

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



Sığır, tavuk, insan ve köpek orijinli *Campylobacter jejuni* izolatlarının multi locus sequence typing (MLST) ile genotiplendirilmesi ve kinolonlara direnç profilleri

**Proje No:
TSA-2013-4275**

**Proje Türü
Normal Araştırma Projesi**

SONUÇ RAPORU

**Proje Yürütücüsü
Prof.Dr. Fuat AYDIN**
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi,
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

**Araştırmacının Adı Soyadı
Doç.Dr. Seçil ABAY**
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi,
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri
Uzman Dr.Tuba KAYMAN
S.B. Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul.

Şubat 2016

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Bu projenin gerçekleştirilmesi için gerekli olan maddi desteği sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Başkanlığına ve proje süresince emeği geçen tüm BAP Birimi personeline; teşekkür ederim.

Prof.Dr. Fuat AYDIN
Proje Yürütücüsü

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM	7
2. GENEL BİLGİLER	7
3. GEREÇ VE YÖNTEM	14
4. BULGULAR	28
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	63
6. KAYNAKLAR	69

ÖZET

Sığır, tavuk, insan ve köpek orijinli *Campylobacter jejuni* izolatlarının multi locus sequence typing (MLST) ile genotiplendirilmesi ve kinolonlara direnç profilleri

Bu projede sığır, tavuk, insan ve köpek orijinli *Campylobacter jejuni* izolatlarının genotiplendirilmesi, kinolon grubu (nalidiksik asit, enrofloksasin ve siprofloksasin) antibiyotiklere karşı direnç profilleri ve direnç genlerinin saptanması amaçlanmıştır.

Bu amaçla 178 *C. jejuni* izolatu (77 insan, 34 köpek, 35 sığır ve 32 tavuk izolatu) kullanıldı. Genotiplendirme için multi locus sequence typing (MLST), antibakteriyel duyarlılık testi için E Test, kromozomal direnç genlerinin saptanması amacıyla Mismatch Amplification Mutation Assay, Polymerase Chain Reaction (MAMA-PCR)'dan yararlanıldı. MLST analizinde insan izolatlarında 43, Köpek izolatlarında 23, Sığır izolatlarında 18, tavuk izolatlarında da 21 sekans tipi tanımlandı. Ayrıca başka ülkelerde rapor edilmeyen 3 yeni ST (ST 8082, ST 8083 ve ST 8084) ilk kez bu çalışma ile yurdumuzda tanımlanmıştır. Kinolon direnci insan izolatlarında %42.85, köpek izolatlarında %20.58 sığır izolatlarında %2,85 ve tavuk izolatlarında ise %43,75 olarak belirlendi. Genomik kinolon direncinde, gyrA geni üzerindeki mutasyonlar sekans analizi ile tespit edildi. Kinolon dirençli *C.jejuni* izolatlarında Tre-86-İle mutasyonuna rastlanırken duyarlı izolatlarda bu mutasyona rastlanmadı. Kinolonlara dirençli *C.jejuni* izolatları plazmid ilişkili kinolon direnç geni yönünden negatif bulundu.

Anahtar kelimeler: *Campylobacter jejuni*, ERIC PCR, E test, multi locus sequence typing (MLST), quinolone direnci

ABSTRACT

Genotyping of *Campylobacter jejuni* isolates originated from cattle, chicken, human and canine by using Multi Mocus Sequence Typing (MLST) and quinolone resistance profiles of the isolates

In this Project, genotyping, resistance profiles to quinolone groups of antibiotics (nalidixic acid, enrofloxacin and ciprofloxacin) and determination of resistance genes of *Campylobacter jejuni* isolates originated from cattle, chicken, human and canine were aimed. For this purpose, 178 *C.jejuni* isolates (77 human, 34 dogs, 35 cows and 32 chicken isolates) were used. Multi locus sequence typing (MLST) and E test were performed for genotyping and antibacterial susceptibility respectively. In order to detect of chromosomal resistance genes, Mismatch Amplification Mutation Assay, Polymerase Chain Reaction (MAMA-PCR) was used. Forty-three ST's in human isolates, 23 ST's in dog isolates, 18 ST's in cattle isolates and 21 ST's in chicken isolates were identified in MLST analysis. Also, It was first described three novel ST's (ST 8082, ST 8083 and ST 8084) in our country by this study that have never been reported in other countries. Quinolone resistance was identified as 42.85%, 20.58%, 2.85% and 43.75% in human, dog, cattle and chicken isolates respectively. In chromosomal quinolone resistance, the mutations in *gyrA* gene were detected by using sequencing analysis. While, Tre-86-Ile mutation was found in quinolone resistant *C.jejuni* isolates, but these mutations were not detected in susceptible isolates. All quinolone resistant *C.jejuni* isolates were found to be negative in terms of the plasmid-mediated quinolone resistance gene

Key words: *Campylobacter jejuni*, ERIC PCR, E test, multi locus sequence typing (MLST), quinolone resistance

1-GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Yapılan çalışmalar, *Campylobacter* türlerinin özellikle gelişmiş batı ülkelerinde, insanlardaki bakteriyel gastroenteritler arasında birinci sırada yer aldığını göstermektedir. Mevcut bilgilerimize göre yurdumuzda insanlarda gözlenen *Campylobacter jejuni* enteriti ile ilgili ilk çalışma 1984 yılında Tezcan ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu tarihten sonra gerek veteriner hekimlik alanında ve gerekse beşeri hekimlik alanında bu mikroorganizmanın bulunduğu kaynaklar, fenotiplendirilmesi, genotiplendirilmesi, antibiyotik duyarlılığı vb. çok sayıda değerli araştırma yapılmıştır.

Bu projede;

1-Sığır, tavuk, insan ve köpek orijinli *Campylobacter jejuni* izolatlarının multi locus sequence typing (MLST) ile genetik homolojilerinin saptanması,

2-İzolatların kinolon grubu (nalidiksik asit, enrofloksasin ve siprofloksasin) antibiyotiklere karşı direncinin E Test yöntemi ile (MIC değerlerinin belirlenmesi) saptanması ve dirençli bulunan izolatlarda bu antibiyotiklere ait direnç genlerinin varlığının moleküler metodla araştırılması ve sonuçlarının yorumlanması amaçlanmıştır.

Bu amaçla çalışmada toplam 178 *C. jejuni* izolatı kullanıldı. Bu izolatlar Tablo 1’de detaylı bilgisi verilen 1080 izolat içerisinde seçilmiştir.

Değişik kaynaklardan elde edilen *C.jejuni* izolatlarının moleküler analizi ve genotiplendirilmesi özellikle infeksiyonun kaynağını tanımlama açısından oldukça önemlidir. Multi locus sequence typing (MLST) yakın zamanda geliştirilmiş olan bir moleküler tiplendirme yöntemidir. Hücredeki housekeeping genlerin amplifikasyonu ve sekansını takiben elde edilen allel sayılarının bir veritabanında değerlendirilerek bakterilerin genotiplendirilmesi esasına dayanmaktadır. *Campylobacter jejuni* genomu üzerinde) yer alan, **aspA** (aspartase A), **glnA** (glutamine synthetase), **gltA** (citrate synthase), **glyA** (serine hydroxymethyltransferase), **pgm** (phosphoglucomutase), **tkt** (transketolase), ve **uncA** (ATP synthase alpha subunit) adlı 7 farklı gen lokusunun amplifikasyonu sekans analizi yapılmaktadır.

2-GENEL BİLGİLER

Epsilonproteobacteria sınıfında bulunan *Campylobacter* Genusu 6 alt tür ve 2 biovar olmak üzere toplam 18 tür içermektedir. Bunlar *C. coli*, *C. concisus*, *C. curvus*, *C. fetus* subsp. *fetus*, *C. fetus* subsp. *venerealis*, *C. gracilis*, *C. helveticus*, *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii*, *C. hyoilei*, *C. jejuni* subsp. *doylei*, *C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. lari*, *C. mucosalis*, *C. rectus*, *C. showae*, *C. sputorum* bv. *Sputorum*, *C. sputorum* bv.

Faecalis, *C. upsaliensis*, *C. insulaenigrae*, *C. lanienae* ve *C. hominis*'dir (On 2001; Foster ve ark., 2004; Humphrey ve ark., 2007). Bu Genusda yer alan *C. jejuni*, *C.coli*, *C.lari* ve *C.upsaliensis* 42°C'de de üremelerinden dolayı, "termofilik kampilobakterler" olarak da adlandırılırlar. Grupta yer alan ve dominant tür olan *C. jejuni*'dir. Kampilobakterler, Gram negatif, hareketli, mikroaerofilik, kapsülsüz, sporsuz, aside dirençli olmayan, kıvrımlı çomakcıklar şeklinde mikroskobik görünüme sahip mikroorganizmalardır. Sahip oldukları kıvrımların sayısına göre mikroskopta "S", "virgül" veya "martı kanadı" şeklinde görülürler. Katı besiyerlerinde yaygın, basık, düzensiz kenarlı, sulu görümlü şekilsiz koloniler oluştururlar. Ancak koloni yapısı besiyerindeki nem ile yakından ilişkilidir. Kanlı agardaki kolonileri genellikle nonhemolitikdir. Oksidaz ve katalaz aktiviteleri pozitif, indol aktiviteleri ise negatif olup, seleniti redükte etme yeteneğine sahip değildirler. (Smibert 1984, Diker 1997; Quinn ve ark., 1998). Kapsül ve fimbria niteliğinde bir organele sahip değildirler. *C. jejuni* ve *C. coli* suşlarına spesifik litik fajların varlığı saptanmıştır. *C. jejuni* suşlarının önemli bir bölümü kloramfenikol, kanamisin ve tetrasiklinlere dirençliliği ile ilişkili plazmid taşımaktadırlar (Diker 1997). "Termofilik kampilobakterler"çeşitli türden evcil ve yabani hayvanların gastro-intestinal sistem floralarında bulunmaktadır (Yogasundram ve ark., 1989; Oyarzabal ve ark.,1995; Atabay ve Corry 1997; Hudson ve ark., 1999; Aydın ve ark., 2001, Cokal ve ark. 2009). Termofilik kampilobakterler içinde yer alan *C. jejuni*'nin dominant tür olduğu kabul edilmekte ve çalışmaların genellikle bu tür üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir. Ancak diğer 3 türün de gerek hayvan infeksiyonlarında ve gerekse insan infeksiyonlarındaki rolleri üzerinde detaylı çalışmalar mevcuttur. *C. jejuni* evcil hayvanlar için sindirim sistemi infeksiyonlarına neden olan önemli bir enterik patojendir (Diker 1997; Erganiş ve Yanarates 1995). Bunun yanında *Campylobacter jejuni*'nin evcil hayvan türlerinde mastitis ve abortuslara da neden olduğu ortaya konmuştur (Diker ve İstanbulluoğlu 1986; Quinn ve ark.,1998). *C. jejuni* insanlarda, başta endüstrileşmiş ülkeler olmak üzere tüm dünyada gastroenteritlerin önemli bir etkeni olarak yer almaktadır. İnsanlardaki *C. jejuni* infeksiyonlarının akut semptomları ishal, ateş ve karın ağrısıdır. Bununla beraber kolitis, reaktif artiritis ile Miller-Fisher ve Guilliane-Barre sendromlarını içeren nörolojik komplikasyonlara da neden olmaktadır (Yıldırım ve ark., 1996; Alterkuse ve ark., 1999; Friedman ve ark., 2000; Butzler 2004).

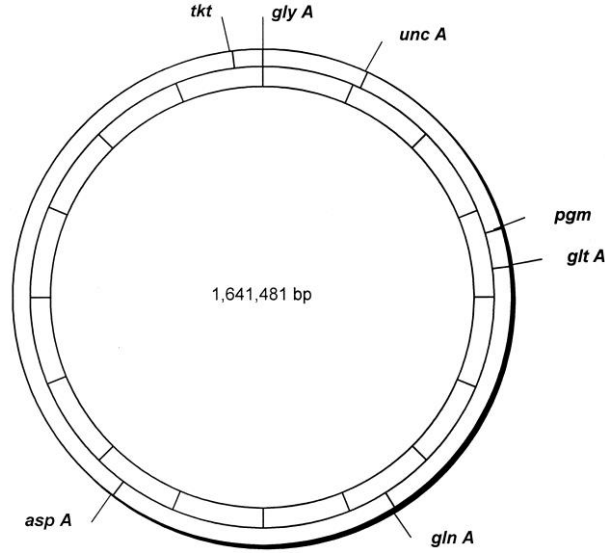
İnsanlarda görülen kampilobakteriyozis gıda orijinli bir infeksiyondur. Kampilobakterler gastroenteritlerden, ülkelere ve bölgelere göre değişmek üzere % 4-35 arasında izole edilmektedirler. İnsanlardaki bu infeksiyon için en önemli kaynaklar kontamine et, süt ve

sudur. Özellikle de kanatlı etleri (**Gormley ve ark., 2008**) çok önemli bir kaynak olarak gösterilmektedir. Bunun yanında pet hayvanları (kedi, köpek), ve uluslararası seyahat de infeksiyon kaynağı ve sebebidir. Bulaşma, portör hayvanlarla direkt temas ve kontamine hayvansal ürünlerin (et, süt) ellenmesi ve tüketilmesi sonucu meydana gelmektedir (**Gürkan ve Diker 1994; Alterkuse ve ark., 1994; Özer ve Ergün 1999; Wolfs ve ark., 2001; Broman ve ark., 2004; Peterson 2003; Butzler 2004; Gormley ve ark., 2008; Acke ve ark., 2009**). Çeşitli kaynaklardan izole edilen *C. jejuni*'nin diğer kampilobakter türlerinden ayırt edilmesinde değişik ısılarda (25, 37 ve 42°C) üreme, hippurat hidrolizi, nalidiksik asit ve sefalotine duyarlılık gibi testlerden yararlanılmaktadır (**Aydın ve ark., 2001; Quinn ve ark., 1998**). Ancak identifikasyonda kullanılan fenotipik testlerin, türlerin tanımlanmasında her zaman etkin olmadığı da rapor edilmektedir (**Rautelin ve ark., 1999; On 2001**). Yine insan infeksiyon olgularından ayrılan izolatlar çoğunlukla *Campylobacter* spp. olarak Genus düzeyinde isimlendirilmektedirler.

