardı;

Disk difüzyon testinde kullanılacak *Arcobacter* türlerinin yoğunluklarının CLSI standardına göre McFarland No:0.5 olması gerekmektedir. Çalışmada kullanılan 0.5'lik McFarland standardı, 0.05 ml % 1.175 BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (Barium Chloride dihydrate) ile 9.95 ml % 1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> karıştırılarak elde edildi. McFarland 0.5 standardı, disk difüzyon testinde kullanılmak üzere +4° C'de saklandı.

Antibiyotikler; Eritromisin (E) 15 µg, siprofloksasin 5 µg (CIP), streptomisin 10 µg (S), sefalotin 30 µg (KF), ampisilin 10 µg (AM), gentamisin 10 µg (CN), tetrasiklin 10 µg (TE)

## **3.5. PCR Testi İçin Kullanılan Malzemeler**

Taq DNA Polimeraz Seti (Thermo Fisher Scientific)

- 10xPCR buffer
- dNTP (10mM)
- Taq Polimeraz (5U/mlt)
- Ethidium Bromide
- MgCl<sub>2</sub> (25mM)

### 3.6. AgaroZ Jel Elektrofözezi İçin Kullanılan Malzemeler

- AgaroZ
- 10X TBE (Tris-Borate electrophoresis buffer)
- Jel yükleme boyası
- DNA standardı
- Etidyum bromür (EtBr) (5 mg/ml)

### 3.7. Primerler

Çalışmada elde edilen izolatlar ARCO, BUTZ, SKIR, CRY1 ve CRY2 olmak zerer beş adet primer kullanılarak m-PCR tekniği ile incelenmiştir. Primerlere ait baz dizilimleri izelge 3.2.' de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Primerlerin baz dizilimleri.

| Primers | Primer dizilimi                        | Referans        |
|---------|----------------------------------------|-----------------|
| ARCO    | 5'-CGT ATT CAC CGT AGC ATA GC-3'       | Houf, vd., 2000 |
| BUTZ    | 5'-CCT GGA CTT GAC ATA GTA AGA ATGA-3' | Houf, vd., 2000 |
| CRY1    | 5'-TGC TGG AGC GGA TAG AAG TA-3'       | Houf, vd., 2000 |
| CRY2    | 5'-AAC AAC CTA CGT CCT TCG AC-3'       | Houf, vd., 2000 |
| SKIR    | 5'-GGC GAT TTA CTG GAA CAC A-3'        | Houf, vd., 2000 |

### 3.8. Makine ve Teçhizat



*Stomacher*



*Vortex*



*Anaerobik jar*

### İzolasyon ekipmanları

- Stomacher (BagMixer 400 VW, Interscience) ve Stomacher poşetleri
- Vortex (Heidolph Reaxtop Vorteks Karıştırıcı)
- Anaerobik jar
- Gaspack (CAMPYGEN COMPACT Code: CN0020 , Oxoid)
- Filtre kağıdı (Sartorius Biolab Cellulose Nitrate (CN) Membrane Filter)
- Etüv
- Otoklav

### Ekstarksiyon ekipmanları

- Santrifüj
- Su banyosu

### PCR ve Elektroforez ekipmanları

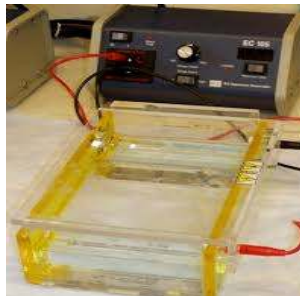
- PCR için kullanılan Arktik™ Thermal Cyclers - Thermo Scientific
- Jel dökme standı
- Taraklar
- Yürütme tankı
- Güç kaynağı

### Biyofilm ekipmanları

- Biyofim Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer - Thermo Scientific
- Steril kabin (hedlab)



*Thermal Cycler*



*Yürütme tankı*



*Spektrofotometre*

## 4. METOT

### 4.1. *Arcobacter*lerin İzolasyonu

*Arcobacter* izolasyonu amacı ile 10 gram tavuk kanat derisi, 10 gram kıyma ve 10 gram peynir örneği steril şartlar altında tartıldı. Tartım işlemi sonucunda numuneler steril plastik poşetlere konularak üzerine 90ml steril distile su ilave edildi. Örnekler homojenizator (stomacher) içerisinde yaklaşık 2 dakika süreyle homojenize edildi. Örneklerden elde edilen 1ml homojenat sıvısı, 9ml (CAT; Caphoperazone-Amphotericin-Teicoplanin ) selektif saplement içeren çifte-güçlü *Arcobacter* Enrichment Broth (AEB) tüplerinin içerisine inoküle edilerek vorteks yardımıyla homojen hale getirildi. Sıvı örneklerde ise 9ml (CAT) selektif saplement içeren çifte-güçlü *Arcobacter* Enrichment Broth (AEB) tüplerinin içerisine 9ml sıvı örnek inoküle edildi (1:1). Homojenizasyon sağlandıktan sonra tüpler mikroaerobik şartlarda 30°C’de 48 saat ön zenginleştirme için inkübe edildi. Ön zenginleştirme işleminden sonra AEB’de üreyen şüheli kültürler selüloz membran filtreler kullanılarak kanlı agara inoküle edildi.

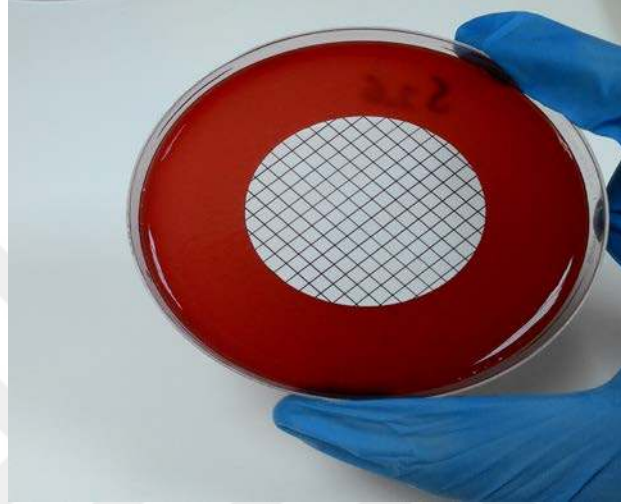


**Şekil 4.1.** Steril stomacher poşedinde bulunan gıda örneği (a), Gaspack içerisinde yerleştirilmiş sıvı örnekler(b).

### 4.2. Membran Filtrasyon Tekniği

Çalışmada, 0.45 µm gözenek çapına sahip selüloz asetat membran filtreler (Sartorius) kanlı agar [%5 koyun kanı ilave edilmiş Blood Agar Base No:2 (Oxoid)] üzerine aseptik şartlarda steril bir pens yardımıyla yerleştirildi. Mikroaerofilik şartlarda AEB içerisinde 30°C’de 48 saat ön zenginleştirme işlemine tabi tutulan şüpheli kültürlerden steril bir pastör pipeti yardımı ile 50µl alındı ve bu sıvı kanlı agara yerleştirilen membran filtreler üzerinde farklı

noktalara damlatıldı. Bu agarlar, üzerindeki filtreler ile beraber oda ısısında yaklaşık yarım saat bekletildi. Bu aşamadan sonra yine aseptik olarak bir pens yardımı ile filtreler uzaklaştırıldı ve steril öze aracılığı ile ekim yapılarak aerobik koşullarda 30 °C’de 2–7 gün inkübasyona bırakıldı. Üreyen şüpheli koloniler kanlı agarda pasajlanarak DNA ekstraksiyonunda kullanılmak üzere +4°C de saklandı.



**Şekil 4.2.** Kanlı agara yerleştirilen selüloz memebran filtreler.

#### 4.3. İzolatların Bakterioskopisi

Kanlı agarda üreyen *Arcobacter* kolonilerin morfolojik yapısı Gram boyama yöntemi ile saptandı. Gram boyamada, saf kültürler steril bir lam üzerine alınarak üzerine steril pipet yardımıyla bir damla su konuldu. Lam üzerine ince bir film tabakası şeklinde yayılarak 3 defa alevden geçirilerek fikse edildi. Hazırlanan preparatın üzerine ilk önce kristal viyole boyası damlatılıp 1dk beklendi sonrasında bol su ile yıkandı ve üzerine lugol (Gram iyot çözeltisi) konarak 1 dk beklendi. Lugol akıtılarak üzerine %‘96’lık etil alkol yayıldı, 10-15 sn bekletildikten sonra hemen su ile yıkandı. En son aşamada karşıt boya olan bazik fuksin ile kaplanarak 10-30 sn beklendi ve bol su ile yıkanarak kurutma kâğıdında kurutuldu. Preparata immersiyeon yağı damlatılarak ışık mikroskopunda 100 'lük objektifle incelendi.

#### 4.4. DNA Ekstraksiyonu

Ependorfların içerisine 200µl steril distile su konularak otoklavlandı. Steril hale gelen ependorflara bir öze dolusu bakteri süspanse edildi. Su banyosunda 100°C’de 15-20dk. bekletildi. Kaynatılan örnekler santirfüj edildi (10.000 rpm 10 dk), üst sıvı steril bir ependorfa alındı ve hedef DNA, PCR işleminde kullanılıncaya kadar -20 C’de saklandı.

#### 4.5. Multipleks PCR İle Tür Tayini

Toplam 50 µl volümde hazırlanan PCR karışımı, 2 µl hedef DNA, 5 µl 10x PCR buffer, 1.5U Taq polymerase, 0.2 mM dNTP karışımı, 1.25mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas, Lithuania), 50 pmol ARCO, BUTZ, CRY1, CRY2 primerleri ve 25 pmol SKIR primeri içermektedir. DNA amplifikasyonu 94°C’de 2 dk ön denatürasyonu takiben, 94°C’de 45 s, 61°C’de 45 s ve 72°C’de 30 s olmak üzere 32 sikusta gerçekleştirildi.

#### 4.6. Agaroz Jel Elektroforezi

Amplifikasyon sonrasında fragmentlerin varlığını gösterebilmek amacı ile ampliconlar agaroz jel içerisine yüklenerek elektroforez işlemine tabi tutuldu. % 1’lik agaroz jel 1xTBE solüsyonu ile hazırlandı. Mikrodalga fırında ara ara kontrol edilerek agaroz tamamen eriyene kadar kaynatıldı. Elle dokunulabilir sıcaklığa gelinceye kadar kabin içerisinde soğutuldu ve içerisine 3 µl ethidium bromid ilave edildi. Kabarcıklar oluşmamasına dikkat edilerek karıştırıldı. Jel tarakları elektroforez tankında uygun yerlere yerleştirildi. %1’lik agaroz jel önceden hazırlanmış jel kalıbına dikkatlice döküldü. Oda sıcaklığında jelin katılaşması için bir süre beklendi. Jel katılaştıktan sonra taraklar kuyucukların bozulmamasına özen gösterilerek çıkartıldı ve elektroforez tankına yerleştirildi. İlk kuyuya DNA marker (Fermentas O’Range Ruler, 100bp Ladder, Lot: 0302) yüklendi. Parafilm üzerine 6x yoğunluğundaki yükleme tamponundan 3 µl konuldu, 15 µl örnek ile karıştırıldı. Hazırlanan 18 µl yoğunluğundaki farklı örneklerden olan karışım diğer kuyulara yüklendi. Amplifiye edilen ürünler %1.5 agaroz jelde 90 V’ta 40 dk elektroforez işlemine tabi tutuldu. Brom fenol mavisinin jeldeki migrasyonu takip edilerek, boya jelin 2/3’lik kısmına ulaştığında elektroforez durduruldu.

#### 4.7. Antibiyogram Testi

Bu çalışmada, *Arcobacter* oldukları moleküler olarak saptanan 7 adet örneğin 7 farklı antibiyotiğe karşı duyarlılıkları Kirby-Bauer tarafından geliştirilen disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Bu yöntem disklere emdirilen antibiyotiğin besiyerinde yayılarak antibiyotiğin etkisine göre inhibisyon zonları oluşturması temeline dayanmaktadır.

*Arcobacter* olarak tanımlanan kolonilerden 3-5 koloni seçilerek MHB besiyerine inokule edildi ve 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Üreyen bakteri süspansiyonlarının bulanıklığı MHB eklenerek 0,5 McFarland bulanıklığına ayarlandı. Elde edilen süspansiyondan 100µl alınarak petri üzerine inokule edildi ve dragalski spatülü ile kanlı agaraya yayıldı. Agarın

yüzeyi kuruduktan sonra üzerine antibiyotik diskleri yerleştirildi ve petriler 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Duyarlılık zon çapları Clinical and Laboratory Standards Institute (M100-S24) tarafından önerilen zon tablosuna göre yorumlandı.

#### 4.8. Biyofilm

Deney öncesinde bütün suşlar %5 koyun kanı içeren agarlarda 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılarak taze pasajları yapıldı. İçerisinde 3ml'lik MHB bulunan tüplere her bakterinin 0.5 McFarland bulanıklığında süspansiyonları hazırlanarak 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında yoğunlaşan bakteri süspansiyonları yine 0.5 McFarland bulanıklığına göre ayarlandı. Daha sonra hazırlanan bu süspansiyonlar 96 kuyucuk içeren 2 ayrı mikrotitrasyon plağına ilk sıraya 100ml ikinci sıraya 200ml olacak şekilde dağıtıldı. Negatif kontrol olarak MHB, pozitif kontrol olarak da *Enterococcus* spp. ve *Candida* spp kullanıldı. Plaklardan biri aerobik diğeri mikroaerofilik olarak 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrasında sıvı besiyeri dökülüp, her kuyucuk distile suyla 3 kez yıkandı ve ters çevrilerek kurutma kâğıdı üzerinde kurutuldu. Daha sonra her kuyucuğa %0.1'lik kristal viyole süspansiyonundan 50 ml dağıtılarak 30dk. oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrasında bağlanmayan kristal viyole boyası üç kez distile su ile yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra bu kez kuyucuklara 50ml etanol aseton karışımı (80:20) ilave edildi ve kuyucukların absorbensları Biyofim Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer cihazı ile 590nm dalga boyunda okutuldu.

## 5.BULGULAR

Bu çalışmada Kütahya ili merkez çevresinde bulunan kasap ve marketlerden 35 adet kıyma, 35 adet tavuk kanat derisi, 35 adet peynir ve 10 adet su örneği *Arcobacter* varlığı yönünden incelendi. Şüpheli örnekler m-PCR tekniği ile doğrulanarak antibiyotik duyarlılıkları ve biyofilm özellikleri belirlendi.

### 5.1. *Arcobacter* Türlerinin İzolasyonu ve Tanımlanması

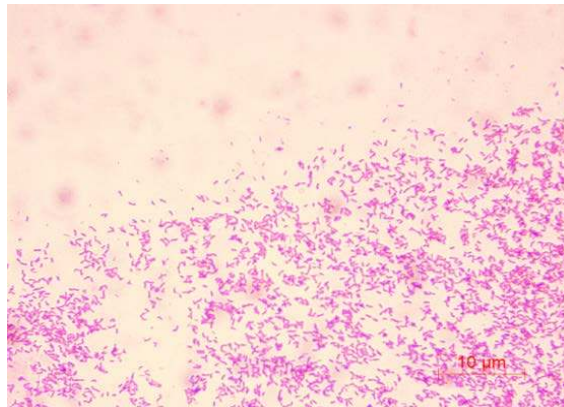
İncelenen toplam 115 örneğin laboratuvar analizleri sonucunda kanlı agarda beyaz-bej arası, yassı, su damlası şeklinde düzensiz koloniler oluşturan 15 (%13) şüpheli *Arcobacter* suşu izole edildi ( T79 T10 T11 T14 T15a T15b T19 T20a T27 T33 P15b P21 S26 S27 S28).



**Şekil 5.1.** *Arcobacter butzleri* T7g suşunun kanlı agar üzerindeki görünümü.

### 5.2. Bakterioskopi Sonuçları

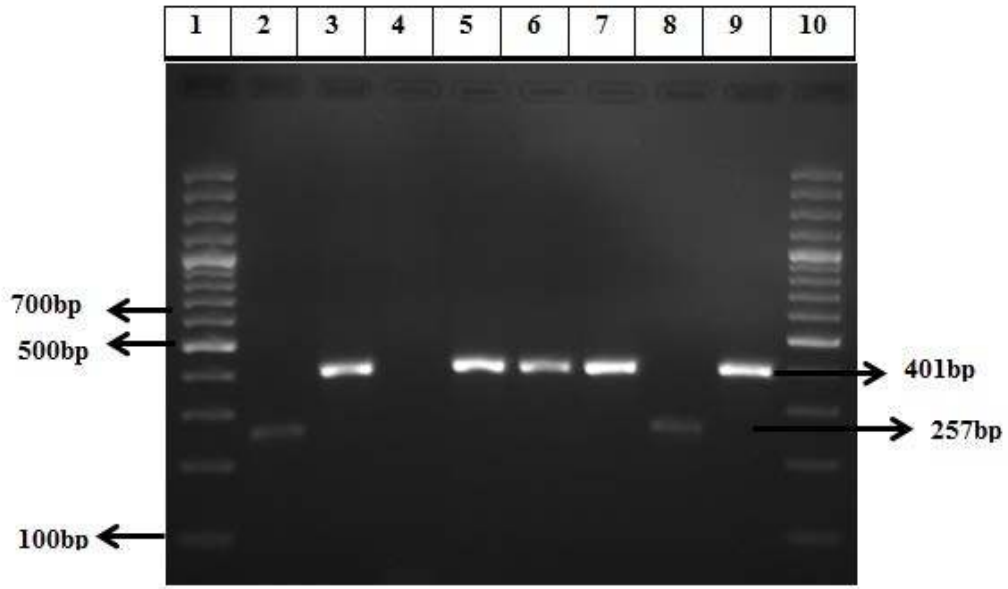
İzolasyon sonucunda elde edilen 15 şüpheli koloni için uygulanan bakteriyoskopi sonuçlarında Gram negatif ve virgül biçimli bakteriler gözlemlendi.