Diğer gıda orijinli infeksiyonlarda olduğu gibi insanlardaki Campylobacteriosis'de de bulaşma yolu ve infeksiyon kaynağının belirlenmesi oldukça önemlidir. Çeşitli hayvan türlerinin sindirim sisteminde yaygın olarak bulunan ve aynı zamanda insan ve hayvanlarda enteritis, evcil türlerde mastitis ve abortusa neden olan *C. jejuni*'nin epidemiyolojisine ilişkin detaylı araştırmalar yapılmıştır. Bu amaçla *C. jejuni* suşları içindeki çeşitlilik, fenotipik ve genotipik özellikler esas alınarak saptanmaya çalışılmıştır (**Wassenaar ve Newell 2000**). Bunlardan yaygın olarak kullanılan fenotipik prosedür serotiplendirmedir. Kabul görmüş iki önemli serotiplendirme metodu vardır. Bunlar; Penner ve Lior tiplendirme metotlarıdır (**Lior 1984; Wassenaar ve Newell 2000**). Bu metotlar, çok sayıda suşun tiplendirilememesi, çok zaman almaları, teknik donanım ihtiyacı duymaları, her laboratuvarıda uygulanamaması, ulusal ve uluslararası nitelikteki epidemiyolojik çalışmaları sınırlandırmış olması, antiserum ve reagent'lerin hazırlanmasının pahalı olması gibi dezavantajlara sahiptir. Bu yüzden alternatif alt tiplendirme metotlarına ihtiyaç duyulmuş ve bakterilerin genetik özelliklerinin esas alındığı moleküler alt tiplendirme metotları geliştirilmiştir (**Wassenaar ve Newell 2000**). Moleküler tekniklerden bazıları, ribotyping, pulsed field gel electrophoresis (PFGE), flagellin typing (fla typing), Random amplified polymorphic DNA (RAPD), Amplified fragment length polymorphism (AFLP)'dir. Bu tekniklerin en önemli avantajı birçok laboratuvarıda yaygın olarak kullanılması ve bu metotların kolaylıkla elde edilebilmesidir (**Kiuchi ve ark., 2000; Nielsen ve ark., 2000; Smith ve ark., 2000; Ribot ve ark., 2001; Wassenaar ve Newell 2000; Ertaş ve ark., 2004; Broman ve ark., 2004; Eyles ve ark., 2006**). Kiuchi ve

ark.,(2000) PCR-RFLP tekniğinde restriksiyon enzimi olarak *Mbo* I kullanmışlar ve kanatlı orijinli *C. jejuni* suşlarını 4 gruba ayırmışlardır. Araştırmacılar bu tekniğin epidemiyolojik tiplendirme için değerli bir teknik olduğunu bildirmişlerdir. **Nielsen ve ark.(2000)** insan, sığır ve kanatlı orijinli 90 *C. jejuni* suşunun, PCR-RFLP metodunun da içinde bulunduğu 6 metotla alt tiplendirmesini yapmışlardır. Araştırmacılar PCR-RFLP ile tüm suşların tiplendirilebildiğini ve ayrıca 2 sığır ve insan izolatının benzer olduğunu bildirmişlerdir. Yine **Aydın ve ark., (2007a)** Türkiye’de, değişik kaynaklardan izole edilen *C.jejuni* izolatlarını bu yöntemle tiplendirme çalışmalarında insan izolatlarına benzer bant veren izolata rastlanmadığını rapor etmişlerdir. Moleküler tiplendirme için kullanılan pulsed field gel electrophoresis (PFGE)’in ise daha duyarlı olduğu kabul edilmekte ve çeşitli kaynaklardan izole edilen kampilobakterlerin genetik yakınlıklarının belirlenmesi ve insan infeksiyonlarından izole edilen kampilobakterler ile ilgili olası risk faktörleri hakkında yorum yapılabilecek bilgilere ulaşılmasında oldukça faydalı olduğu ve özellikle iki restriksiyon enzimi (*Sma*I ve *Sac*II/*Kpn*I) birlikte kullanıldığında izolatlar arasında oldukça yüksek ayırım gücüne sahip olduğu bildirilmektedir (**Cornelius ve ark., 2005; Eyles ve ark., 2006**).

Son yıllarda oldukça önem kazanan bir diğer moleküler tiplendirme metodu, **Dingle ve ark.(2001)** tarafından kampilobakterler için geliştirilmiş olan multi locus sequence typing (MLST)’dir. Bu yöntemde *Campylobacter jejuni* genomu üzerinde (1,641,481 bp) yer alan, *aspA* (aspartase A), *glnA* (glutamine synthetase), *gltA* (citrate synthase), *glyA* (serine hydroxymethyltransferase), *pgm* (phosphoglucosutase), *tkt* (transketolase), ve *uncA* (ATP synthase alpha subunit) adlı 7 farklı gen lokusunun dizi analizi yapılır. Bakterilerde meydana gelen mutasyon ve rekombinasyon gibi değişiklikler kromozomlarda genetik farklılıklara neden olmaktadır. Hücredeki metabolik fonksiyonların devamını sağlayan protein kodlayan genler (housekeeping) meydana gelen bu genetik değişimlere karşı oldukça dayanıklıdırlar. Bu gen bölgeleri aşağıda şematize edilmiştir.



C. jejuni'de MLST için kullanılan 7 gen Lokusunun kromozomal lokasyonu (**Dingle ark. 2001**).

Bu yüzden yukarıda belirtilen 7 gen MLST'de hedef gen olarak kullanılmaktadır. MLST'de 7 gen bölgesi amplifiye edilir ve sonra ampikonların purifikasyonunu takiben sekans analizleri yapılır ve elde edilen allellik bulgularına göre izolata bir numara verilir. Bu yöntemde elde edilen alt tipe STs (Sequence types) adı verilmekte ve bu alt tipler bir program aracılığıyla (BURST) clonal complexes (CC) içinde gruplandırılırlar. Bu yöntemle ilgili olarak İngiltere orijinli **PUBMLST** (<http://pubmlst.org/campylobacter/>) adlı online bir veri tabanı kurulmuş olup, araştırmacılar tarafından elde edilen sekans sonuçları ve allel sayıları bu sisteme dahil edilerek, sistemde bulunan sekans tipleriyle (STs) karşılaştırılabilmektedir ve izolatanın numarası sistemde mevcut değilse yeni bir STs veya CC verilmektedir. Bu sayede değişik coğrafik lokalizasyonlardan farklı genotiplerin varlığı veya izolatların klonları hakkında bilgi edinilebilmektedir.

Gormley ark (2008) insan enterit olgularından ve tavuk etlerinden 2001 ve 2006 yıllarında ayırdıkları *C.jejuni* izolatlarını mlst ile analiz etmişler ve CC-21'in 2006 yılında 2001 yılına oranla prevalansının daha düşük olduğunu bildirmişler ve insan enfeksiyonları için kanatlı etlerinin önemini vurgulamışlardır. **Nielsen ve ark. (2010)** Danimarka'da 2002 ve 2003 yıllarına ait klinik olgulardan ayrılan insan orijinli 122 *C.jejuni* izolatının populasyon yapısını ve farklılığını saptamak için mlst kullanmışlardır. Araştırmacılar 18 klonal kompleks içinde 51 sekans tipi (STs) identifiye etmişler ve elde ettikleri **ST-21**, **ST-45** ve **ST-22** klonal komplekslerinin tüm izolatların %64'ü olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada Danimarka orijinli *C.jejuni* izolatları arasında klonal farklılığın olduğunu da rapor etmişlerdir. **Sproston**

ve ark.(2010) sinek ve sümüklü böceklerden izole ettikleri *Campylobacter* izolatlarını MLST ile tiplendirmişler ve en yaygın görülen tipin (%40) *C.coli* ST-962 olduğunu, ayrıca sümüklü böcek orijinli 2 izolatın da ilk kez izole edilen STs olduğunu bildirmişlerdir. Yine yakın zamanda Japonya’da tanımlanan yeni ST’lerin (ST4526) o coğrafyaya özgü olduğu bildirilmiştir (**Asakura ve ark., 2012**). Çeşitli kaynaklardan ayrılan kampilobakterlerin MLST ile genotiplendirilmesine ilişkin yurdumuzda yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

Kampilobakterler ile ilgili olarak yürütülen ve üstünde önemli durulan bir diğer konu da antibiyotiklere olan direnç durumudur. Şöyle ki bu mikroorganizmalar zoonotik karakterde etkenler olduğundan çeşitli antibiyotiklere özellikle de florokinolonlara karşı dirençli suşlar ile oluşan infeksiyonlar oldukça önem arz etmektedir. Çeşitli kaynaklardan ve insan infeksiyon olgularından ayrılan kampilobakter izolatlarının antibiyotiklere olan duyarlılıkları ile ilgili değişik lokalizasyonlarda çalışmalar yapılmıştır (**Yıldırım ve ark., 1996; Ishiara ve ark., 2006; Joonbae ve ark., 2007; Öngen ve ark., 2007; Bostan ve ark., 2009**). Tüm bu çalışmalarda insan infeksiyon olgularından ayrılan izolatlardaki direnç durumunun, çevresel ve gıda orijinli dirençli kampilobakterler ile ilişkisi vurgulanmaktadır (**Unicomb ve ark., 2006; Nelson ve ark., 2007; Praakle-Amin ve ark., 2007; Woźniak ve ark., 2011**).

Ancak hayvansal üretimde kullanılan özellikle de florokinolonlar, makrolidler ve tetrasiklinlere karşı Kampilobakterler arasında antimikrobiyal direnç gelişimi ortaya çıkmıştır. Bu yüzden özellikle Avrupa Birliği ülkelerinde bu direnç durumu gözlem altına alınmış halk sağlığını tehdit eden zoonotik hastalık etkenlerinin antimikrobiyal dirençliliğinin takibi zorunlu kılınmıştır (**EFSA 2008**).

Yurdumuzda, antibiyotiklere dirençlilik ile ilgili olarak **Savaşan ve ark. (2004)**, kanatlı orijinli kampilobakter izolatlarında kinolon direncinin yıllar içerisinde seyrine ilişkin yürüttükleri çalışmada, Fluoroquinolone dirençli suşların 1992 yılında 28 broiler işletmesinin % 7,1’inde, 2000 yılında ise 14 işletmenin % 92,9’unda belirlendiğini vurgulamışlardır. **Bostan ve ark.,(2009)** 1 yıllık periyot boyunca tavuk sığır ve koyun etlerinden Termofilik kampilobakter türlerinin izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıkları ile yürüttükleri çalışmada anılan kaynaklarda termofilik kampilobakterlerin prevalansında bu periyot içinde önemli bir değişiklik olmadığını ve izolatların çoğunlukla tetrasiklinlere dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Yurdumuzda hayvan kökenli kampilobakter izolatlarının antibiyotik direncinin genetik analizi ile ilgili yürütülen bir çalışmada (**Diker 2008**) siprofloksasin dirençli 138 kampilobakter suşunun %19.6’sında gyrA geninde Thr-86-İle mutasyon saptanmıştır. Thr-86-İle mutasyonu görülen siprofloksasin dirençli suşların tümünde MIC

değerinin 32 mcg/ml üzerinde yer aldığı da belirlenmiştir. Çalışmada kampilobakter suşlarında plazmid kökenli kinolon dirençliliği de araştırılmış ancak qnr geni test edilen izolatların hiçbirisinde bulunamamıştır. Yine bu çalışmada izolatların tetrasiklin direncine ilişkin olarak tetO geni de araştırılmıştır. tetO geni kampilobakter suşlarının 77'sinde (%31), tetrasiklin dirençli 79 suşun %97.5'inde bulunmuştur. Çalışmada tetO geni, plazmid taşıyan tetrasiklin dirençli suşların 65'inde (%84.4) bulunurken, plazmid taşımayan 12 (%15.6) tetrasiklin dirençli suşta da belirlenmiş ayrıca plazmid taşıyan ve tetO geni bulunan suşların MIC değerlerinin 16-512 mcg/ml arasında, plazmid taşımayan tetO pozitif suşların MIC değerlerinin de 16-32 mcg/ml arasında yer aldığı rapor edilmiştir.

Yurdumuzda yapılan çalışmalarda, insan gastroenteritlerinden ayrılan *Campylobacter jejuni* izolatlarının fenotipik yöntemler ile yapılan duyarlılık testlerinde özellikle kinolonlara ve tetrasiklinlere karşı yıllar içinde gelişen bir dirence vurgu yapılmaktadır. **Gür ve ark.(1989)** yaptıkları çalışmada kampilobakter izolatlarının tümünü kinolonlara duyarlı bulurken, **Akan ve ark.(1994)** 119 kampilobakter izolatının sadece 1'inde kinolon direnci saptamışlardır. Kinolon direncini **Yıldırım ve ark.(1996)** %26, **Öncül ve ark (2003)** 1998 yılında izole ettikleri kampilobakter izolatları için %14, **Öngen ve ark. (2007)** %59, **Güney ve Başustaoğlu (2010)** %64.3, **Kayman ve ark.(2010)** %89 olarak bildirmişlerdir. Kinolon türevi olan enrofloksasin ve sarafloksasinin veteriner alanda enfeksiyondan korunma, hızlı büyüme ve et verimini artırma amacıyla kullanılıyor olmasının bu direnç gelişimine katkı sağladığı ileri sürülmektedir (**Yıldırım ve ark.1996**).

Bilgilerimize göre yurdumuzda insan orijinli kampilobakterlerde gözlenen antibakteriyel direncin genetik analizine ilişkin olarak yürütülen detaylı bir çalışma da bulunmamaktadır. Ancak **Nazik ve Öngen (2006)** MİK değerleri esas alınarak yapılan değerlendirmede dirençli olan 35 kampilobakter izolatının hiç birinde kinolon direnç geni belirleyemediklerini ve bu direncin plazmid kaynaklı olmadığını bildirmişlerdir.