**Şekil 5.2.** Gram boyalı *Arcobacter* suşunun ışık mikroskopundaki görünümü.

### 5.3. *Arcobacter* Şüpheli Bakterilerin Cins ve Tür Düzeyinde Moleküler Tanısı

Çizelge 3.2.' de, dizileri verilen primerler ile yapılan m-PCR reaksiyonu sonucunda *A. cryaerophilus* için 257 bp, *A. butzleri* için 401 bp ve *A. skirrowi* için 641 bp büyüklüğünde bant oluşumu beklendi. Yapılan çalışmada, m-PCR işlemi sonucunda 115 adet örneğin 6'sı (% 5.2) , 401 bp'da bant oluşumu şekillendirdi ve *A. butzleri* olarak tanımlandı. Şüpheli suşlardan 1'i (% 0.8), 257 bp'da bant oluşumu şekillendirdi ve *A. cryaerophilus* olarak identifiye edildi.



**Şekil 5.3.** *Arcobacter* spp. m-PCR sonucu elde edilen elektroforez bant görüntüsü 1ve 10; DNA marker, 2-3; *Arcobacter cryaerophilus*, *Arcobacter butzleri* pozitif kontrol, 4; negatif kontrol, 5-9; şüpheli izolatlar.

**Çizelge 5.1.** m-PCR ile pozitif oldukları saptanan *Arcobacter* türleri.

|   | Örnek No | Tür                             |
|---|----------|---------------------------------|
| 1 | T7g      | <i>Arcobacter butzleri</i>      |
| 2 | T10      | <i>Arcobacter butzleri</i>      |
| 3 | T15b     | <i>Arcobacter cryaerophilus</i> |
| 4 | T19      | <i>Arcobacter butzleri</i>      |
| 5 | T20a     | <i>Arcobacter butzleri</i>      |
| 6 | T27      | <i>Arcobacter butzleri</i>      |
| 7 | S26      | <i>Arcobacter butzleri</i>      |

Yapılan m-PCR işlemi sonucunda, tavukta %17.1 ve suda %10 oranında *Arcobacter* spp. türleri saptandı. Saptanan *Arcobacter* türlerinin dağılımı Çizelge 5.2.'de verilmiştir.

**Çizelge 5.2.** Elde edilen *Arcobacter* türlerinin prevalansı (%).

|                     | <i>A.butzleri</i> (%) | <i>A.cryaerophilus</i> (%) | <b>Toplam (%)</b> |
|---------------------|-----------------------|----------------------------|-------------------|
| Kıyma (35)          | -                     | -                          | -                 |
| Tavuk (35)          | 5 (14.3)              | 1 (2.8)                    | <b>6 (17.1)</b>   |
| Peynir (35)         | -                     | -                          | -                 |
| Su (10)             | 1 (10)                |                            | <b>1 (10)</b>     |
| <b>Toplam (115)</b> | <b>6 (5.2)</b>        | <b>1 (0.8)</b>             | <b>7 (6)</b>      |

#### 5.4. Antibiyogram Test Sonuçları

Yapılan çalışmalarla *Arcobacter* olduğu doğrulanan 7 adet *Arcobacter* suşunun 7 farklı antibiyotiğe karşı Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kurallarına uygun olarak, disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır.



**Şekil 5.4.** *Arcobacter* T19 suşunun çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılığı.

*Arcobacter*'ler için referans bir zon aralığı bulunmamaktadır. Bu çalışmada antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde CLSI M100-S24 standartlarında yer alan Enterobacteriaceae ve Eritromisin için ise Eucast standartlarında yer alan *Haemophilus influenzae* referans aralıkları baz alındı (Shah, vd., 2013).

**Çizelge 5.3.** Elde edilen *Arcobacter* izolatlarının zon çapları (mm).

|                      | T7g | T10 | T19 | T20a | T27 | T15b | S26a |
|----------------------|-----|-----|-----|------|-----|------|------|
| Eritromisin (E)      | 18  | 24  | 22  | 28   | 30  | 26   | 16   |
| Siprofloksasin (CIP) | 0   | 0   | 0   | 28   | 0   | 32   | 0    |
| Streptomisin (S)     | 24  | 34  | 24  | 26   | 30  | 30   | 30   |
| Sefalotin (KF)       | 16  | 10  | 0   | 10   | 10  | 0    | 16   |
| Ampisilin (AM)       | 26  | 16  | 12  | 10   | 16  | 16   | 14   |
| Gentamisin (CN)      | 24  | 30  | 28  | 32   | 34  | 35   | 32   |
| Tetrasiklin (TE)     | 20  | 28  | 18  | 22   | 26  | 24   | 26   |

|                            |                            |                            |                            |                            |                                 |                            |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| <i>Arcobacter butzleri</i> | <i>Arcobacter butzleri</i> | <i>Arcobacter butzleri</i> | <i>Arcobacter butzleri</i> | <i>Arcobacter butzleri</i> | <i>Arcobacter cryaerophilus</i> | <i>Arcobacter butzleri</i> |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------------|----------------------------|

|                                                                                     |                                                                                     |                                                                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  |  |
| Dirençli                                                                            | Orta duyarlı                                                                        | Duyarlı                                                                               |

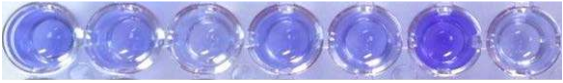
### 5.5. Biyofilm Test Sonuçları

Ferreriara ve arkadaşlarının (2013) *Arcobacter* türleri için refere ettiği aralıklar baz alınarak biyofilm sonuçları değerlendirildi (Çizelge 5.4.).

Bu çalışmada, *Arcobacter* türlerinin biyofilm formasyonları üzerine atmosfer ve başlangıç konsantrasyonunun etkisi araştırıldı. Mikroaerofilik ortamda ve başlangıç OD<sub>590</sub> si 0.07 olarak ayarlanan *Arcobacter* türlerinde zayıf biyofilm oluşumu gözlemlendi. Konsantrasyonun artırılması (0.15) ile beraber 3 adet suşun orta biyofilm 2 adet suşun ise güçlü biyofilm oluşturduğu saptandı. Aerobik ortamda başlangıç OD<sub>590</sub> si 0.07 olarak ayarlanan suşlarda da yine zayıf biyofilm oluşumu gözlemlendi. Konsantrasyonun artırılması (0.15) aerobik koşullarda biyofilm oluşumu üzerine sadece bir adet suşta olumlu etki gösterdi.

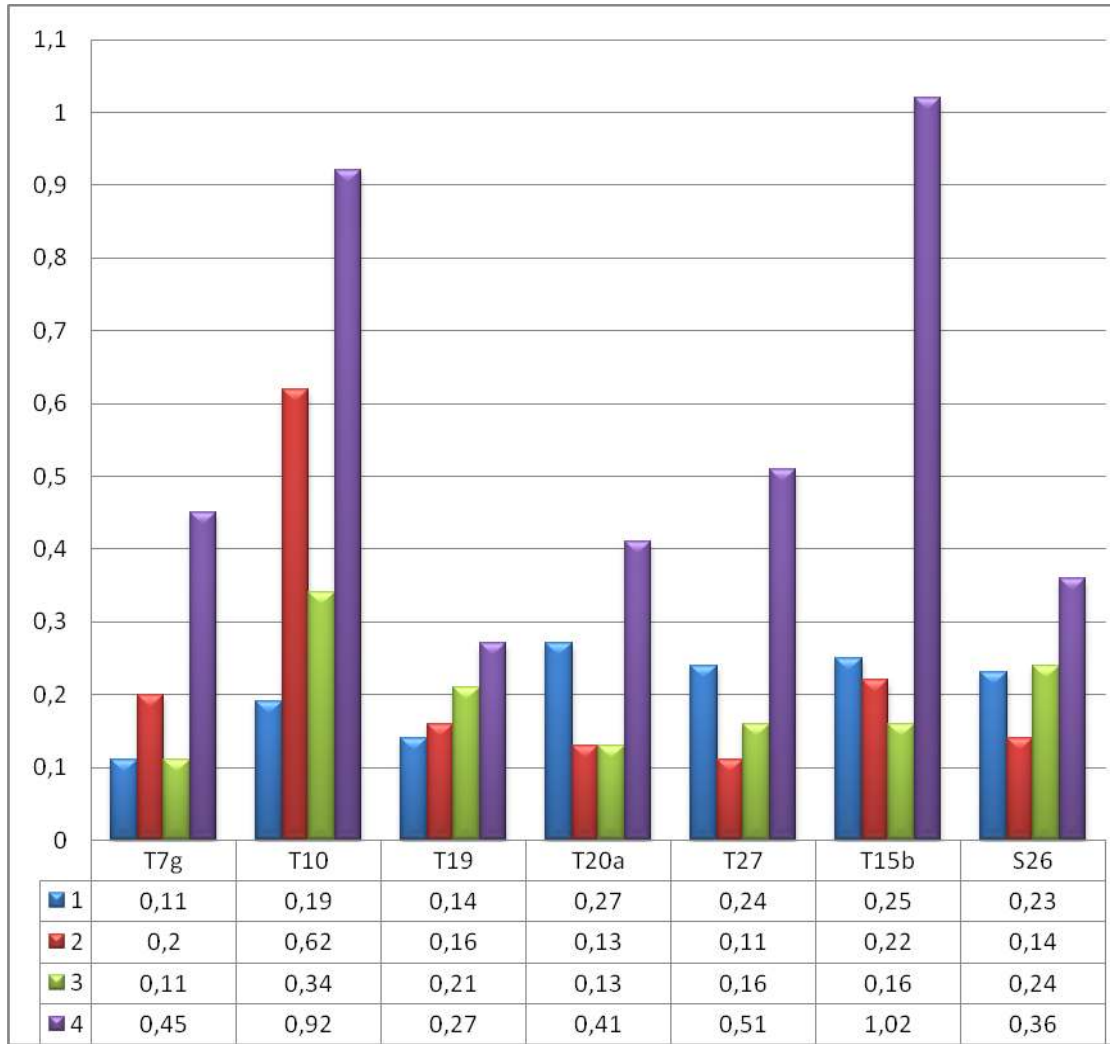
**Çizelge 5.4.** Biyofilm oluşumunun mikrotitrasyon plağı yöntemiyle değerlendirilmesi.

|                      |                         | T7g                                                                                | T10 | T19 | T20a | T27 | T15b | S26 | Enterococcus                                                                        | Candida                                                                             | MHB                                                                                 |
|----------------------|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|------|-----|------|-----|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>AEROBİK ORTAM</b> | OD <sub>590</sub> :0.07 |  |     |     |      |     |      |     |  |  |  |
|                      | OD <sub>590</sub> :0.15 |  |     |     |      |     |      |     |                                                                                     |                                                                                     |                                                                                     |

|                             |                         | T7g                                                                                 | T10 | T19 | T20a | T27 | T15b | S26 | Enterococcus                                                                          | Candida                                                                               | MHB                                                                                   |
|-----------------------------|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|------|-----|------|-----|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>MİKROAEROFİLİK ORTAM</b> | OD <sub>590</sub> :0.07 |  |     |     |      |     |      |     |  |  |  |
|                             | OD <sub>590</sub> :0.15 |  |     |     |      |     |      |     |                                                                                       |                                                                                       |                                                                                       |

|                                |                |                       |
|--------------------------------|----------------|-----------------------|
| <i>Kontrol;</i>                | <i>Aerobik</i> | <i>Mikroaerofilik</i> |
| <i>Muller Hinton Broth (-)</i> | <i>0.1770</i>  | <i>0.5495</i>         |
| <i>Enterococcus (+)</i>        | <i>1.7202</i>  | <i>1.7909</i>         |
| <i>Candid (+)</i>              | <i>2.3803</i>  | <i>1.3868</i>         |

**Çizelge 5.5.** Biyofilm oluşumunda meydana gelen artışın grafiksel gösterimi.



*OD<sub>590</sub>*

*1.Aerobik ortam 0.07*

*2.Aerobik ortam 0.15*

*3.Mikroaerofilik ortam 0.07*

*4.Mikroaerofilik ortam 0.15*

Aerobik ortamda konsantrasyonun arttırılmasıyla bir suşta orta biyofilm gözlemlendi. Mikroaerofilik ortamda konsantrasyonun arttırılmasıyla 3 suşta orta biyofilm ve 2 suşta güçlü biyofilm gözlemlendi.

Biyofilm oluşumunun değerlendirilmesinde Ferreriara ve arkadaşlarının (2013) önerdiği değerler kriter olarak alındı. Buna göre; OD<sub>590</sub>'da 0.174 - 0.287 (ortalama  $0.226 \pm 0.029$ ) ünite, zayıf biyofilm göstergesi olarak kabul edildi. Orta derecede biyofilm oluşumunda 0.422 to 0.634 (ortalama  $0.552 \pm 0.083$ ) baz alındı. 0.634 değerinin üzeri ise güçlü biyofilm oluşumu olarak değerlendirildi.

**Çizelge 5.6.** Tavuk ve su örneklerinden identifiye edilen 7 adet *Arcobacter* izolatının biyofilm sonuçları.

|                             | T7g  | T10  | T19  | T20a | T27  | T15b | S26  |
|-----------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| Aerobik ortam(0.07)         | 0,11 | 0,19 | 0,14 | 0,27 | 0,24 | 0,25 | 0,23 |
| Aerobik ortam (0.15)        | 0,2  | 0,62 | 0,16 | 0,13 | 0,11 | 0,22 | 0,14 |
| Mikroaerofilik ortam (0.07) | 0,11 | 0,34 | 0,21 | 0,13 | 0,16 | 0,16 | 0,24 |
| Mikroaerofilik ortam (0.15) | 0,45 | 0,92 | 0,27 | 0,41 | 0,51 | 1,02 | 0,36 |

■ Zayıf biyofilm   
 ■ Orta biyofilm   
 ■ Güçlü biyofilm

## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllarda, potansiyel su ve gıda kaynaklı bir patojen olan *Arcobacter* türlerinin insan ve hayvan hastalıkları üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. *Arcobacter* türlerinin özellikle kontamine sular, et ve et ürünleri, kümes hayvanları, süt ve peynir yoluyla insanlarda enfeksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir (Kayman, 2012).

Bulaşma yollarının kontamine sular ve gıda ürünlerinin olduğunu ortaya koyan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. İnsanlarda bulaş sonucunda meydana gelen ishal olgusunun *Arcobacter* türleri ile ilişkilendirildiği sadece birkaç çalışma bulunmaktadır. Hayvanlarda ise, ishal dışında abortus ve mastitis durumları *Arcobacter* türleri ile ilişkilendirilmiştir (Taylor, vd., 1991; Anderso, vd., 1993; Lerner, vd., 1994; Wybo, vd., 2004; Bucker, vd., 2009).

Bu çalışma su ve gıda örneklerinde *Arcobacter*'lerin varlığını ve tür düzeyinde dağılımını göstermektedir. *Arcobacter*'lerin biyofilm oluşturma yetenekleri ve çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıkları belirlenerek elde edilen sonuçlarla bu bakteriyle kontamine gıdalara karşı korunmanın önemi vurgulanmaktadır.

Kütahya Merkez bölgesinden toplanan 115 örnek *Arcobacter* spp. yönünden incelenmiştir. Çalışılan numunelerde 15 adet (%13) şüpheli *Arcobacter* spp. varlığı (koloni görüntüsüne göre) saptanmıştır. Bu izolatların 6'sı (% 5.2) *A.butzleri* ve 1'i (%0.8) *A.cryaerophilus* olarak moleküler yöntemler kullanılarak identifiye edilmiştir. Tavuk numunelerinin 2' si *A.cryaerophilus*, 4'ü *A.butzleri* olarak identifiye edilirken; su numunelerinin 1 tanesi *A.butzleri* olarak identifiye edilmiştir. Çalışılan kıyma ve peynir numunelerinin hiçbirinden *Arcobacter* spp. izole edilememiştir. *Arcobacter* türlerinin diğer gıdalara oranla tavuk eti örneklerinde daha sık bulunduğu gözlemlenmiştir.

Türkiye'nin çeşitli illerinde yapılan çalışmalardan bazıları incelendiğinde, *Arcobacter* türlerinin, özellikle de *A.butzleri*'nin diğer gıdalarla kıyaslandığında kümes hayvanlarında daha sık bulunduğu tespit edilmiştir (Çizelge 6.1.).

**Çizelge 6.1.** Türkiye’deki çeşitli gıda ürünlerinde *Arcobacter* spp. prevalansına ilişkin bazı çalışma sonuçları.

| Örnek        | Pozitif örnek sayısı/ toplam (%) | Şehir                      | Referans                      |
|--------------|----------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| <b>Tavuk</b> | 20/50(40)                        | Kayseri                    | (Ok Anadut ve Gümüşsoy, 2005) |
|              | 56/90 (62)                       | Ankara                     | (Doksanüçoğlu, 2006)          |
|              | 68/100(68)                       | Kayseri                    | (Aydin, vd., 2007)            |
|              | 49/75 (65)                       | Kars/Merkez                | (Atabay, vd., 2003)           |
| <b>Sığır</b> | 42/100 (42)                      | Kayseri                    | (Ertaş ve Doğruer, 2009)      |
|              | 5/97(5)                          | Türkiye’nin doğu kesimleri | (Ongor, vd., 2004)            |
| <b>Su</b>    | 14/113 (12)                      | Kars                       | (Tazegül, 2010)               |
|              | 42/115 (36.5)                    | İzmir ve çevresi           | (Akıncioğlu, 2011)            |

Bu çalışmada incelenen 35 tavuk örneğinden %14.3 oranında *A.butzleri* ve %2.8 oranında *A.cryaerophilus* olmak üzere toplamda %17.1 oranında *Arcobacter* spp. saptanmıştır. Farklı illerde yapılan çalışmalar ile kıyaslandığında tavukta bulunan *Arcobacter* spp. yüzdesi çalışmamızda düşük bulunmuştur. Çalışma sonuçlarından farklı olarak, Atabay ve ark. (2003) tarafından yapılan çalışmada tavuk örneklerinden %65, Doksanüçoğlu (2006) tarafından yapılan çalışmada ise örneklerin %62’ sinde *Arcobacter* spp.saptanmıştır.