Antibiyotiklere direncin genetik analizi ile ilgili diğer ülkelerde çalışmalar yapılmış (**Avrain ve ark., 2004, Pratt ve Korolik 2005**) olmakla birlikte, ülkemizde kampilobakterlerin tetrasiklin ve kinolonlara karşı direnç durumları hakkında yorum yapılabilecek düzeyde araştırma bulunmamaktadır. Bu antibiyotiklere dirençle ilgili olarak, gerek kromozomal ve gerekse plazmit aracılı direnç genlerinin prevalansının takibinin, gelecekte bu antibiyotiklerin tedavi protokollerindeki yerine ışık tutması açısından önemli olduğu düşünülmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılan *Campylobacter jejuni* izolatlarının kaynağı

Çalışmada toplam 178 *C. jejuni* izolatı kullanıldı. Bu izolatlar aşağıda detaylı bilgisi verilen 1080 izolat içerisinde seçilmiştir (Tablo.1).

Tablo1. Çalışmada kullanılan *C. jejuni* izolatlarının kaynağı ve sayıları

Kaynak	Toplam izolat sayısı	MLST için kullanılan izolat sayısı
İnsan	77	77
Köpek	360	34
Sığır	243	35
Tavuk	400	32
Toplam	1080	178

İnsan orijinli *C.jejuni* izolatları

Çalışmada, VHAG-1834 No'lu projede elde edilen 77 adet insan orijinli *C.jejuni* izolatı kullanıldı. Bu izolatlar anılan proje kapsamında Kayseri Devlet Hastanesi ve ERÜ Tıp Fakültesi'nde akut gastroenterit olgularından izole edilmişlerdir.

Tavuk orijinli *C. jejuni* izolatları

Araştırmada tavuk orijinli toplam 400 izolattan yararlanıldı. İzolatların 300'ü Kayseri şehir merkezinde satılan ve farklı firmalara ait olan tavuk etlerinden, 100'ü de 42 günlük broilerlerin barsak içeriğinden izole edilmişlerdir.

Köpek orijinli *C. jejuni* izolatları

Çalışmada toplam 360 *C.jejuni* izolatı kullanıldı. İzolatların 11'i gastroenteritli, 349'da sağlıklı köpeklerin rektal swaplarından izole edilmişlerdir.

Sığır orijinli *C. jejuni* izolatları

Araştırmada 223'ü sağlıklı sığırların safrasından 20'si de gastroenteritli buzağılardan izole edilen toplam 243 adet *C. jejuni* izolatı kullanıldı.

Standart Suş

Çalışmada, gerek kültürel yoklamalarda ve gerekse moleküler analizlerin yürütülmesinde kontrol amacıyla *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 suşu kullanıldı.

***C. jejuni* Multiplex PCR primerleri**

Gen	Primer	Sekans 5'-3'	Amplikon büyüklüğü (bp)
<i>C. jejuni hipO</i>	CJF	ACTTCTTTATTGCTTGCTGC	323
	CJR	GCCACAACAAGTAAAGAAGC	
<i>C. coli glyA</i>	CCF	GTAAAACCAAAGCTTATCGTG	126
	CCR	TCCAGCAATGTGTGCAATG	
<i>C. lari glyA</i>	CLF	TAGAGAGATAGCAAAAGAGA	251
	CLR	TACACATAATAATCCCACCC	
<i>C. upsaliensis glyA</i>	CUF	AATTGAAACTCTTGCTATCC	204
	CUR	TCATACATTTTACCCGAGCT	
<i>C. fetus sapB2</i>	CFF	GCAAATATAAATGTAAGCGGAGAG	435
	CFR	TGCAGCGGCCCCACCTAT	
<i>C. jejuni</i> 23S rRNA	23SF	TATACCGGTAAGGAGTGCTGGAG	650
	23SR	ATCAATTAACCTTCGAGCACCG	

ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus- Polymerase Chain Reaction) primerleri

Primer		Sekans 5'-3'
ERIC motif	1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC
	2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG

MLST Amplifikasyon primerleri

C.jejuni izolatlarının *aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt* ve *uncA* gen bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan primer dizileri ve meydana getirdiği bant büyüklüğü aşağıda verilmiştir.

Lokus	Sekans 5'-3'	Amplikon büyüklüğü (bp)
<i>aspA</i>	A9, AGT ACT AAT GAT GCT TAT CC A10, ATT TCA TCA ATT TGT TCT TTG C	899
<i>glnA</i>	A1, TAG GAA CTT GGC ATC ATA TTA CC A2, TTG GAC GAG CTT CTA CTG GC	1,262
<i>gltA</i>	A1, GGG CTT GAC TTC TAC AGC TAC TTG A2, CCA AAT AAA GTT GTC TTG GAC GG	1,012
<i>glyA</i>	A1, GAG TTA GAG CGT CAA TGT GAA GG A2, AAA CCT CTG GCA GTA AGG GC	816
<i>pgm</i>	A7, TAC TAA TAA TAT CTT AGT AGG A8, CAC AAC ATT TTT CAT TTC TTT TTC A1, TTG GAA CTG ATG GAG TTC G A2, AAG AGC TTA ATA TCT CTG GCT TCT AG	1,150
<i>tkt</i>	A3, GCA AAC TCA GGA CAC CCA GG A6, AAA GCA TTG TTA ATG GCT GC	1,102
<i>uncA</i>	A2, GCT AAG CGG AGA ATA AGG TGG A7, ATG GAC TTA AGA ATA TTA TGG C	1,120

MLST Sekans primerleri

C.jejuni izolatlarına ait amplifiye edilmiş olan *aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt* ve *uncA* gen bölgelerinin sekanslanması için kullanılan primer dizileri ve fragman büyüklüğü aşağıda verilmiştir.

Lokus	Sekans 5' - 3'	Fragman büyüklüğü (bp)
<i>aspA</i>	<i>asp</i> -S3, CCA ACT GCA AGA TGC TGT ACC <i>asp</i> -S6, TTA ATT TGC GGT AAT ACC ATC	477
<i>glnA</i>	<i>gln</i> -S3, CAT GCA ATC AAT GAA GAA AC <i>gln</i> -S6, TTC CAT AAG CTC ATA TGA AC	477
<i>gltA</i>	<i>glt</i> -S1, GTG GCT ATC CTA TAG AGT GGC <i>glt</i> -S6, CCA AAG CGC ACC AAT ACC TG	402
<i>glyA</i>	<i>gly</i> -S3, AGC TAA TCA AGG TGT TTA TGC GG <i>gly</i> -S4, AGG TGA TTA TCC GTT CCA TCG C	507
<i>pgm</i>	<i>pgm</i> -S5, GGT TTT AGA TGT GGC TCA TG <i>pgm</i> -S2, TCC AGA ATA GCG AAA TAA GG	498
<i>tkt</i>	<i>tkt</i> -S5, GCT TAG CAG ATA TTT TAA GTG <i>tkt</i> -S4, ACT TCT TCA CCC AAA GGT GCG	459
<i>uncA</i>	<i>unc</i> -S5, TGT TGC AAT TGG TCA AAA GC <i>unc</i> -S4, TGC CTC ATC TAA ATC ACT AGC	489

Antibiyotik direnç genlerinin saptanmasında kullanılan primerler

Primer		Sekans 5' - 3'
CampyMAMAgryA1	Forward	TTT TTA GCA AAG ATT CTG AT
CampyMAMAgryA5	Reverse	CAA AGA TCA TAA ACT GCA A
GZgyrA4	Reverse	CAG TAT AAC GCA TCG CAG CG
GZgyrA5	Forward	ATT TTT AGC AAA GAT TCT GAT
GZgyrA6	Reverse	CCA TAA ATT ATT CCA CCT GT
GZgyrA7	Nested Forward	TTA TTA TAG GTC GTG CTT TG
GZgyrA8	Nested Reverse	TAG AAG GTA AAA CAT CAG GTT
QP1	Forward	GATAAAGTTTTTCAGCAAGAGG
QP2	Reverse	ATCCAGATCGGCAAAGGTTA

Moleküler analiz sarf malzemeleri

- 10xPCR buffer (Sigma, P2317)
- dNTP (Vivantis, NP2410)
- MgCl₂ (Thermo, R0971)
- Taq DNA polymerase (Thermo, EP0402)
- 10xTBE buffer (Thermo B52)
- DNA ladder
100 bp plus, vivantis NL0403;
1KB, Thermo SM0311.
- Gel Loading Dye 6X (Thermo R0611)
- Agarose (Biomax)
- Ethidium bromide, 20 ml (Gerbü), 50 ml agaroz için 3 µl kullanıldı)

Thermal cyclers

Touchgene Gradient, Techne, İngiltere

Jel Elektroforez tankı ve güç kaynağı

Thermo EC 330, ABD

Jel dokümantasyon sistemi

Vilber Lourmat, Fransa

Genomik DNA izolasyonu

Çalışmada mPCR, ERIC-PCR, MLST ve Antibiyotik direnç genlerinin genetik analizlerinin yapılması amacıyla, proje önerisinde belirtildiği gibi 1080 *C.jejuni* izolatının DNA ekstraksiyonu yapıldı. DNA ekstraksiyonu ticari kit aracılığıyla gerçekleştirildi. Bu amaçla her bir *C.jejuni* izolatı %7 koyun kanı ilave edilmiş Blood agar base No.2'ye ekildi ve ekim yapılan petriler mikroaerobik (2.5 L jar, Anaerocult C, Merck) ortamda 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda saf kültürden, ticari kit aracılığıyla DNA ekstraksiyonu yapıldı. Ekstraksiyonda üretici firmanın direktifleri uygulandı ve elde edilen DNA miktarı spektrofotometrik olarak ve elektroforezde ölçüldü. Her bir örnekte 20 ng olarak Hazırlanan DNA kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Plazmid DNA izolasyonu

Çalışmada, test edilen antibiyotiklere fenotipik yöntem sonucunda dirençli oldukları saptanan izolatlardan ayrıca plazmid DNA ekstraksiyonu işlemi gerçekleştirildi. Ekstraksiyon işlemi, ekstraksiyon kiti kullanılarak üretici firmanın (Genedirex MiniPrep Plazmid Ekstraksiyon kiti, 100 test Nevada, ABD) direktifleri doğrultusunda gerçekleştirildi.

Multiplex PCR ile *C. jejuni* izolatlarının moleküler analizi

Fenotipik testlerle *Campylobacter jejuni* olarak tanımlanan 1080 izolatın moleküler olarak doğrulanması için PCR tabanlı genetik analizden yararlanıldı. mPCR, Wang ve ark. (2002)'nın bildirdikleri yöntemle göre yapıldı. Reaksiyon karışımı her bir örnek için; 2.5 µl DNA örneği, 2.5 µl 10x PCR buffer, 20 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP karışımı, 0.5 µM *C.jejuni* ve *C.lari*; 1 µM *C.coli*, 2 µM *C.upsaliensis*, 0.2 µM *C. fetus* ve 0.2 µM *Campylobacter* 23S rRNA primerleri ve 1.25 U Taq polimeraz içerecek şekilde final konsantrasyonu steril distile su ile 25 µl'ye ayarlanarak hazırlandı.

PCR Buffer (10x)	2.5 µl
MgCl ₂ (25mM)	20 mM
dNTP (10mM)	0.2 mM
Primer F(<i>C.jejuni</i>)	0.5 µM
Primer R (<i>C.jejuni</i>)	0.5 µM
Primer F(<i>C.lari</i>)	0.5 µM
Primer R (<i>C.lari</i>)	0.5 µM
Primer F(<i>C.coli</i>)	1 µM
Primer R (<i>C.coli</i>)	1 µM
Primer F(<i>C.upsaliensis</i>)	2 µM
Primer R (<i>C.upsaliensis</i>)	2 µM
Primer F(<i>C.fetus</i>)	0.2 µM
Primer R (<i>C.fetus</i>)	0.2 µM
Primer F(23S rRNA)	0.2 µM
Primer R (23S rRNA)	0.2 µM
DNA	2.5 µl
Taq polimeraz	1.25 U
Deiyonize distile su	14.65 µl
Toplam	25 µl

95°C	6 dakika	30 siklus
95°C	30 saniye	
59°C	30 saniye	
72°C	30 saniye	
72°C	7 dakika	
4°C	∞	

Elektroforez ve amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesi

Amplifikasyon sonucunda elde edilen PCR ürünleri etidium bromide ilave edilmiş (3 µl/50 ml) %1.5'lik agaroz jelde 90 V gerilimde 500 amperde 70 dakika elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra, jel dokümantasyon sistemi kullanılarak görüntülendi. Bu test sonunda elde edilen bant büyüklüklerine göre tür tanımı yapıldı.

MLST'de kullanılacak *C. jejuni* izolatlarının seçilmesi

Her kaynaktan farklı özellikteki *C. jejuni* suşlarının seçilmesi amacıyla ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus- Polymerase Chain Reaction)'den yararlanıldı ve 1080 izolatın tümü ERIC-PCR ile genotiplendirildi. Bu amaçla Aydın ve ark. (2007b)'nın bildirdikleri yöntem kullanıldı. Toplam 50 µl hacimde hazırlanan PCR karışımı, 5 µl 10xPCR buffer (Fermentas, Litvanya), 5U Taq polimeraz (Fermentas, Litvanya), 0.2 mM dNTP (Fermentas, Litvanya), 4mM MgCl₂ (Fermentas, Litvanya), 25 pmol 1R ve 2 primerleri 1 µl hedef DNA'yı içermektedir. DNA amplifikasyonu, 94°C'de 5 dk ön denatürasyon, 94°C'de 1 dakika, 25°C'de 1 dakika, 72°C'de 2 dakika olmak üzere 40 siklusa gerçekleştirildi.

PCR Buffer (10x)	5 µl	94°C	5 dakika	} 40 siklus
MgCl ₂ (25mM)	4 mM	94°C	1 dakika	
dNTP (10mM)	0.2 mM	25°C	1 dakika	
Primer 1R	25 pmol	72°C	2 dakika	
Primer 2	25 pmol	4°C	∞	
DNA	1 µl			
Taq polimeraz	5U			
Deiyonize distile su	32.5 µl			
Toplam	50 µl			

Elektroforez ve amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesi

Amplifiye PCR ürünleri etidium bromide ilave edilmiş (3µl/50ml) %2 agaroz jelde 100 volt, 500 amperde 1 saat elektroforez işlemine tabi tutuldu. Testin gerçekleştirilmesinde 100 bp'lik moleküler ağırlık (Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus) kullanıldı.