Diğer çalışmalarda elde edilen sonuçların bizim sonuçlarımızdan yüksek olması, kanatlı kesimhanelerinin hijyenik durumu, satış noktalarındaki depolama şartları, kullanılan bıçak ve diğer malzemelere bağlı olarak *Arcobacter* ile kontamine olma oranının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada 10 adet su örneği *Arcobacter* spp. varlığı yönünden incelenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda Aslanapa/Bezirgan ilçesinden alınan kuyu suyu örneğinde 1 adet (%10) *A. butzleri* saptanmıştır. Bu durumun diğer çalışmalardan elde edilen bulgularla farklılık göstermesi örnekleme ve izolasyon amacıyla uygulanan yöntemlerin farklılığından ya da çalışmaların yapıldığı bölgenin coğrafi ve iklimsel özelliklerinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yapılan çalışma sonucunda toplanan kıyma ve peynir numunelerinden *Arcobacter* spp.identifiye edilememiştir. Dünyanın farklı ülkelerinde yapılan benzer çalışmalarda da su ve gıda örnekleri *Arcobacter* spp. varlığı yönünden incelenmiştir (Çizelge 6.2.).

**Çizelge 6.2.** Dünya’ da çeşitli gıda ürünlerinde *Arcobacter* spp. Prevalansı ilişkin bazı çalışma sonuçları.

| Örnek        | Pozitif örnek sayısı/<br>toplam (%) | Ülke       | Referans              |
|--------------|-------------------------------------|------------|-----------------------|
| <b>Tavuk</b> | 132/157(85)                         | Belçika    | (Houf, vd., 2001)     |
|              | 16/22( 73)                          | Avustralya | (Lucia, vd., 2004)    |
|              | 28/50 (56)                          | Hindistan  | (Ramees, vd., 2014)   |
|              | 28/100(28)                          | İran       | (Rahimi, 2014)        |
| <b>Sığır</b> | 8/120(6.6)                          | Malezya    | (Shah, vd., 2012)     |
|              | 7/32 (22)                           | Avustralya | (Lucia, vd., 2004)    |
| <b>Su</b>    | 2/18 (11.1)                         | Malezya    | (Shah, vd., 2012)     |
|              | 113/205 (55.1)                      | İspanya    | (Collado, vd., 2008)  |
| <b>Süt</b>   | 6/105 (5.7)                         | Malezya    | (Shah, vd., 2012)     |
|              | 36/52(69.2)                         | İtalya     | (Serraino, vd., 2013) |

Dünyanın farklı ülkelerinde *Arcobacter* türlerinin antibiyotiklere direnci üzerine yapılmış çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Yaptığımız çalışma sonucunda, izolatların tamamı sterptomisin, gentamisin ve tetrasikline karşı duyarlı, eritromisine ise orta derecede duyarlı bulunmuştur. İzolatlardan 5 tanesinin siproflaksasine, 5 tanesinin sefalotine, 2 tanesinin de ampisiline dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Atabay ve Aydın (2001), broyler tavuktan izole ettikleri 39 *A.butzleri* izolatına disk difüzyon yöntemi kullanarak uyguladıkları antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda 39 suşun 26’sını ampisiline karşı dirençli bulmuşlardır. Aynı çalışmada izolatların hepsini sefalotine direnç gösterdiği, izolatlardan birinin ise eritromisine tam direnç gösterdiğini belirtilmiştir. Bütün izolatların tetrasikline duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Shah ve arkadaşları (2013) tarafından disk difüzyon metodu kullanarak yapılan çalışmada , *A.butzleri*’nin en yüksek direnci ampisilin ve siprofloksasin olarak belirlenirken en az direnç gentamisin olarak saptanmıştır.

Rahimi (2014) tarafından disk difüzyon yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada, tespit edilen 71 *Arcobacter* izolatının bir veya daha çok antimikrobiyal ajana dirençli olduğu belirlenmiştir. *Arcobacter* izolatlarının yüksek oranda sefalotin, vankomisin, metisilin, azitromisin, klindamisin ve ampisiline daha düşük oranda ise nalidiksik asit, kloramfenikol, eritromisin ve siprofloksasine karşı direnç gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca tüm *Arcobacter* türlerinin gentamisin, streptomisin, tetrasiklin, *A. skirrowii* izolatlarının ise siprofloksasine duyarlı olduğu bulunmuştur.

Biyofilm oluşumu, bakteriyel virölans, kolonizasyon, olumsuz çevre koşullarında hayatta kalma ve antibiyotik direnci ile ilişkilendirilmiştir (Gaynor, vd., 2007). *Arcobacter* türlerinin sert yüzeylerde biyofilm oluşturdıkları ve böylece kümeslerde suluk materyalleri üzerine yapıştıkları bildirilmiştir (Kjeldgaard, vd., 2009; Assanta, vd., 2002). *Arcobacter* türlerinin kümes ekipmanlarında yüksek prevalansta saptanmasının biyofilm şekillendirme yetenekleri ile ilgisi olduğu düşünülmektedir. Bu çalışma kapsamında, tavuk ve su örneklerinden identifiye edilen 7 adet *Arcobacter* izolatının farklı atmosferik koşullarda biyofilm şekillendirme yeteneklerine ilişkin sonuçlar Çizelge 5.6.' da verilmiştir.

*Arcobacter* türlerinin biyofilm oluşturma kapasitelerini içeren az sayıda literatür bulunmaktadır. Danimarka'da, *A.butzleri* ATCC 49616'nin ve 6 adet saha izolatının (kesimhaneden izole edilen) kullanıldığı, Kjeldgaard ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (2009), suşların tamamının mikropleytlerde biyofilm oluşturduğu ve oluşan biyofilm tabakasının miktarının, inkübasyon süresi ve sıcaklık ile orantılı olarak artış gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca kullanılan besiortamının da (tavuk et suyu ve Mueller Hinton broth) biyofilm oluşumunu olumlu yönde etkilediği bildirilmektedir. Portekiz'de yapılan bir araştırmada ise, 36 adet *Arcobacter* izolatının 21'inin zayıf 5'inin orta düzeyde biyofilm oluşturdıklarını ve biyofilm oluşumunda atmosfer ortamının ve başlangıç konsantrasyonunun (0.2 ve 0.02)etkili olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada 10 adet izolatın ise biyofilm şekillendirmediği saptanmıştır (Ferreira, vd., 2015).

Bu çalışmada kullanılan 6 adet *A.butzleri* ve 1 adet *A.cryaerophilus* suşu OD590'da 0.07 başlangıç konsantrasyonunda **aerobik** olarak zayıf biyofilm şekillendirmiştir. Konsantrasyonun arttırılması (0.15) aerobik koşullarda biyofilm oluşumu üzerine sadece bir adet suşta olumlu etki göstermiştir.

6 adet *A.butzleri* ve 1 adet *A.cryaerophilus* suşunun büyük bir kısmı OD590'da 0.07 başlangıç konsantrasyonunda **mikroaerofilik** olarak zayıf biyofilm şekillendirmiştir. Konsantrasyonun arttırılması (0.15) ile mikroaerofilik koşullarda 3 adet suş orta biyofilm ve 2 adet suş güçlü biyofilm şekillendirmiştir.

*Arcobacter* türleri, kendileri ile aynı ailede yer alan *C.jejuni* (Reeser, vd., 2007) suşları ile biyofilm şekillendirme özellikleri açısından benzerlik göstermektedir. Saha şartlarında ve kesimhanelerde *C.jejuni* ikinci kolonizatör bakteri olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu ortamlardaki birinci kolonizatör bakteriler biyofilmin zeminini hazırlamaktadır. Ardından bu hazır ortama

*C.jejuni* de dahil olmaktadır. Bu çalışmada zayıf biyofilm şekillendiren *Arcobacter* türlerinin de ikinci kolonizatör bakteri olabileceği düşünülmektedir (Hanning, vd., 2008).

Sonuç olarak, Kütahya ilinde tüketime sunulan 115 adet gıda ve su örneğinden 7 tanesinin *Arcobacter* ile kontamine olduğu saptanmıştır. Bu örneklerin m-PCR yöntemi ile tür düzeyinde tanısı yapılarak 6 adet *A.butzleri* ve 1 adet *A.cryaerophilus* tespit edilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda, *Arcobacter* spp. prevalansı düşük bulunmuştur. *Arcobacter* izolatlarının antibiyotik test sonuçlarına baktığımızda izolatların büyük bir bölümünün antibiyotiklere karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. *Arcobacter* izolatlarını biyofilm oluşturma yeteneklerini tespit etmek amacıyla uygulanan testler sonucunda, izolatların büyük çoğunluğunda zayıf biyofilm gözlenmiştir.

Tez çalışması sonucunda izole edilen *Arcobacter* türleri diğer çalışmalara oranla daha düşük bulunmuştur. Bu durumun, coğrafi ve iklimsel özelliklerin farklı olması, suyun ya da su borularının hatalı dezenfeksiyonu, kesim sırasında kullanılan materyaller, fekal kontaminasyon, üretim teknikleri, üretim, dağıtım ve satış aşamalarında farklı hijyenik uygulamalar, çapraz kontaminasyon ve personel hijyeninden kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır. Bu çalışma kapsamında *Arcobacter* spp. yüzdesi düşük bulunsada etkenin potansiyel sağlık riski oluşturabileceği gözardı edilmemelidir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akan, E. ve Ö, Kınık., (2014), Biyofilm Oluşum Mekanizması ve Biyofilmlerin Gıda Güvenliğine Etkisi. Gıda ve Yem Bilimi - Teknolojisi Dergisi / *Journal of Food and Feed Science - Technology* 14:42-51.
- Akıncıoğlu, F., (2011), Isolation of *Arcobacter* Species From Different Water Sources and Characterization of Isolated Species by Molecular Techniques. Yüksek Lisans Tezi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü.
- Al Rashid, S. T., Dakuna, I., Louie, H., Ng, D., Vandamme, P., Johnson, W. ve Chan, V. L., (2000), Identification of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *Arcobacter butzleri*, and *A. butzleri*-Like Species Based on the *glyA* Gene. *J. Clin. Microbiol.* S. 1488–1494.
- Amisu, K. O., Coker, A. O., On, S. L. W. ve Isokpehi, R. D., (2003), *Arcobacter butzleri* Strains From Poultry Abattoir Effluent in Nigeria. *East African Medical Journal* Cilt: 80, No: 4.
- Anderson, K. F., Kiehlbauch, J. A., Anderson, D. C., McClure, H. M. ve Wachsmuth, I. K., (1993), *Arcobacter (Campylobacter) butzleri*-Associated Diarrheal Illness in a Nonhuman Primate Population, *Infection And Immunity*, S. 2220-2223.
- Atabay, H. İ. ve Aydın, F., (2001), Susceptibility of *Arcobacter butzleri* isolates to 23 antimicrobial agents. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 430-433.
- Atabay, H. İ., Aydın, F., Houf, K., Sahin, M. ve Vandamme, P., (2003), The prevalence of *Arcobacter* spp. on chicken carcasses sold in retail markets in Turkey, and identification of the isolates using SDS-PAGE. *International Journal of Food Microbiology*, 81, 21-28.
- Atabay, H. İ. ve Corry, J. E. L., (1997), The prevalence of campylobacters and arcobacters in broiler chickens. *J. Appl. Microbiol.* 83: 619–626.
- Atabay, H. İ. ve Corry, J. E. L., (1998), Evaluation of a new arcobacter enrichment medium and comparison with two media developed for enrichment of *Campylobacter* spp. *Int. J. Food Microbiol.* 41:53–58.
- Atabay, H. İ., Corry, J. E. L. ve On, S. L. W., (1998), Diversity and prevalence of *Arcobacter* spp. in broiler chickens. *J. Appl. Microbiol.* 84, 1007–1016.
- Ayaz, N. D. ve Erol, İ., (2004) Canlı Fakat Kültürü Yapılamayan Bakteriler ve Gıda Güvenliği Yönünden Önemi. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, Cilt:15, No: 1-2.
- Aydın, F., Gumussoy, K. S., Atabay, H. İ., Ica, T. ve Abay, S., (2007), Prevalence and distribution of *Arcobacter* species in various sources in Turkey and molecular analysis of isolated strains by ERIC-PCR. *J Appl Microbiol*, 103, 27-35.
- Boudreau, M., Higgins, R. ve Mittal, K. R., (1991), Biochemical and Serological Characterization of *Campylobacter cryaerophila*. *Journal Of Clinical Microbiology*, S. 54-58.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V. ve Dubois-Brissonnet, F., (2011), Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: A review. *Biofouling*, 27, 1017-32.
- Bucker, R., Troeger, H., Kleer, J., Fromm, M. ve Schulzke, J. D., (2009), *Arcobacter butzleri* induces barrier dysfunction in intestinal HT-29/B6 cells. *J Infect Dis*, 200, 756-64.
- Buller, N. B., (2014) Bacteria and Fungi from fish and other Aquatic Animals, 2nd Edition.
- Carbone, M., Maugeri, T. L., Giannone, M., Gugliandolo, C., Midiri, A. ve Fera, M. T., (2003), Adherence of environmental *Arcobacter butzleri* and *Vibrio* spp. isolates to epithelial cells in vitro. *Food Microbiology*, S. 611–616.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute, M100-S24.
- Collado, L., (2010), Taxonomy and Epidemiology of the Genus *Arcobacter*. Doktora Tezi, Rovira I Virgili Üniversitesi.
- Collado, L., Cleenwerck, I., Van Trappen, S., De Vos, P., ve Figueras, M. J., (2009), *Arcobacter mytili* sp. nov., an indoxyl acetate-hydrolysis-negative bacterium isolated from mussels. *Int J Syst Evol Microbiol*, 59, 1391-6.
- Collado, L. ve Figueras, M. J., (2011), Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clin Microbiol Rev*, 24, 174-92.
- Collado, L., Inza, I., Guarro, J. ve Figueras, M. J., (2008), Presence of *Arcobacter* spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution. *Environ Microbiol*, 10, 1635-40.
- Collado, L., Levican, A., Perez, J. ve Figueras, M. J., (2011), *Arcobacter defluvii* sp. nov., isolated from sewage samples. *Int J Syst Evol Microbiol*, 61, 2155-61.
- Collins, C. I., Wesley, I. V. ve Murano, E. A., (1996), Detection of *Arcobacter* spp. in Ground Pork by Modified Plating Methods. *Journal of food protection* 59(5):448-452.
- Corry, J. E. L. ve Atabay, H. İ. (1997), Comparasion of the productivity of cefoperazone amphotericin teicoplanin (CAT) agar and modified charcoal cefoperazone deoxycholate (mCCD) agar for various strains of *Campylobacter*, *Arcobacter* and *Helicobacter pullorum*. *Int J Food Microbiol*. 16;38(2-3):201-9.
- Çiftci, A. ve Aksoy, A. (2015), Antibiyotiklere Karşı Oluşan Direnç Mekanizmaları. Türkiye Klinikleri *J Vet Sci Pharmacol Toxicol-Special Topics* 2015;1(2):1-10.
- Daş, Y. K. ve Atmaca, E., (2015), <http://www.researchgate.net/publication/281849530>.
- De Boer, E., Tilburg, J. J., Woodward, D. L., Lior, H. ve Johnson, W. M., (1996), A selective medium for the isolation of *Arcobacter* from meats. *Letters in Applied Microbiology* 23(1):64-6.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- De Smet, S., Vandamme, P., De Zutter, L., On, S. L.W., Doudah, L. ve Houf, K., (2011), *Arcobacter trophiarum* sp. nov., isolated from fattening pigs. *Int J Syst Evol Microbiol*, 61, 356-61.
- Doksanüçoğlu, Ç., (2006), Ankara'da Satışa Sunulan Tavuk Eti Örneklerinden *Arcobacter* Türlerinin İzolasyonu ve Bu İzolatların Değişik Antibiyotiklere Karşı Duyarlılıkları. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Donachie, S. P., Bowman, J. P., On, S. L.W. ve Alam, M., (2005), *Arcobacter halophilus* sp. nov., the first obligate halophile in the genus *Arcobacter*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55, 1271-7.
- Donlan, R. M., (2002), Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, Cilt: 8, No. 9.
- Doudah, L., De Zutter, L., Van Nieuwerburgh, F., Deforce, D., Ingmer, H., Vandenberg, O., Van den Abeele, A. M. ve Houf, K. (2014), Presence and analysis of plasmids in human and animal associated arcobacter species. *PLoS One*, 9, e85487.
- Ellis, W.A., Neill, S.D., O'Brien, J.J., Ferguson, H. W. ve Hanna, J., (1977), *Isolation of Spirillum/Vibrio-like organisms from bovine fetuses*. *Vet. Rec.* 100:451-2.
- Ellis, W. A., Neill, S. D., O'Brien, J. J. ve Hanna, J. (1978), Isolation of spirillum-like organisms from pig fetuses. *Vet. Rec.* 102:106.
- Ergüler, Ö., (2007), Ankara Yöresinde Tüketime Sunulan Tavuklardan *Campylobacter* Türlerinin İzolasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Ertaş, N., (2009), Kanatlı Etlerinde *Arcobacter* spp. Varlığı ve Önemi. *e-Journal of New World Sciences Academy*, Volume: 4, Number: 4, Article Number: 3B0007.
- Ertaş, N. ve Doğruer, Y., (2009), Sığır ve Koyun Kıymalarında *Arcobacter* Türlerinin Bulunma Sıklıklarının Multiplex PCR Tekniği İle Belirlenmesi. *F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.* 2009: 23 (2): 95 – 100.
- Etonsi, M. A., (2013), Studies on *Arcobacter* species, their isolation and pathogenicity. Doktora Tezi, Heriot-Watt Üniversitesi.
- EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters (2016-01-01 and 2016-01-20).
- Fera, M. T., Maugeri, T. L., Gugliandolo, C., La Camera, E., Lentini, V., Favaloro, A., Bonanno D. ve Carbone, M., (2008), Induction and resuscitation of viable nonculturable *Arcobacter butzleri* cells. *Appl Environ Microbiol*, 74, 3266-8.