Multi Locus Sequence Typing (MLST)

MLST'nin birinci aşaması olan aspA, glnA, gltA, glyA, pgm, tkt ve uncA gen lokuslarının amplifikasyonu, daha önce bildirilen yöntemlerin (Dingle ve ark. (2001), <http://pubmlst.org/campylobacter/info/primers.shtml>) her bir gen lokusu için ayrı ayrı modifiye edilmesiyle gerçekleştirildi

GLN LOKUSU

PCR kokteyli 50 µl hacimde hazırlandı ve 5 µl template DNA kullanıldı. PCR miks içeriği ve PCR şartları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

PCR Buffer	5 µl	94°C	3 dakika	} 30 siklus
MgCl ₂	3 µl	94°C	1 dakika	
dNTP	1 µl	52°C	30 saniye	
Primer F	2 µl	72°C	30 saniye	
Primer R	2 µl	72°C	7 dakika	
DNA	5 µl	4°C	∞	
Taq polimeraz	0.5 µl			
Deiyonize distile su	31.5 µl			
Toplam	50 µl			

TKT LOKUSU

PCR kokteyli 50 µl hacimde hazırlandı ve 5 µl template DNA kullanıldı. PCR miks içeriği ve PCR şartları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

PCR Buffer	5 µl	95°C	3 dakika	} 30 siklus
MgCl ₂	3 µl	94°C	30 saniye	
dNTP	1 µl	52°C	30 saniye	
Primer F	2 µl	72°C	30 saniye	
Primer R	2 µl	72°C	10 dakika	
DNA	5 µl	4°C	∞	
Taq polimeraz	0.5 µl			
Deiyonize distile su	31.5 µl			
Toplam	50 µl			

UNC LOKUSU

PCR kokteyli 50 µl hacimde hazırlandı ve 5 µl template DNA kullanıldı. PCR miks içeriği ve PCR şartları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

PCR Buffer	5 µl
MgCl ₂	3 µl
dNTP	1 µl
Primer F	2 µl
Primer R	2 µl
DNA	5 µl
Taq polimeraz	0.5 µl
Deiyonize distile su	31.5 µl
Toplam	50 µl

95°C	3 dakika	} 30 siklus
94°C	30 saniye	
52°C	30 saniye	
72°C	30 saniye	
72°C	10 dakika	
4°C	∞	

ASP LOKUSU

PCR kokteyli 50 µl hacimde hazırlandı ve 5 µl template DNA kullanıldı. PCR miks içeriği ve PCR şartları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

PCR Buffer	5 µl
MgCl ₂	3 µl
dNTP	1 µl
Primer F	2 µl
Primer R	2 µl
DNA	5 µl
Taq polimeraz	0.5 µl
Deiyonize distile su	31.5 µl
Toplam	50 µl

95°C	3 dakika	} 30 siklus
94°C	30 saniye	
50°C	30 saniye	
72°C	30 saniye	
72°C	10 dakika	
4°C	∞	

PGM LOKUSU

PCR kokteyli 50 µl hacimde hazırlandı ve 5 µl template DNA kullanıldı. PCR miks içeriği ve PCR şartları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

PCR Buffer	5 µl
MgCl ₂	3 µl
dNTP	1 µl
Primer F	2 µl
Primer R	2 µl
DNA	5 µl
Taq polimeraz	0.5 µl
Deiyonize distile su	31.5 µl
Toplam	50 µl

95°C	3 dakika	30 siklus
94°C	30 saniye	
50°C	30 saniye	
72°C	30 saniye	
72°C	10 dakika	
4°C	∞	

GLT LOKUSU

PCR kokteyli 50 µl hacimde hazırlandı ve 5 µl template DNA kullanıldı. PCR miks içeriği ve PCR şartları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

PCR Buffer	5 µl
MgCl ₂	3 µl
dNTP	1 µl
Primer F	2 µl
Primer R	2 µl
DNA	5 µl
Taq polimeraz	0.5 µl
Deiyonize distile su	31.5 µl
Toplam	50 µl

95°C	3 dakika	35 siklus
94°C	1 dakika	
50°C	1 dakika	
72°C	1 dakika	
72°C	10 dakika	
4°C	∞	

GLY LOKUSU

PCR kokteyli 50 µl hacimde hazırlandı ve 5 µl template DNA kullanıldı. PCR miks içeriği ve PCR şartları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

PCR Buffer	5 µl	95°C	3 dakika	} 30 siklus
MgCl ₂	3 µl	94°C	30 saniye	
dNTP	1 µl	55°C	30 saniye	
Primer F	2 µl	72°C	30 saniye	
Primer R	2 µl	72°C	10 dakika	
DNA	5 µl	4°C	∞	
Taq polimeraz	0.5 µl			
Deiyonize distile su	31.5 µl			
Toplam	50 µl			

Elektroforez ve Amplifikasyon Ürünlerinin Görüntülenmesi

Amplifikasyon sonucunda elde edilen PCR ürünleri etidium bromide ilave edilmiş (3µl/50ml) %1'lik agaroz jelde 90 volt gerilimde 375 amperde 35 dakika elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra, jel dokümantasyon sistemi kullanılarak görüntülendi. Bu test sonunda elde edilen bant büyüklükleri, beklenen bant büyüklükleri ile karşılaştırılarak tanımlanmışlardır.

Sekans Analizi

Her bir izolat için 7 adet gen bölgesi (aspA, glnA, gltA, glyA, pgm, tkt ve uncA) olmak üzere toplam toplam 1246 adet ampikonun sekans analizi yapıldı. Sekans için kullanılan primerlerin listesi Tablo.3'de verilmiştir. Sekans analizi REFGEN (*Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti., Ankara Üniversitesi Teknoloji Geliştirme Bölgesi Bahçelievler Mah. 319. Sok. E Blok Zemin Kat No: Z14. Gölbaşı/ANKARA*) firmasında hizmet alımı şeklinde yaptırıldı. Bu amaçla, ampikonlar ilgili firmaya, transport paketlerinde soğuk zincirde gönderildi ve dizi analiz sonuçları online olarak elde edildi. Sekans analizi proje önerisinde belirtildiği üzere tek yön yaptırıldı. Ancak sonucu şüpheli (kalitesi iyi olmayan) olan analizlerde, ilgili ampikon hem forward ve hem de revers primerler kullanılarak tekrar skanslanılmışlardır.

Allel Sayılarının Belirlenmesi

Refgen (İstanbul, Türkiye) firmasından internet ortamında elde edilen sekans analiz sonuçları kampilobakterlerin MLST ile ilgili aşağıda belirtilen veri tabanına girilerek sekansı yapılan her gen için allel sayısı saptandı.

http://pubmlst.org/perl/bigsdb/bigsdb.pl?db=pubmlst_campylobacter_seqdef&page=sequenceQuery

***C.jejuni* İzolatlarının ST (sequence type) ve CC (clonal complex)'lerinin Saptanması**

Her gen bölgesinin allel sayısı belirlendikten sonra, her izolata ait 7 gen bölgesinin allel sayıları, *C.jejuni* MLST ile ilgili aşağıda belirtilen veri tabanına girilerek *C.jejuni* izolatlarının ST (sequence type) ve CC (clonal complex)'leri Saptandı.

http://pubmlst.org/perl/bigsdb/bigsdb.pl?db=pubmlst_campylobacter_seqdef&page=profiles&scheme_id=1

Antibiyotik duyarlılık testi

Bu amaçla E test yöntemi kullanıldı. İnsan izolatları için nalidiksik asit ve siprofloksasin tavuk, sığır ve köpek izolatları için de nalidiksik asit ve enrofloksasin antibiyotiklerine ait striplerden yararlanıldı. Her bir *C.jejuni* izolatu, %7 koyun kanı ilave edilmiş Blood agar base No.2'ye ekildi ve ekim yapılan petriler mikroaerobik (Anaerocult C, 2.5 lt jar) ortamda 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda üreyen koloniler besiyeri üzerinden toplanarak steril fizyolojik tuzlu su içinde süspanse edildi ve bakteri yoğunluğu McFarland No.0.5 turbidite standardına ayarlandıktan sonra 1/10 oranında sulandırıldı. Bu sulandırmadan 100 µl %7 koyun kanı ilave edilmiş Blood agar base No.2'ye aktarıldı ve kuruduktan sonra test edilecek antibiyotiğe ait strip agar üzerine yerleştirildi ve petriler mikroaerobik (Anaerocult C, 2.5 lt jar) ortamda 24-48 saat inkübe edildi. Sonuçlar CLSI (CLSI 2008, CLSI 2010b) direktifleri doğrultusunda değerlendirildi.

Florokinolon direncinin genetik analizi

Kromozomal orijinli florokinolon direncinin analizi

Bu amaçla MAMA-PCR (Mismatch Amplification Mutation Assay, Polymerase Chain Reaction)'dan yararlanıldı. E test ile dirençli oldukları saptanan *C. jejuni* izolatlarında florokinolon dirençliliği ile ilişkili *gyrA* geni (QRDR, quinolone resistance determining region) mutasyonlarının tespiti için MAMA-PCR (Mismatch Amplification Mutation Assay, Polymerase Chain Reaction) kullanıldı (Zirnstein ve ark. 1999, Diker 2008). Reaksiyon 100 µl volumde 1x PCR master miksi içinde, 2 µl DNA örneği ve 1'er µl (20 pmol'lük) Forward (CampyMAMAgryA1) ve Reverse (CampyMAMAgryA5) primerlerin ilavesi ile

gerçekleştirildi. Yine çalışmanın bu bölümünde Tablo 7’de belirtilen primerler kullanılarak QRDR gen bölgesinin varlığı (GZgyrA5, GZgyrA6, 673 bp büyüklüğünde bantlar beklenmektedir) ve mutasyonun gösterilmesi amacıyla bu gen bölgesinin sekansı (GZgyrA7, GZgyrA8) yapıldı.

PCR için reaksiyon koşulları; 94°C’de 3 dakika denatürasyonu takiben 94°C’de, 30 saniye, 50°C’de 30 saniye ve 72°C’de 20 saniyelik 30 siklustan oluştu.

PCR master mix 1x	30 µl	94°C	3 dakika	} 30 siklus
Primer F	1 µl	94°C	30 saniye	
Primer R	1 µl	50°C	30 saniye	
DNA	2 µl	72°C	20 saniye	
Taq polimeraz	1 µl	4°C	∞	
Deiyonize distile su	65 µl			
Toplam	100 µl			

Elektroforez ve amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesi

Amplifikasyon sonucunda elde edilen PCR ürünleri etidium bromide ilave edilmiş (3µl/50ml) %1.5’lik agaroz jelde 120 volt gerilimde 500 amperde 60 dakika elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra, jel dokümantasyon sistemi kullanılarak görüntülendi. Bu test sonunda elde edilen bant büyüklükleri, beklenen bant büyüklükleri ile karşılaştırılarak tanımlanmışlardır.

C.jejuni gyrA geni 368 bp ve *C.jejuni* gyrA mutasyonu 265 bp büyüklüğünde bantlar ile tanımlanmaktadır. QRDR (quinolone resistance determining region) bölgesi 673 bp büyüklüğündeki bantlar ile değerlendirilmiştir.

Plazmid ilişkili florokinolon direncinin analizi

C. jejuni suşlarında plazmid ile taşınan kinolon direnç geni qnr PCR ile araştırıldı (Jacoby ve ark. 2003, Diker 2008). Reaksiyon için PCR koşulları, 94°C 1 dak, 57°C 30 saniye ve 72°C 1 dakikalık 30 siklusla sağlandı.

PCR Buffer	5 µl
MgCl ₂	4 µl
dNTP	1 µl
Primer F	2 µl
Primer R	2 µl
DNA	2 µl
Taq polimeraz	0.5 µl
Distile su	33.5 µl
Toplam	50 µl

		30 siklus
94°C	1 dakika	
57°C	30 saniye	
72°C	1 dakika	
4°C	∞	

Elektroforez ve amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesi

Amplifikasyon sonucunda elde edilen PCR ürünleri etidium bromide ilave edilmiş (3µl/50ml) %1.5'lik agaroz jelde 120 volt gerilimde 500 amperde 60 dakika elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra, jel dokümantasyon sistemi kullanılarak görüntülendi. Bu test sonunda elde edilen bant büyüklükleri, beklenen bant büyüklükleri ile karşılaştırılarak tanımlanmışlardır. Elektroforez sonrasında gözlenen 543 bp büyüklüğündeki bant bu genle ilişkili olarak pozitif sonuç kabul edilmektedir.

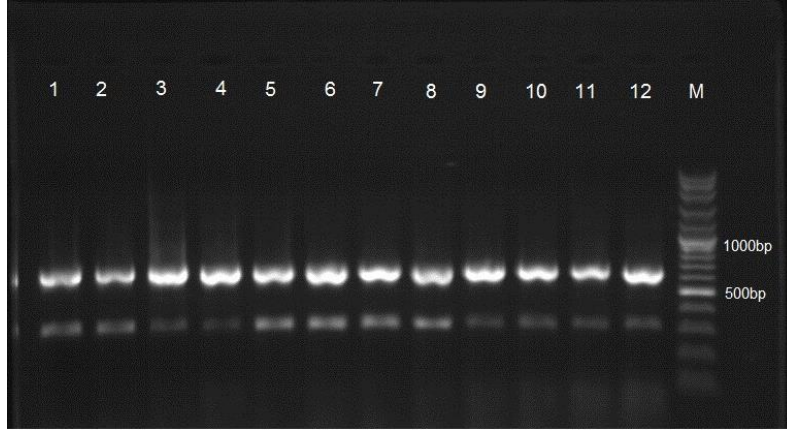
Dendrogram

MLST sonucunda elde edilen sığır, tavuk, köpek ve insan orijinli *C.jejuni* izolatlarının ST'lerinin arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla dendrogram yapıldı. Dendrogram amacıyla MLST Analysis Software'de yer alan START2 (Sequence Type Analysis and Recombinational Tests) programından yararlanıldı (<http://pubmlst.org/software/analysis/>).

4. BULGULAR

Multiplex PCR ile *C. jejuni* izolatlarının moleküler analizi

Multiplex PCR moleküler analize tabi tutulan 1080 *C.jejuni* izolatının tümü *C.jejuni* için spesifik olan 650bp (genus spesifik) ve 323bp (tür sepesifik) büyüklüğünde bantlar meydana getirdi (Resim 1).



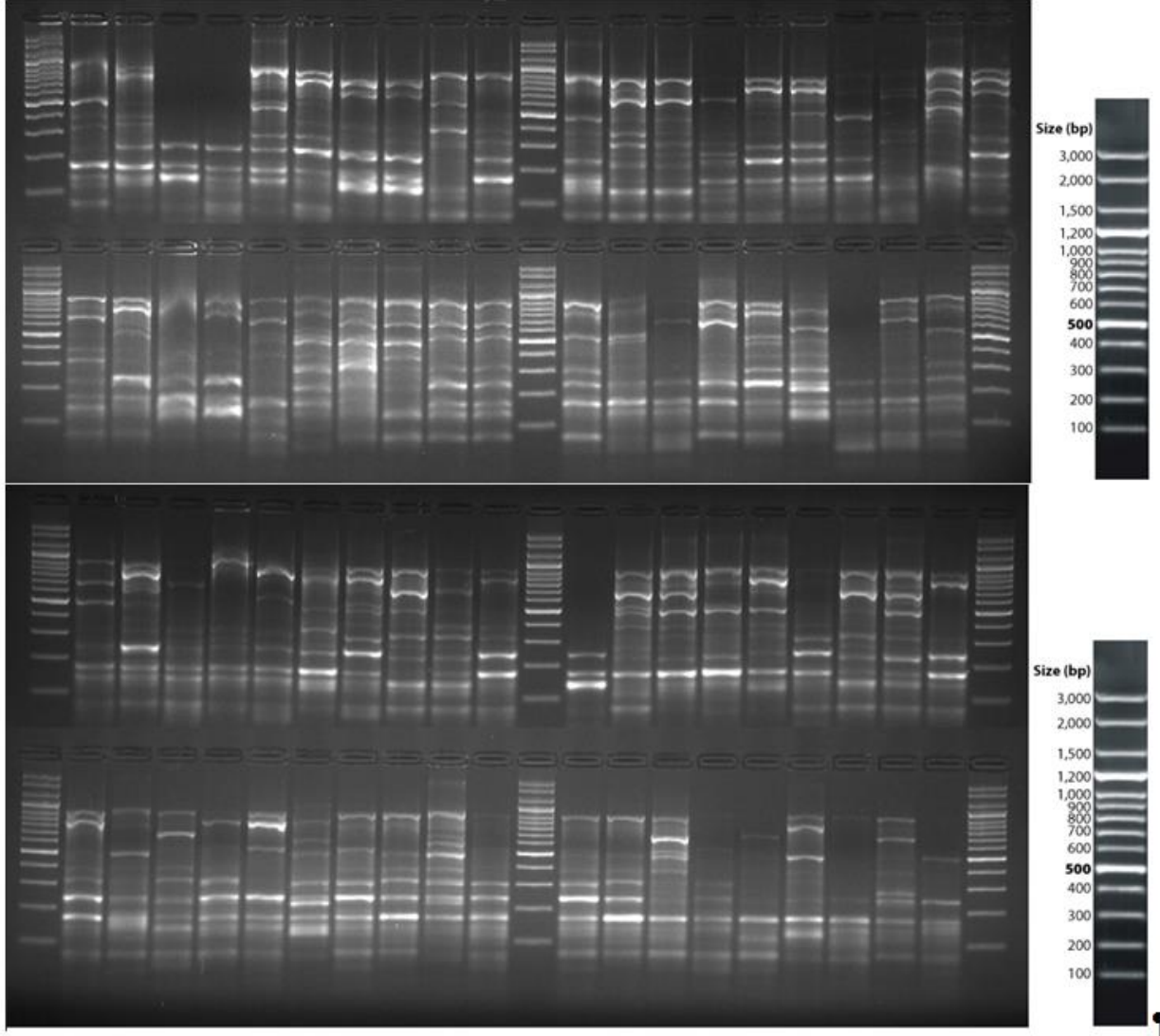
Resim 1. mPCR sonuçlarının agaroz jel görüntüsü. **1 2 3:** insan orijinli *C.jejuni* izolatları, **4 5 6:** tavuk orijinli *C.jejuni* izolatları, **7 8 9:** sığır orijinli *C.jejuni* izolatları, **10 11 12:** köpek orijinli *C.jejuni* izolatları (323 bp), M: marker (Gene Ruler TM 100 bp DNA Ladder plus)

ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus- Polymerase Chain Reaction) sonuçları

İnsan orijinli 77, köpek orijinli 360, sığır orijinli 243 ve tavuk orijinli 400 olmak üzere toplam 1080 *C.jejuni* izolatının ERIC-PCR sonuçları gözle değerlendirilmiştir. Bunun sonucunda farklı bant paternlerine sahip 34 köpek, 35 sığır ve 32 tavuk izolatı seçilmiştir. Yetmiş yedi İnsan izolatının tamamı çalışmaya dahil edilmiştir. Böylece insan izolatları da dahil olmak üzere üzere toplam 178 *C.jejuni* izolatı MLST ve antibiyotik duyarlılık testi için kullanılmıştır. Farklı bant paternlerine göre seçilmiş olan köpek, sığır ve tavuk orijinli izolatlar ile insan izolatlarının tamamına ait ERIC-PCR agaroz jel görüntüleri aşağıda verilmiştir.

İnsan orijinli *C.jejuni* izolatlarının ERIC-PCR sonuçları

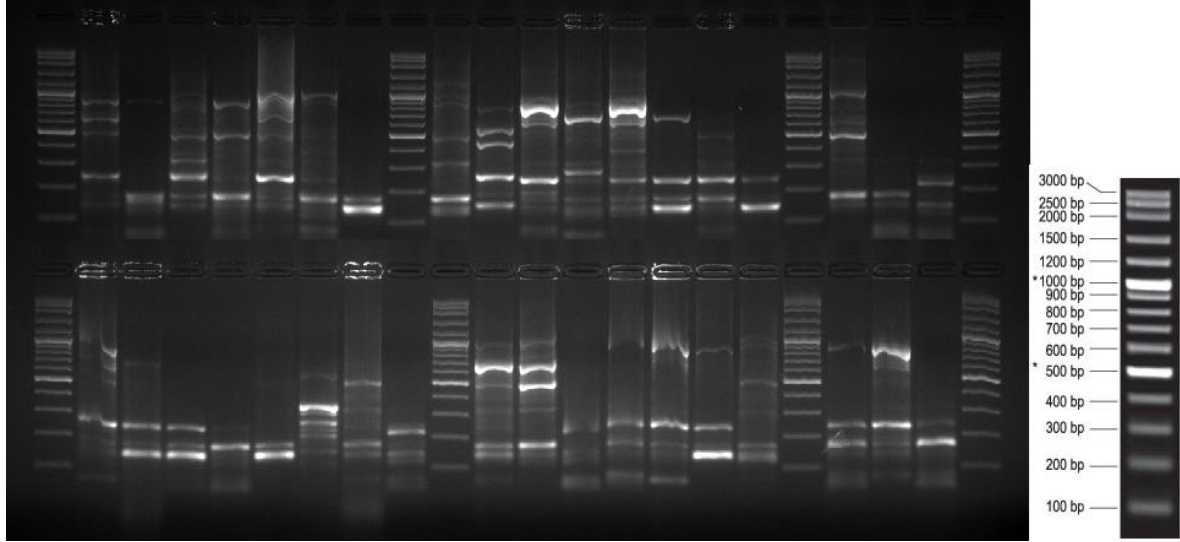
İnsan orijinli 77 *C.jejuni* izolatının ERIC-PCR ile genotiplendirilmesi sonucunda elde edilen jel elektroforez görüntüsü aşağıda verilmiştir. Buna göre 77 izolatın her birinin farklı bant profiline sahip oldukları saptanmış olup 77 farklı genotipe ayrılmışlardır.



Resim 2. İnsan orijinli *C.jejuni* izolatlarının (77 adet) ERIC-PCR profilleri. Marker (100 bp plus ladder, Bioscience USA)

Köpek orijinli *C.jejuni* izolatlarının ERIC-PCR sonuçları

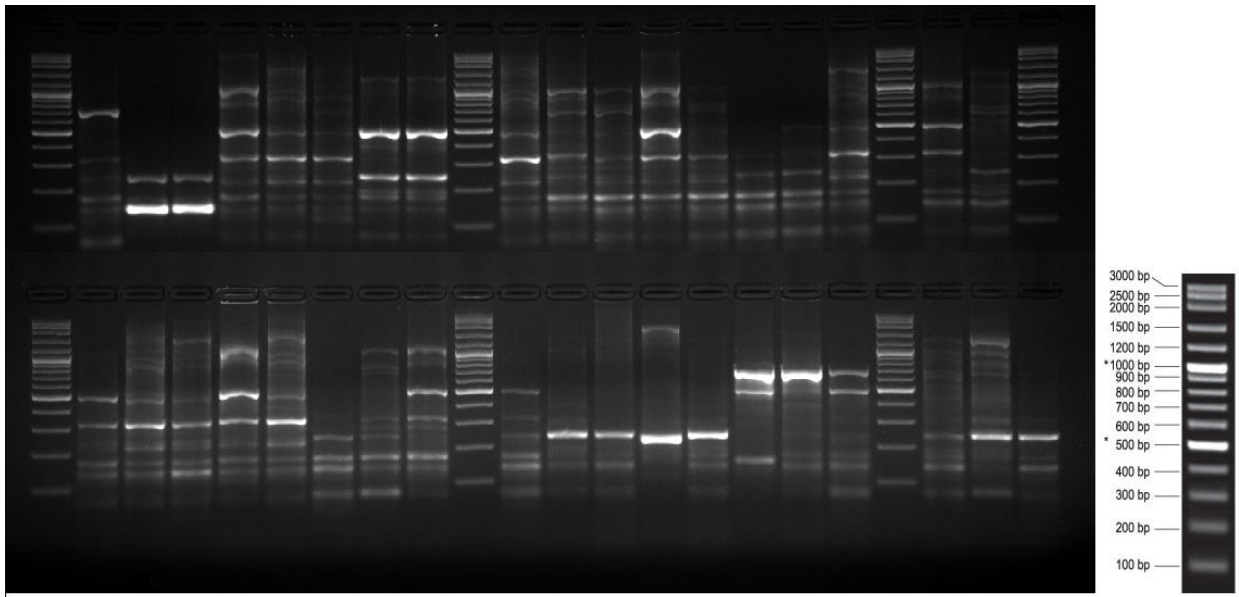
Köpek orijinli 360 *C.jejuni* izolatının ERIC-PCR ile genotiplendirilmesi sonucunda elde edilen farklı bant profiline sahip 34 adet izolatın jel elektroforez görüntüsü aşağıda verilmiştir.



Resim 3. Köpek orijinli *C.jejuni* izolatlarının (36 adet; 2 izolat çalışma dışı bırakılmıştır) ERIC-PCR profilleri. Marker (100 bp plus DNA ladder, Vivantis, Malaysia)

Sığır orijinli *C.jejuni* izolatlarının ERIC-PCR sonuçları

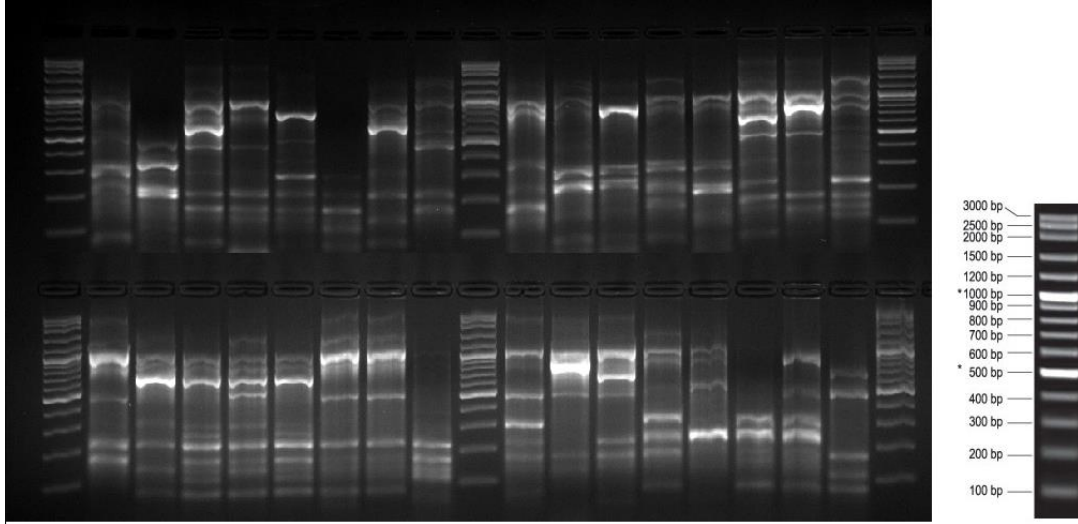
Sığır orijinli 243 *C.jejuni* izolatının ERIC-PCR ile genotiplendirilmesi sonucunda elde edilen farklı bant profiline sahip 35 adet izolatın jel elektroforez görüntüsü aşağıda verilmiştir.



Resim 4. Sığır orijinli *C.jejuni* izolatlarının (37 adet, 2 izolat çalışma dışı bırakılmıştır) ERIC-PCR profilleri. Marker (100 bp plus DNA ladder, Vivantis, Malaysia)

Tavuk orijinli *C.jejuni* izolatlarının ERIC-PCR sonuçları

Tavuk orijinli 400 *C.jejuni* izolatının ERIC-PCR ile genotiplendirilmesi sonucunda elde edilen farklı bant profiline sahip 32 adet izolatın jel elektroforez görüntüsü aşağıda verilmiştir.