- Fernandez, N., Diaz, E. E., Amils, R. ve Sanz, J. L., (2008), Analysis of microbial community during biofilm development in an anaerobic wastewater treatment reactor. *Microb Ecol*, 56, 121-32.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ferreira, S., Fraqueza, M. J., Queiroz, J. A., Domingues, F. C. ve Oleastro, M., (2013), Genetic diversity, antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Arcobacter butzleri* isolated from poultry and environment from a Portuguese slaughterhouse. *Int J Food Microbiol*, 162, 82-8.
- Ferreira, S., Queiroz, J. A., Oleastro, M. ve Domingues, F. C., (2015), Insights in the pathogenesis and resistance of *Arcobacter*: A review. *Crit Rev Microbiol*, 1-20.
- Figueras, M. J., Collado, L., Levican, A., Perez, J., Solsona, M. J. ve Yustes, C., (2011a), *Arcobacter molluscorum* sp. nov., a new species isolated from shellfish. *Syst Appl Microbiol*, 34, 105-9.
- Figueras, M. J. ve Gonzalez, L. C., (2013), Sanitary Importance of *Arcobacter*. Doktora Tezi, Rovira I Virgili Üniversitesi.
- Figueras, M. J., Levican, A., Collado, L., Inza, M. I. ve Yustes, C., (2011b), *Arcobacter ellisii* sp. nov., isolated from mussels. *Systematic and Applied Microbiology*, Cilt: 34, S: 414-418.
- Gonzalez, I., Garcia, T., Antolin, A., Hernandez, P. E., ve Martin, R., (2000), Development of a combined PCR-culture technique for the rapid detection of *Arcobacter* spp. in chicken meat. *Letters in Applied Microbiolog*, 2000, 30, 207-212.
- Guerrant, R. L., Steiner, T. S., Lima, A. A. M. ve Bobak, D. A., (1999), How Intestinal Bacteria Cause Disease. *The Journal of Infectious Diseases* 1999;179(Suppl 2):S331-7.
- Gülgör, G. ve Korukluoğlu, M., (2014), Mikroorganizmalar Arasında Çoğunluk Algılanması (Quorum Sensing). *U. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, Cilt: 28, No: 2, S: 83-92.
- Gün, İ. ve Ekinci, F. Y., (2009), Biyofilmler: Yüzeylerdeki Mikrobiyal Yaşam. *Gıda* (2009), 34 (3): 165-173
- Harrass, B., S. Schwarz & S. Wenzel (1998), Identification and characterization of *Arcobacter* isolates from broilers by biochemical tests, antimicrobial resistance patterns and plasmid analysis. *Journal of Veterinary Medicine*, Seri B, Cilt: 45, S: 87-94.
- Ho, H. T., Lipman, L. J. ve Gaastra, W., (2006), *Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent! *Vet Microbiol*, 115, 1-13.
- Ho, H. T., Lipman, L. J. ve Gaastra, W., (2008), The introduction of *Arcobacter* spp. in poultry slaughterhouses. *Int J Food Microbiol*, 125, 223-9.
- Houf, K., De Zutter, L., Van Hoof, J. ve Vandamme, P., (2002), Assessment of the Genetic Diversity among *Arcobacters* Isolated from Poultry Products by Using Two PCR-Based Typing Methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2172-2178.
- Houf, K., Devriese, L. A., De Zutter, L., Van Hoof, J. ve Vandamme, P., (2001), Development of a new protocol for the isolation and quantification of *Arcobacter* species from poultry products. *Int J Food Microbiol*, 71 2001 189-196.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Houf, K., On, S.L.W., Coenye, T., Debruyne, L., De Smet, S. ve Vandamme, P., (2009), *Arcobacter* thereius sp. nov., isolated from pigs and ducks. *Int J Syst Evol Microbiol*, 59, 2599-604.
- Houf, K., On, S.L.W., Coenye, T., Mast, J., Van Hoof, J. ve Vandamme, P., (2005), *Arcobacter* cibarius sp. nov., isolated from broiler carcasses. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55, 713-7.
- Hume, M. E., Harvey, R. B., Stanker, L. H., Droleskey, R. E., Poole, T. L. ve Zhang, H. B., (2001), Genotypic variation among arcobacter isolates from a farrow-to-finish swine facility. *J. Food Prot.*, Cilt: 64, No: 5, S: 645-651.
- İrkin, R. ve Korukluoğlu, M., (2008), Gıda Kaynaklı Bir Patojen: *Arcobacter*. *Gıda*, Cilt: 34, Sayı: 5.
- Jacob, J., Lior, H., ve Feuerpfeil, I., (1993), Isolation of *Arcobacter butzleri* from a drinking water reservoir in eastern Germany. *Z Hyg*, Cilt: 193, S: 557-562, 1993.
- Johnson, L. G. ve Murano, E. A., (1999), Comparison of three protocols for the isolation of *Arcobacter* from poultry. *J. Food Prot.* 62 (6):610-4.
- Karaboz, İ. ve Sukatar, A., (2004), Bakterilerde Sosyal Davranışlar (Bakterilerde İletişim Mekanizmaları). *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, Cilt: 2, Sayı: 5, Sayfa: 23-32.
- Kayman, T., (2012), *Arcobacter* Cinsi: Genel Özellikleri, Epidemiyoloji ve Laboratuvar Tanısı. *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg.* 42(2):43-50.
- Kiehlbauch, J. A., Brenner, D. J., Nicholson, M. A., Baker, C. N., Patton, C. M., Steigerwalt, A. G. ve Wachsmuth, I. K., (1991), *Campylobacter butzleri* sp. nov. Isolated from Humans and Animals with Diarrheal Illness. *Journal Of Clinical Microbiology*, S. 376-385.
- Kim, H. M., Hwang, C. Y. ve Cho, B. C. (2010), *Arcobacter marinus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60, 531-6.
- Kokare, C. R., Chakraborty, S., Khopade, A. N. ve Mahadik, K. R., (2009), Biofilm: Importance and applications. *Indian Journal of Biotechnology* Vol 8, S 159-168.
- Lal-Nag, M. ve Morin, P. J., (2009), The claudins. *Genome Biology*, 10:235
- Lehner, A., Tasara, T. ve Stephan, R., (2005), Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential foodborne pathogen. *Int J Food Microbiol*, 102, 127-35.
- Lerner, J., Brumberger, V. ve Preac-Mursic, V., (1994), Severe diarrhea associated with *Arcobacter butzleri*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* Vol 13, S 660-662.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Levican, A., Collado, L., Aguilar, C., Yustes, C., Diéguez, A. L., Romalde, J. L. ve Figueras, M. J., (2012), <https://www.researchgate.net/publication/221687772>.
- Levican, A., Collado, L. ve Figueras, M. J., (2013), *Arcobacter cloacae* sp. nov. and *Arcobacter suis* sp. nov., two new species isolated from food and sewage. *Systematic and Applied Microbiology* 36(1).
- Levican, A. ve Figueras, M. J. (2013), <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/13/220>.
- Levican, A., Rubio-Arcos, S., Martinez-Murcia, A., Collado, L. ve Figueras, M. J., (2015), *Arcobacter ebronensis* sp. nov. and *Arcobacter aquimarinus* sp. nov., two new species isolated from marine environment. *Syst Appl Microbiol*, 38, 30-5.
- Logan, E. F., Neill, S. D. ve Mackie, D. P., (1982), Mastitis in dairy cows associated with an aerotolerant campylobacter. *Vet. Rec.* 110(10):229-30.
- Lucia, R., Fegan, N. ve Vanderlinde, P., (2004), Isolation and characterisation of *Arcobacter butzleri* from meat. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 31-41.
- Mansfield, L. P. ve Forsythe, S. J., (2000), *Arcobacter butzleri*, *A. skirrowii* and *A. cryaerophilus* – Potential emerging human pathogens. *Reviews in Medical Microbiology* 11(3).
- McClung, C. R., Patriquin, D. G. ve Davis, R. E., (1983), *Campylobacter nitrofigilis* sp. nov., a Nitrogen-Fixing Bacterium Associated with Roots of *Spartina alterniflora* Loisel. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, Vol 33, No 3, S 605-612.
- McDonnell, G. ve Russell, A. D., (1999), Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, S 147–179.
- Merga, Y., C. Winstanley, N. J. Williams, E. Yee & W. G. Miller (2013), Complete Genome Sequence of the *Arcobacter butzleri* Cattle Isolate 7h1h. *Genome Announcements* 1(4): e00655-13.
- Miller, W. G., Wesley, I. V., On, S. L. W., Houf, K., Megraud, F., Wang, G., Yee, E., Srijan, A. ve Mason, C. J., (2009), First multi-locus sequence typing scheme for *Arcobacter* spp. *BMC Microbiol*, 9, 196.
- Moreno, Y., Botella, S., Alonso, J. L., Ferrus, M. A., Hernandez, M. ve Hernandez, J., (2003), Specific Detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* Strains in Water and Sewage by PCR and Fluorescent In Situ Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1181-1186.
- Neill, S.D., Campbell, J.N., O'Brien, J. J., Weatherup, S. T. C. ve Ellis, W. A., (1985), Taxonomic Position of *Campylobacter caviaeophila* sp. nov. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, Vol 35, No 3, S 342-56.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- O'Toole, G., Kaplan, H. B. ve Kolter, R., (2000), Biofilm Formation as Microbial Development. *Annu. Rev. Microbiol.* 2000. 54:49–79.
- Ok Anadut, F. ve Gümüşsoy, K. S., (2005), Kayseri’de Tüketime Sunulan Kanatlı Etlerinden *Arcobacter* Spp.’nin İzolasyonu. *Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences)* 14(2) 125-131, 2005.
- On, S. L. W., Harrington, C. S. ve Atabay, H. İ., (2003), Differentiation of *Arcobacter* species by numerical analysis of AFLP profiles and description of a novel *Arcobacter* from pig abortions and turkey faeces. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 1096-1105.
- On, S. L. W., Stacey, A. ve Smyth, J., (1995), Isolation of *Arcobacter butzleri* from a neonate with bacteraemia. *J Infect.* 31(3):225-7.
- Ongor, H., Cetinkaya, B., Acik, M. N. ve Atabay, H. İ., (2004), Investigation of arcobacters in meat and faecal samples of clinically healthy cattle in Turkey. *Letters in Applied Microbiology*, 38, 339-344.
- Pervical, S. L., Chalmers, R. M., Embrey, M., Hunter, P. R., Sellwood, J. ve Wyn-Jones, P., (2004), Microbiology of Waterborne Diseases.
- Poulsen, L. V., (1999), Microbial Biofilm in Food Processing. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 32, 321-326.
- Rahimi, E., (2014), Prevalence and antimicrobial resistance of *Arcobacter* species isolated from poultry meat in Iran. *Br Poult Sci*, 55, 174-80.
- Ramees, T. P., Rathore, R. S., Bagalkot, P. S., Kumar, G. V. P. P. S. R., Mohan, H. V., Anoopraj, R., Kumar, A. ve Dhama, K., (2014), Real-time PCR detection of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* in chicken meat samples. *Journal Of Pure And Applied Microbiology*, Cilt: 8(4), S: 3165-3169.
- Rasmussen, L. H., Kjeldgaard, J., Christensen, J. P., ve Ingmer, H., (2013), Multilocus sequence typing and biocide tolerance of *Arcobacter butzleri* from Danish broiler carcasses. *Rasmussen et al. BMC Research Notes*, 6:322.
- Rice, E. W., Rodgers, M. R., Wesley, I. V., C. Johnson, H. ve Tanner, S. A., (1999), Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water. *Letters in Applied Microbiology*, 28, 31–35.
- Ridsdale, J. A., Atabay, H. İ. ve Corry, J. E. L., (1999), *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. isolated from the carcasses and caeca of commercially reared duck. *Anaerobe* 5(3):317-320.
- Saraçlı, M. A., (2006), "Quorum sensing": mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor? *Gülhane Tıp Dergisi* 48: 244-250.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sasi Jyothsna, T. S., Rahul, K., Ramaprasad, E. V. V., Sasikala, C. ve Ramana, C. V., (2013), *Arcobacter anaerophilus* sp. nov., isolated from an estuarine sediment and emended description of the genus *Arcobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 4619–4625.
- Savaşan, S. ve Çiftci, A., (2003), *Arcobacter* Türleri: Genel Özellikler ve Sınıflandırma. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi* Cilt: 1, Sayı: 2, Sayfa: 37-48.
- Schroeder-Tucker, L., Wesley, I. V., Kiehlbauch, J. A., Larson, D. J., Thomas, L. A. ve Erickson, G. A., (1996), Phenotypic and Ribosomal RNA Characterization of *Arcobacter* Species Isolated from Porcine Aborted Fetuses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8, 186-195.
- Scullion, R., On, S. L. W., Madden, R. H. ve Harrington, C. S., (2001), Comparison of a multiplex PCR assay and AFLP profiling for speciation of *Arcobacter* spp. *International Journal of Medical Microbiology*, Vol 291 S 140.
- Serraino, A., Florio, D., Giacometti, F., Piva, S., Mion, D., ve Zanoni, R. G., (2013), Presence of *Campylobacter* and *Arcobacter* species in in-line milk filters of farms authorized to produce and sell raw milk and of a water buffalo dairy farm in Italy. *J Dairy Sci*, 96, 2801-7.
- Sevindik, E., Kır, A. Ç., Başkemer, K. ve Uzun, V., (2013), Hastalık Etmeni Patojen Teşhisinde PCR Teknolojisi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 6 (2): 131-135.
- Shah, A. H., Saleha, A. A., Zunita, Z., Cheah, Y. K., Murugaiyah, M. ve Korejo, N. A., (2012), Genetic characterization of *Arcobacter* isolates from various sources. *Vet Microbiol*, 160, 355-61.
- Shah, A. H., Saleha, A. A., Zunita, Z. ve Murugaiyah, M., (2011), *Arcobacter* – An emerging threat to animals and animal origin food products? *Trends in Food Science & Technology*, 22, 225-236.
- Shah, A. H., Saleha, A. A., Zunita, Z., Murugaiyah, M., Aliyu, A. B., ve Jafri, N., (2013), Prevalence, distribution and antibiotic resistance of emergent *Arcobacter* spp. from clinically healthy cattle and goats. *Transbound Emerg Dis*, 60, 9-16.
- Shams El-Din, S. A., (2013), Polymerase Chain Reaction Techniques: Applications in Parasitic Diseases. *PUJ*; 6(1): 19-34.
- Slater, F. R., Bailey, M. J., Tett, A. J., ve Turner, S. L., (2008), Progress towards understanding the fate of plasmids in bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol*, 66, 3-13.
- Stampi, S., Varoli, O., Zanetti, F. ve De Luca, G., (1993), *Arcobacter cryaerophilus* and thermophilic campylobacters in a sewage treatment plant in Italy: two secondary treatments compared. *Epidemiol. Infect.*, 110, 633-639.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Suarez, D. L., Wesley, I. V. ve Larson, D. J., (1997), Detection of *Arcobacter* species in gastric samples from swine. *Vet Microbiol.*, 16;57(4):325-36.
- Taylor, D. N., Kiehlbauch, J. A., Tee, W., Pitarangsi, C. ve Echeverria, P., (1991), Isolation of group 2 aerotolerant *Campylobacter* species from Thai children with diarrhea. *J Infect Dis.* 163(5):1062-7.
- Tazegül, E., (2010), Kars Bölgesindeki Su Kaynaklarından *Arcobacter* spp. İzolasyonu ve Multipleks PCR ile İdentifikasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Tee, W., Baird, R., Dyall-Smith, M. ve Dwyer, B., (1988), *Campylobacter cryaerophila* Isolated from a Human. *Journal Of Clinical Microbiology*, Vol 26, No 12, S 2469-2473.
- Toh, H., Sharma, V. K., Oshima, K., Kondo, S., Hattori, M., Ward, F. B., Free, A. ve Taylor, T. D., (2011), Complete genome sequences of *Arcobacter butzleri* ED-1 and *Arcobacter* spp. strain L, both isolated from a microbial fuel cell. *J Bacteriol*, 193, 6411-2.
- Turksen, K. ve Troy, T.-C., (2004), Barriers built on claudins. *J. Cell Sci.* 117, 2435-2447.
- U. Altun, H. ve Şener, B., (2008), Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2008; 39:82-88.
- Van den Abeele, A. M., Vogelaers, D., Van Hende, J. ve Houf, K., (2014) Prevalence of *Arcobacter* species among humans, Belgium, 2008-2013. *Emerg Infect Dis*, 20, 1731-4.
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R. ve De Ley, J., (1991), Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* Taxonomy: Emendation of Generic Descriptions and Proposal of *Arcobacter*. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, Vol 41, No 1, S 88-103.
- Vandamme, P. ve Goossens, H., (1992a), Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter*: A review. *Zentralbl Bakteriologie*. 276(4):447-72.
- Vandamme, P., Pugina, P., Benzi, G., Etterijck, R. V., Vlaes, L., Kersters, K., Butzler, J.-P., Lior, H. ve Lauwers, S., (1992b), Outbreak of Recurrent Abdominal Cramps Associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian School. *Journal Of Clinical Microbiology*, Cilt: 30, No: 9, S: 2335-2337.
- Vandamme, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Mels, L., Hoste, B., Dewettinck, D., Vlaes, L., Van Den Borre, C., Higgins, R., Hommez, J., Kersters, K., Butzler, J.-P. ve Goossens, H., (1992c), Polyphasic Taxonomic Study of the Emended Genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skiwovii* sp. nov., an Aerotolerant Bacterium Isolated from Veterinary Specimens. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, Cilt: 42, No: 3, S: 344-356.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

Vandenberg, O., Dediste, A., Houf, K., Ibekwem, S., Souayah, H., Cadranel, S., Douat, N., Zissis, G., Butzler, J.-P., ve Vandamme, P., (2004), Arcobacter species in humans. *Emerging infectious diseases*, 10, 1863.

Wesley, I. V., Wells, S. J., Harmon, K. M., Green, A., Schroeder-Tucker, L., Glover, M. ve Siddique, I., (2000), Fecal Shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in Dairy Cattle. *Applied And Environmental Microbiology*, Cilt: 66, No: 5, S: 1994–2000.

Whiteduck-Léveillé, K., Whiteduck-Léveillé, J., Lapen, D. R., Tambong, J. T., André Lévesque, C., Cloutier, M., Topp, E., Villemur, R., Chao, J., Talbot, G., Xu, R., Arts, M. T., Adam, Z. ve Khan, I. U. H., (2015), *Arcobacter lanthieri* sp. nov., isolated from pig and dairy cattle manure. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 2709-2716.

Wybo, I., Breynaert, J., Lauwers, S., Lindenburg, F. ve Houf, K., (2004), Isolation of *Arcobacter skirrowii* from a Patient with Chronic Diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 1851-1852.