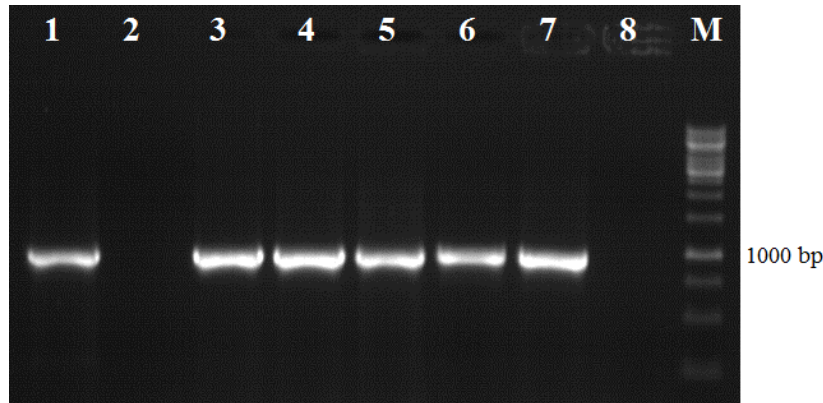


Resim 5. Tavuk orijinli *C.jejuni* izolatlarının (1-32) ERIC-PCR profilleri. Marker (100 bp plus DNA ladder, Vivantis, Malaysia)

Multi Locus Sequence Typing (MLST)

aspA gen lokusu

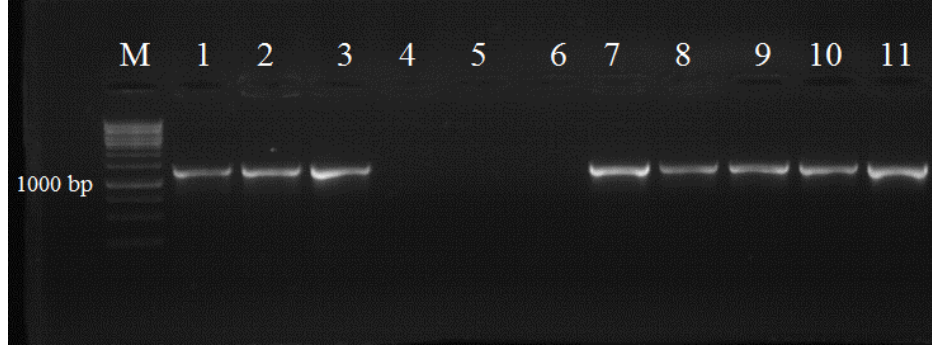
Test edilen 178 izolatın tümünde bu gen amplifiye edilmiştir. Amplifikasyon sonucunda beklendiği gibi elde edilen 899 bp büyüklüğündeki bantlar pozitif olarak kabul edilmiştir (Resim 6).



Resim 6. *aspA* genine ait amplifiye ürünlerin agaroz jel görüntüsü. 1 3: insan orijinli *C.jejuni* izolatı, 2 8: Negatif kontrol, 4: tavuk orijinli *C.jejuni* izolatı, 5: sığır orijinli *C.jejuni* izolatı, 6: köpek orijinli *C.jejuni* izolatı, 7: standart suş, M: marker (1KB, Thermo SM0311)

***glnA* gen lokusu**

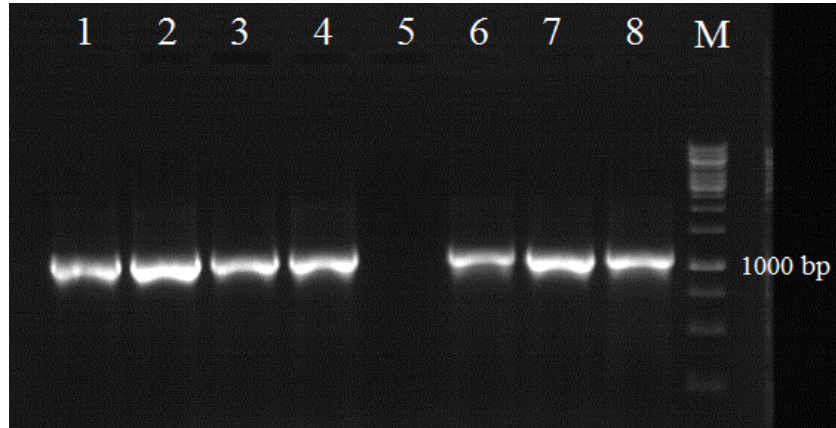
Test edilen 178 izolatin tümünde bu gen amplifiye edilmiştir. Amplifikasyon sonucunda beklendiği gibi elde edilen 1262 bp büyüklüğündeki bantlar pozitif olarak kabul edilmiştir (Resim 7).



Resim 7. *glnA* genine ait amplifiye ürünlerin agaroz jel görüntüsü. 1 2 3 7: insan orijinli *C.jejuni* izolatu, 4 5 6: negatif kontrol, 8: tavuk orijinli *C.jejuni* izolatu, 9: sığır orijinli *C.jejuni* izolatu, 10: köpek orijinli *C.jejuni* izolatu, 11: standart suş, M: marker (1KB, Thermo SM0311)

***gltA* gen lokusu**

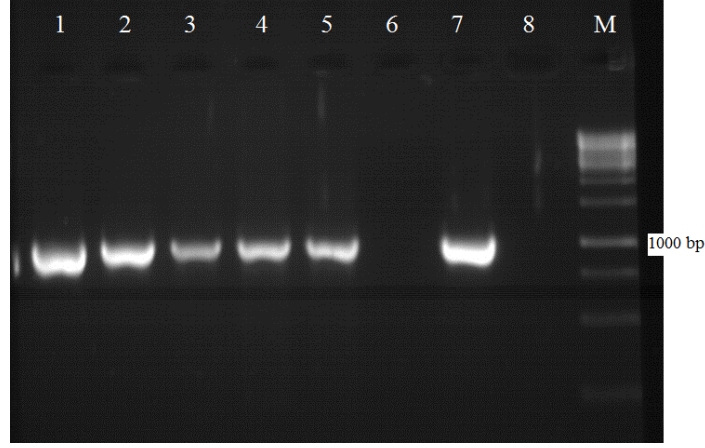
Test edilen 178 izolatin tümünde bu gen amplifiye edilmiştir. Amplifikasyon sonucunda beklendiği gibi 1012 bp büyüklüğündeki bantlar pozitif olarak kabul edilmiştir (Resim 8).



Resim 8. *gltA* genine ait amplifiye ürünlerin agaroz jel görüntüsü. 1 2 3: insan orijinli *C.jejuni* izolatu, 4: standart suş, 5: negatif kontrol, 6: tavuk orijinli *C.jejuni* izolatu, 7: sığır orijinli *C.jejuni* izolatu, 8: köpek orijinli *C.jejuni* izolatu, M: marker (1KB, Thermo SM0311)

glyA gen lokusu

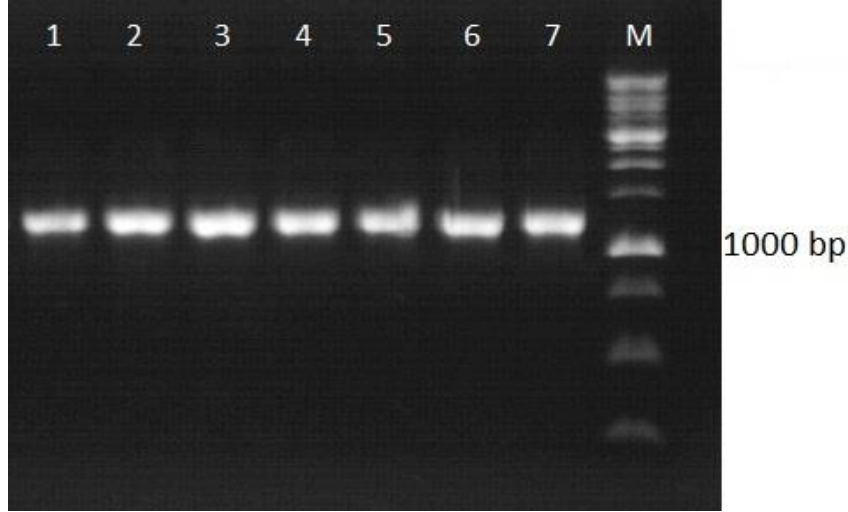
Test edilen 178 izolatın tümünde bu gen amplifiye edilmiştir. Amplifikasyon sonucunda, beklendiği gibi 816 bp büyüklüğündeki bantlar pozitif olarak kabul edilmiştir (Resim 9).



Resim 9. *glyA* genine ait amplifiye ürünlerin agaroz jel görüntüsü. **1 2:** insan orijinli *C.jejuni* izolatı, **3:** tavuk orijinli *C.jejuni* izolatı, **4:** sığır orijinli *C.jejuni* izolatı, **5:** köpek orijinli *C.jejuni* izolatı, **6 8:** negatif kontrol **7:** standart suş, **M:** marker (1KB, Thermo SM0311)

pgm gen lokusu

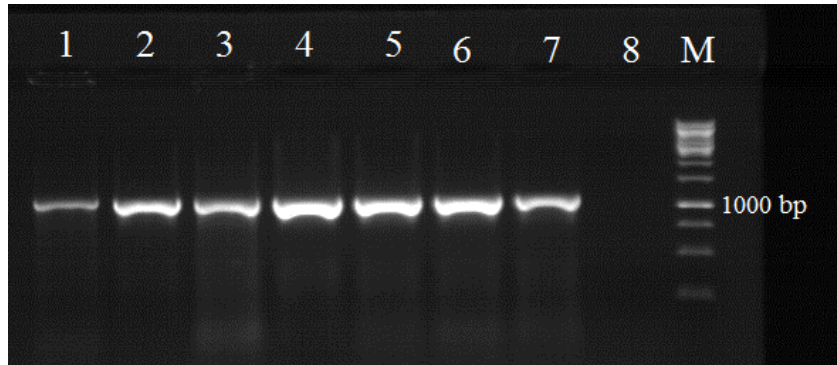
A7 ve A8 primerleri kullanılarak test edilen 178 izolatın 100 tanesinde bu gen amplifiye edilmiş, 78 tanesinde ise çoğaltma işlemi başarısız olmuştur. Ancak daha sonra bu gene özgü A1 ve A2 primerleri kullanılarak yapılan PCR’de 78 izolatın pgm geni amplifiye edilmiştir. Her iki primer ile de gerçekleştirilen PCR’de, beklendiği gibi elde edilen 1150 bp büyüklüğündeki bantlar pozitif olarak kabul edilmiştir (Resim 10).



Resim 10. *pgm* genine ait amplifiye ürünlerin agaroz jel görüntüsü. **1 2:** insan orijinli *C.jejuni* izolatu, **3 4:** tavuk orijinli *C.jejuni* izolatu, **5:** sığır orijinli *C.jejuni* izolatu, **6:** köpek orijinli *C.jejuni* izolatu, **7:** standart suş, **M:** marker (1KB, Thermo SM0311)

***tkt* gen lokusu**

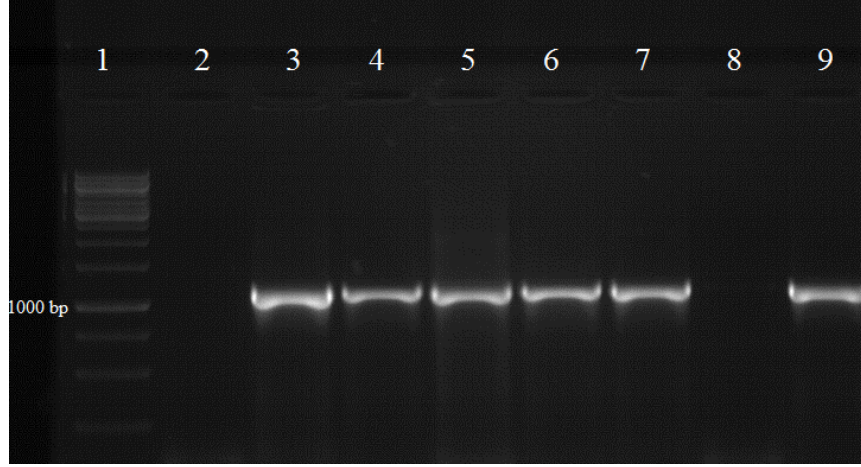
Test edilen 178 izolatuın tümünde bu gen amplifiye edilmiştir. Amplifikasyon sonucunda, beklendiğı gibi 1102 bp büyüklüğündeki bantlar pozitif olarak kabul edilmiştir (Resim 11).



Resim 11. *tkt* genine ait amplifiye ürünlerin agaroz jel görüntüsü. **1 2 3:** insan orijinli *C.jejuni* izolatu, **4:** tavuk orijinli *C.jejuni* izolatu, **5:** sığır orijinli *C.jejuni* izolatu, **6:** köpek orijinli *C.jejuni* izolatu, **7:** standart suş, **8:** negatif kontrol **M:** marker (Gene Ruler TM 100 bp DNA Ladder plus, vivantis NL0403)

uncA gen lokusu

Test edilen 178 izolatın tümünde bu gen amplifiye edilmiştir. Amplifikasyon sonucunda beklendiği gibi 1120 bp büyüklüğündeki bantlar pozitif olarak kabul edilmiştir (Resim 12).



Resim 12. *uncA* genine ait amplifiye ürünlerin agaroz jel görüntüsü. **1:** marker (1KB, Thermo SM0311), **3 4:** insan orijinli *C.jejuni* izolatı, **5:** tavuk orijinli *C.jejuni* izolatı, **6:** sığır orijinli *C.jejuni* izolatı, **7:** köpek orijinli *C.jejuni* izolatı, **2 8:** negatif kontrol, **9:** standart suş.

C.jejuni izolatlarının allel sayıları ve sekans tipleri

PubMLST veritabanında yer alan *C.jejuni* ile ilgili sayfadan elde edilen her izolata ait allel sayıları ve izolatların sekans tipleri (ST) aşağıda detaylı olarak verilmiştir.

İnsan orijinli *C.jejuni* izolatları

Test edilen toplam 77 insan orijinli *C.jejuni* izolatının tümü MLST ile tiplendirildi. Tüm izolatların allel sayıları ve elde edilen sekans tipleri aşağıdaki tabloda verilmiştir. Toplam olarak 43 sekans tipi elde edilmiş olup 22 farklı sekans tipinde (unique) 22 izolat yer alırken, sayıları 2 ile 6 arasında değişen toplam 55 izolat ise 21 farklı sekans tipinde toplanmıştır. En çok izolatın yer aldığı sekans tipi, ST 824 olup toplam 6 izolat yer almıştır. *Campylobacter* MLST veritabanında bulunmayan **ST 8082** (H33) ve **ST 8083** (H86, H99) 2 yeni ST olup, bu sekans tipleri ilk defa bu araştırma ile yurdumuzda saptanmışlardır. (Tablo 2)

Tablo 2. İnsan orijinli 77 *C.jejuni* izolatının 7 gen bölgesine ait allel sayıları, clonal complex (CC)'i ve sequence type (ST)'leri

İzolat No.	aspA	glnA	gltA	glyA	pgm	tkt	uncA	Clonal complex (CC)	Sequence Type (ST)
H1	9	21	2	10	86	3	6	ST-52	2085
H3	9	2	42	4	11	9	253		3630
H4	1	2	3	4	5	9	3	ST-42	42
H5	2	1	5	3	2	1	5	ST-21	343
H8	2	4	2	146	6	3	6	ST-658	6245
H9	6	4	5	2	2	1	5	ST-206	122
H10	1	3	6	4	3	3	3	ST-22	22
H11	1	3	6	4	3	3	3	ST-22	22
H12	9	2	5	2	11	3	1	ST-607	1707
H17	9	53	2	10	11	3	3	ST-574	305
H18	8	10	2	2	11	12	1	ST-354	2438
H22	9	2	4	62	4	5	102	ST-257	6179
H24	7	17	2	15	23	3	12	ST-443	51
H26	158	30	2	2	89	120	6	ST-460	2184
H28	6	4	5	2	2	1	5	ST-206	122
H29	3	1	5	17	11	11	6	ST-49	49
H30	8	17	5	2	10	59	6	ST-353	400
H32	9	2	4	62	4	5	102	ST-257	6179
H33	7	200	2	2	58	3	6	ST-353	8082
H34	2	17	2	3	2	1	5	ST-21	883
H35	9	2	4	62	4	5	6	ST-257	257
H36	2	4	1	4	19	1	5	ST-48	918
H38	9	2	42	4	11	9	253		3630
H41	1	3	6	4	3	3	3	ST-22	22
H43	9	2	2	2	11	5	6	ST-257	824
H45	24	71	79	62	11	67	269		4305
H47	9	2	4	62	4	133	6	ST-257	990
H49	24	17	2	10	23	3	12	ST-443	440
H51	14	17	5	2	2	3	6	ST-353	1474
H52	14	17	5	2	2	3	6	ST-353	1474
H54	2	1	5	3	2	1	5	ST-21	19
H55	7	2	5	2	10	3	6	ST-353	5
H56	9	2	2	2	11	5	6	ST-257	824
H58	158	30	2	2	89	120	6	ST-460	2184
H59	6	4	79	2	2	282	5		4766
H60	7	2	42	4	4	12	8		3572
H61	158	30	2	2	89	120	6	ST-460	2184
H62	9	2	2	2	11	5	6	ST-257	824
H63	2	1	79	73	2	1	5	ST-21	822
H65	2	1	5	3	2	1	5	ST-21	19
H66	9	2	2	2	11	5	6	ST-257	824
H69	1	2	5	4	5	9	3	ST-42	1751
H70	4	7	10	4	42	51	1	ST-45	583
H71	24	21	2	2	89	59	6	ST-460	606
H72	9	10	5	10	22	3	6	ST-52	2066
H73	62	4	5	2	2	1	5	ST-206	572

İzolat No.	aspA	glnA	gltA	glyA	pgm	tkf	uncA	Clonal complex (CC)	Sequence Type (ST)
H74	7	17	2	15	23	3	12	ST-443	51
H76	48	7	10	4	183	7	1	ST-45	3727
H80	2	4	2	4	19	3	6	ST-658	658
H82	9	2	42	4	11	9	253		3630
H83	6	4	5	2	2	282	5		4766
H84	7	17	2	15	23	3	12	ST-443	51
H85	9	2	4	62	4	5	102	ST-257	6179
H86	2	4	5	2	2	12	5	ST-206	8083
H88	1	2	3	4	5	9	3	ST-42	42
H89	9	2	2	2	11	5	6	ST-257	824
H90	7	17	79	2	10	3	6	ST-353	3811
H91	1	2	5	4	5	9	3	ST-42	1751
H92	7	2	5	2	10	3	6	ST-353	5
H94	2	1	12	3	2	1	5	ST-21	50
H95	7	17	2	15	23	3	12	ST-443	51
H97	8	2	5	53	11	3	1	ST-607	607
H98	2	32	5	2	2	12	5	ST-206	5584
H99	2	4	5	2	2	12	5	ST-206	8083
H100	8	10	2	2	11	12	6	ST-354	354
H101	9	2	4	62	4	5	102	ST-257	6179
H102	2	17	2	3	2	1	5	ST-21	883
H103	62	4	5	2	2	1	5	ST-206	572
H104	7	2	42	4	4	12	8		3572
H105	2	1	12	3	2	1	5	ST-21	50
H106	9	53	2	10	11	3	3	ST-574	305
H107	7	112	79	62	147	3	6	ST-353	2801
H108	3	1	5	17	11	11	6	ST-49	49
H109	2	1	12	3	2	1	5	ST-21	50
H110	9	53	2	10	11	3	3	ST-574	305
H111	9	2	2	2	11	5	6	ST-257	824
H113	8	10	2	2	11	12	6	ST-354	354

Ayrıca 77 insan izolatına ait profil sıklığı ve profil sayısını da içeren ve START 2 programından alınan veriler Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. İnsan orijinli *C.jejuni* izolatlarının sekans tiplerinde yer alan izolat sayıları, oranı ve allel sayıları (START2 programından alınmıştır <http://pubmlst.org/software/analysis/start2/>).

Profile frequencies

İnsan orijinli *C.jejuni* izolatları

(77 isolates)

Complete profiles: 43

ST (defs)	ST (data)	Profile							Frequency	%
		aspA	glnA	gltA	glyA	pgm	tkf	uncA		
-	824	9	2	2	2	11	5	6	6	7,79
-	51	7	17	2	15	23	3	12	4	5,19
-	6179	9	2	4	62	4	5	102	4	5,19
-	22	1	3	6	4	3	3	3	3	3,9
-	343, 19	2	1	5	3	2	1	5	3	3,9
-	50	2	1	12	3	2	1	5	3	3,9
-	3630	9	2	42	4	11	9	253	3	3,9
-	305	9	53	2	10	11	3	3	3	3,9
-	2184	158	30	2	2	89	120	6	3	3,9
-	42	1	2	3	4	5	9	3	2	2,6
-	1751	1	2	5	4	5	9	3	2	2,6
-	8083	2	4	5	2	2	12	5	2	2,6
-	883	2	17	2	3	2	1	5	2	2,6
-	49	3	1	5	17	11	11	6	2	2,6
-	122	6	4	5	2	2	1	5	2	2,6
-	5	7	2	5	2	10	3	6	2	2,6
-	3572	7	2	42	4	4	12	8	2	2,6
-	354	8	10	2	2	11	12	6	2	2,6
-	1474	14	17	5	2	2	3	6	2	2,6
-	572	62	4	5	2	2	1	5	2	2,6
-	822	2	1	79	73	2	1	5	1	1,3
-	918	2	4	1	4	19	1	5	1	1,3
-	658	2	4	2	4	19	3	6	1	1,3
-	6245	2	4	2	146	6	3	6	1	1,3
-	5584	2	32	5	2	2	12	5	1	1,3
-	583	4	7	10	4	42	51	1	1	1,3
-	4766	6	4	5	2	2	282	5	1	1,3
-	4766	6	4	79	2	2	282	5	1	1,3
-	3811	7	17	79	2	10	3	6	1	1,3
-	2801	7	112	79	62	147	3	6	1	1,3
-	8082	7	200	2	2	58	3	6	1	1,3
-	607	8	2	5	53	11	3	1	1	1,3
-	2438	8	10	2	2	11	12	1	1	1,3
-	400	8	17	5	2	10	59	6	1	1,3
-	257	9	2	4	62	4	5	6	1	1,3
-	990	9	2	4	62	4	133	6	1	1,3
-	1707	9	2	5	2	11	3	1	1	1,3
-	2066	9	10	5	10	22	3	6	1	1,3
-	2085	9	21	2	10	86	3	6	1	1,3
-	440	24	17	2	10	23	3	12	1	1,3
-	606	24	21	2	2	89	59	6	1	1,3
-	4305	24	71	79	62	11	67	269	1	1,3
-	3727	48	7	10	4	183	7	1	1	1,3

Köpek orijinli *C.jejuni* izolatları,

Test edilen toplam 34 köpek orijinli *C.jejuni* izolatının tümü MLST ile tiplendirildi. Tüm izolatların allel sayıları ve elde edilen sekans tipleri aşağıdaki tabloda verilmiştir. Toplam olarak 23 sekans tipi elde edilmiş olup 17 izolat 17 farklı sekans tipinde (unique) yer alırken, sayıları 2 ve 7 arasında değişen toplam 17 izolat 6 sekans tipinde toplanmıştır. En çok izolatın yer aldığı sekans tipi, ST 572 olup toplam 7 izolat yer almıştır.

Tablo 4. Köpek orijinli 34 *C.jejuni* izolatının 7 gen bölgesine ait allel sayıları, clonal complex (CC)'i ve sequence type (ST)'leri

İzolat No.	aspA	glnA	gltA	glyA	Pgm	tkf	uncA	Clonal complex (CC)	Sequence Type (ST)
K1	62	4	5	2	2	1	5	ST-206	572
K2	10	27	59	19	10	5	7	ST-403	1775
K3	180	194	2	213	19	231	148		2856
K4	2	4	2	4	19	3	6	ST-658	658
K5	2	1	12	3	2	1	5	ST-21	50
K6	9	17	52	10	10	3	1		881
K8	200	2	42	4	235	40	3	ST-42	1370
K9	1	2	49	4	147	66	8	ST-362	362
K11	62	4	5	2	2	1	5	ST-206	572
K12	10	27	89	19	10	132	7	ST-403	985
K13	3	1	5	17	11	11	6	ST-49	49
K14	1	94	6	4	3	3	3	ST-22	1947
K15	2	1	12	3	2	1	5	ST-21	50
K16	1	3	6	4	3	276	3	ST-22	1966
K17	62	4	5	2	2	1	5	ST-206	572
K18	1	3	6	4	3	3	3	ST-22	22
K19	62	4	5	2	2	1	5	ST-206	572
K20	2	4	2	4	19	3	6	ST-658	658
K21	1	2	42	4	235	40	3	ST-42	1370
K23	4	7	10	4	42	7	1	ST-45	137
K24	4	7	343	4	1	7	1	ST-45	7063
K25	316	17	2	15	23	3	12	ST-443	5794
K26	7	17	5	2	10	3	6	ST-353	353
K27	4	7	10	4	1	7	1	ST-45	45
K28	62	4	5	2	2	1	5	ST-206	572
K29	6	4	5	2	2	1	5	ST-206	122
K30	346	2	3	4	5	9	3	ST-42	6532
K31	1	2	42	4	2	25	8	ST-362	2123
K33	7	2	5	2	10	3	6	ST-353	5
K34	4	7	10	4	42	7	1	ST-45	137
K35	4	7	10	4	1	7	1	ST-45	45
K36	62	4	5	2	2	1	5	ST-206	572
K37	62	4	5	2	2	1	5	ST-206	572
K38	9	53	2	10	11	3	3	ST-574	305

Ayrıca köpek orijinli izolatlara ait profil sıklığı ve profil sayısını da içeren ve START 2 programından alınan veriler Tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 5. Köpek orijinli *C.jejuni* izolatlarının sekans tiplerinde yer alan izolat sayıları, oranı ve allel sayıları (START2 programından alınmıştır <http://pubmlst.org/software/analysis/start2/>).

Profile frequencies

Köpek orijinli *C.jejuni* izolatları
(34 isolates)

Complete profiles: 24

ST (defs)	ST (data)	Profile							Frequency	%
		aspA	glnA	gltA	glyA	pgm	tkf	uncA		
-	572	62	4	5	2	2	1	5	7	20,59
-	50	2	1	12	3	2	1	5	2	5,88
-	658	2	4	2	4	19	3	6	2	5,88
-	45	4	7	10	4	1	7	1	2	5,88
-	137	4	7	10	4	42	7	1	2	5,88
-	2123	1	2	42	4	2	25	8	1	2,94
-	1370	1	2	42	4	235	40	3	1	2,94
-	362	1	2	49	4	147	66	8	1	2,94
-	22	1	3	6	4	3	3	3	1	2,94
-	1966	1	3	6	4	3	276	3	1	2,94
-	1947	1	94	6	4	3	3	3	1	2,94
-	49	3	1	5	17	11	11	6	1	2,94
-	7063	4	7	343	4	1	7	1	1	2,94
-	122	6	4	5	2	2	1	5	1	2,94
-	5	7	2	5	2	10	3	6	1	2,94
-	353	7	17	5	2	10	3	6	1	2,94
-	881	9	17	52	10	10	3	1	1	2,94
-	305	9	53	2	10	11	3	3	1	2,94
-	1775	10	27	59	19	10	5	7	1	2,94
-	985	10	27	89	19	10	132	7	1	2,94
-	2856	180	194	2	213	19	231	148	1	2,94
-	1370	200	2	42	4	235	40	3	1	2,94
-	5794	316	17	2	15	23	3	12	1	2,94
-	6532	346	2	3	4	5	9	3	1	2,94

Sığır orijinli *C.jejuni* izolatları

Test edilen toplam 35 Sığır orijinli *C.jejuni* izolatının tümü MLST ile tiplendirildi. Tüm izolatların allel sayıları ve elde edilen sekans tipleri aşağıdaki tabloda verilmiştir. Toplam olarak 18 sekans tipi elde edilmiş olup 6 izolat 6 farklı sekans tipinde (unique) yer alırken, sayıları 2 ile 7 arasında değişen toplam 29 izolat 9 sekans tipinde toplanmıştır. En çok izolatın yer aldığı sekans tipi, ST 58 olup toplam 7 izolat yer almıştır.

Tablo 6. Sığır orijinli 35 *C.jejuni* izolatının 7 gen bölgesine ait allel sayıları, clonal complex (CC)'i ve sequence type (ST)'leri

İzolat No.	aspA	glnA	gltA	glyA	pgm	tkt	uncA	Clonal complex (CC)	Sequence Type (ST)
S1	10	1	59	19	10	5	7	ST-403	933
S2	1	2	3	4	457	9	379	ST-42	3997
S3	1	2	3	4	457	9	379	ST-42	3997
S4	19	24	23	20	397	16	15		3098
S5	200	4	42	2	300	16	17	ST-61	3395
S6	200	4	42	2	300	16	17	ST-61	3395
S7	2	1	1	3	140	3	5	ST-21	806
S8	2	1	1	3	140	3	5	ST-21	806
S9	1	4	2	2	300	16	17	ST-61	3395
S10	19	24	42	20	300	16	57		3364
S11	19	24	42	246	300	259	57		2217
S12	19	24	42	20	26	16	15		58
S13	19	24	42	246	300	259	57		2217
S14	19	24	42	246	300	259	57		2217
S15	19	24	23	20	26	16	15		58
S16	1	4	2	2	300	16	17	ST-61	3395
S17	1	30	42	2	300	16	15	ST-61	3445
S18	1	4	42	2	300	16	15	ST-61	3445
S19	1	4	2	2	300	16	17	ST-61	3395
S20	19	24	42	20	26	16	15		58
S21	1	4	2	2	300	16	17	ST-61	3395
S22	19	24	23	20	26	16	15		58
S23	19	24	42	246	300	259	57		2217
S24	19	24	42	20	26	16	15		58
S25	19	24	23	20	26	16	15		58
S26	2	1	1	3	2	1	5	ST-21	21
S27	2	1	12	3	2	1	5	ST-21	50
S29	2	1	1	3	2	1	5	ST-21	21
S30	8	2	5	53	11	3	1	ST-607	607
S31	7	4	2	2	19	1	6	ST-658	1900
S32	8	2	5	53	11	3	1	ST-607	607
S33	19	24	42	20	26	16	15		58
S34	2	1	5	3	2	1	5	ST-21	19
S35	2	1	79	73	2	1	5	ST-21	822
S36	2	1	5	3	2	1	5	ST-21	19

Ayrıca 35 sığır izolatına ait profil sıklığı ve profil sayısını da içeren ve START 2 programından alınan veriler Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Sığır orijinli *C.jejuni* izolatlarının sekans tiplerinde yer alan izolat sayıları, oranı ve allel sayıları (START2 programından alınmıştır <http://pubmlst.org/software/analysis/start2/>).

Profile frequencies

Sığır orijinli *C.jejuni* izolatları

(35 isolates)

Complete profiles: 18

ST (defs)	ST (data)	Profile							Frequency	%
		aspA	glnA	gltA	glyA	pgm	tkl	uncA		
-	3395	1	4	2	2	300	16	17	4	11,43
-	58	19	24	42	20	26	16	15	4	11,43
-	2217	19	24	42	246	300	259	57	4	11,43
-	58	19	24	23	20	26	16	15	3	8,57
-	3997	1	2	3	4	457	9	379	2	5,71
-	21	2	1	1	3	2	1	5	2	5,71
-	806	2	1	1	3	140	3	5	2	5,71
-	19	2	1	5	3	2	1	5	2	5,71
-	607	8	2	5	53	11	3	1	2	5,71
-	3395	200	4	42	2	300	16	17	2	5,71
-	3445	1	4	42	2	300	16	15	1	2,86
-	3445	1	30	42	2	300	16	15	1	2,86
-	50	2	1	12	3	2	1	5	1	2,86
-	822	2	1	79	73	2	1	5	1	2,86
-	1900	7	4	2	2	19	1	6	1	2,86
-	933	10	1	59	19	10	5	7	1	2,86
-	3098	19	24	23	20	397	16	15	1	2,86
-	3364	19	24	42	20	300	16	57	1	2,86

Tavuk orijinli *C.jejuni* izolatları

Test edilen toplam 32 tavuk orijinli *C.jejuni* izolatının tümü MLST ile tiplendirildi. Tüm izolatların allel sayıları ve elde edilen sekans tipleri aşağıdaki tabloda verilmiştir. Toplam olarak 21 sekans tipi elde edilmiş olup 13 izolat 13 farklı sekans tipinde (unique) yer alırken, sayıları 2 ile 3 arasında değişen toplam 19 izolat 8 sekans tipinde toplanmıştır. En çok izolatın yer aldığı sekans tipi, ST 2099 olup toplam 3 izolat yer almıştır. Bu grupta yer alan T19 nolu izolatın sekans tipi **ST 8084** (T19) olarak belirlenmiş olup daha önce *Campylobacter* MLST veritabanına yer almayan bu Sekans tipi ilk kez yurdumuzdan bildirilmiştir.

Tablo 8. Tavuk orijinli 32 *C.jejuni* izolatının 7 gen bölgesine ait allel sayıları, clonal complex (CC)'i ve sequence type (ST)'leri

İzolat No.	aspA	glnA	gltA	glyA	pgm	tkt	uncA	Clonal complex (CC)	Sequence Type (ST)
T1	2	1	79	73	2	1	5	ST-21	822
T4	7	84	12	10	150	3	215	ST-574	3015
T5	9	21	2	10	86	3	6	ST-52	2085
T7	7	200	5	2	10	3	6	ST-353	2099
T8	2	4	2	4	19	3	6	ST-658	658
T10	2	4	2	4	19	3	6	ST-658	658
T13	7	17	2	337	23	3	12	ST-443	3628
T19	7	71	5	62	501	67	6		8084
T22	9	2	42	4	11	9	253		3630
T24	2	1	12	3	2	1	5	ST-21	50
T27	2	1	1	3	2	1	5	ST-21	21
T29	9	53	5	10	11	3	3	ST-574	2895
T31	4	7	10	4	1	7	1	ST-45	45
T34	9	21	2	10	86	3	6	ST-52	2085
T37	1	2	5	4	5	9	3	ST-42	1751
T49	33	2	2	2	10	3	1	ST-464	3140
T51	7	200	5	2	10	3	6	ST-353	2099
T52	7	17	2	337	23	3	12	ST-443	3628
T54	24	30	2	2	89	59	6	ST-460	460
T55	14	17	79	2	2	3	6	ST-353	1474
T57	24	30	2	2	89	59	6	ST-460	460
T58	7	112	5	2	13	1	26		2089
T59	7	17	5	2	13	1	26	ST-353	2231
T60	33	2	2	2	10	3	1	ST-464	3140
T61	7	112	5	62	11	3	6	ST-353	2801
T62	1	2	5	4	5	9	3	ST-42	1751
T65	7	200	5	2	10	3	6	ST-353	2099
T67	9	53	5	10	11	3	3	ST-574	2895
T70	7	187	21	424	125	224	51		1673
T78	2	1	12	3	2	1	5	ST-21	50
T79	6	4	79	2	2	282	5		4766
T82	9	2	2	2	11	5	6	ST-257	824

Ayrıca 32 tavuk izolatına ait profil sıklığı ve profil sayısını da içeren ve START 2 programından alınan veriler Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9. Tavuk orijinli *C.jejuni* izolatlarının sekans tiplerinde yer alan izolat sayıları, oranı ve allel sayıları (START2 programından alınmıştır <http://pubmlst.org/software/analysis/start2/>).

Profile frequencies

Tavuk orijinli *C.jejuni* izolatları
(32 isolates)

Complete profiles: 22

ST (defs)	ST (data)	Profile							Frequency	%
		aspA	glnA	gltA	glyA	pgm	tkf	uncA		
-	2099	7	200	5	2	10	3	6	3	9,38
-	1751	1	2	5	4	5	9	3	2	6,25
-	50	2	1	12	3	2	1	5	2	6,25
-	658	2	4	2	4	19	3	6	2	6,25
-	3628	7	17	2	337	23	3	12	2	6,25
-	2085	9	21	2	10	86	3	6	2	6,25
-	2895	9	53	5	10	11	3	3	2	6,25
-	460	24	30	2	2	89	59	6	2	6,25
-	3140	33	2	2	2	10	3	1	2	6,25
-	21	2	1	1	3	2	1	5	1	3,12
-	822	2	1	79	73	2	1	5	1	3,12
-	45	4	7	10	4	1	7	1	1	3,12
-	4766	6	4	79	2	2	282	5	1	3,12
-	2231	7	17	5	2	13	1	26	1	3,12
-	8084	7	71	5	62	501	67	6	1	3,12
-	3015	7	84	12	10	150	3	215	1	3,12
-	2089	7	112	5	2	13	1	26	1	3,12
-	2801	7	112	5	62	11	3	6	1	3,12
-	1673	7	187	21	424	125	224	51	1	3,12
-	824	9	2	2	2	11	5	6	1	3,12
-	3630	9	2	42	4	11	9	253	1	3,12
-	1474	14	17	79	2	2	3	6	1	3,12

Ayrıca İnsan, köpek, sığır ve tavuk orijinli *C.jejuni* izolatlarına (toplam 178 adet) ait profil sıklığı ve profil sayısını da içeren ve START 2 programından alınan veriler Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. İnsan, köpek, sığır ve tavuk orijinli *C.jejuni* (toplam 178 adet) izolatlarının sekans tiplerinde yer alan izolat sayıları, oranı ve allel sayıları (START2 programından alınmıştır <http://pubmlst.org/software/analysis/start2/>).

Profile frequencies

İnsan, köpek, sığır ve tavuk orijinli *C.jejuni* izolatları
(178 isolates)

Complete profiles: 85

ST (defs)	ST (data)	Profile							Frequency	%
		aspA	glnA	gltA	glyA	pgm	tkf	uncA		
-	572	62	4	5	2	2	1	5	9	5,06
-	50	2	1	12	3	2	1	5	8	4,49
-	824	9	2	2	2	11	5	6	7	3,93
-	343, 19	2	1	5	3	2	1	5	5	2,81
-	658	2	4	2	4	19	3	6	5	2,81
-	1751	1	2	5	4	5	9	3	4	2,25
-	22	1	3	6	4	3	3	3	4	2,25
-	3395	1	4	2	2	300	16	17	4	2,25
-	51	7	17	2	15	23	3	12	4	2,25
-	6179	9	2	4	62	4	5	102	4	2,25
-	3630	9	2	42	4	11	9	253	4	2,25
-	305	9	53	2	10	11	3	3	4	2,25
-	58	19	24	42	20	26	16	15	4	2,25
-	2217	19	24	42	246	300	259	57	4	2,25
-	21	2	1	1	3	2	1	5	3	1,69
-	822	2	1	79	73	2	1	5	3	1,69
-	49	3	1	5	17	11	11	6	3	1,69
-	45	4	7	10	4	1	7	1	3	1,69
-	122	6	4	5	2	2	1	5	3	1,69
-	5	7	2	5	2	10	3	6	3	1,69
-	2099	7	200	5	2	10	3	6	3	1,69
-	607	8	2	5	53	11	3	1	3	1,69
-	2085	9	21	2	10	86	3	6	3	1,69
-	58	19	24	23	20	26	16	15	3	1,69
-	2184	158	30	2	2	89	120	6	3	1,69
-	42	1	2	3	4	5	9	3	2	1,12
-	3997	1	2	3	4	457	9	379	2	1,12
-	806	2	1	1	3	140	3	5	2	1,12
-	8083	2	4	5	2	2	12	5	2	1,12
-	883	2	17	2	3	2	1	5	2	1,12
-	137	4	7	10	4	42	7	1	2	1,12
-	4766	6	4	79	2	2	282	5	2	1,12
-	3572	7	2	42	4	4	12	8	2	1,12
-	3628	7	17	2	337	23	3	12	2	1,12
-	354	8	10	2	2	11	12	6	2	1,12
-	2895	9	53	5	10	11	3	3	2	1,12
-	1474	14	17	5	2	2	3	6	2	1,12
-	460	24	30	2	2	89	59	6	2	1,12
-	3140	33	2	2	2	10	3	1	2	1,12
-	3395	200	4	42	2	300	16	17	2	1,12
-	2123	1	2	42	4	2	25	8	1	0,56
-	1370	1	2	42	4	235	40	3	1	0,56

-	362	1	2	49	4	147	66	8	1	0,56
-	1966	1	3	6	4	3	276	3	1	0,56
-	3445	1	4	42	2	300	16	15	1	0,56
-	3445	1	30	42	2	300	16	15	1	0,56
-	1947	1	94	6	4	3	3	3	1	0,56
-	918	2	4	1	4	19	1	5	1	0,56
-	6245	2	4	2	146	6	3	6	1	0,56
-	5584	2	32	5	2	2	12	5	1	0,56
-	583	4	7	10	4	42	51	1	1	0,56
-	7063	4	7	343	4	1	7	1	1	0,56
-	4766	6	4	5	2	2	282	5	1	0,56
-	1900	7	4	2	2	19	1	6	1	0,56
-	353	7	17	5	2	10	3	6	1	0,56
-	2231	7	17	5	2	13	1	26	1	0,56
-	3811	7	17	79	2	10	3	6	1	0,56
-	8084	7	71	5	62	501	67	6	1	0,56
-	3015	7	84	12	10	150	3	215	1	0,56
-	2089	7	112	5	2	13	1	26	1	0,56
-	2801	7	112	5	62	11	3	6	1	0,56
-	2801	7	112	79	62	147	3	6	1	0,56
-	1673	7	187	21	424	125	224	51	1	0,56
-	8082	7	200	2	2	58	3	6	1	0,56
-	2438	8	10	2	2	11	12	1	1	0,56
-	400	8	17	5	2	10	59	6	1	0,56
-	257	9	2	4	62	4	5	6	1	0,56
-	990	9	2	4	62	4	133	6	1	0,56
-	1707	9	2	5	2	11	3	1	1	0,56
-	2066	9	10	5	10	22	3	6	1	0,56
-	881	9	17	52	10	10	3	1	1	0,56
-	933	10	1	59	19	10	5	7	1	0,56
-	1775	10	27	59	19	10	5	7	1	0,56
-	985	10	27	89	19	10	132	7	1	0,56
-	1474	14	17	79	2	2	3	6	1	0,56
-	3098	19	24	23	20	397	16	15	1	0,56
-	3364	19	24	42	20	300	16	57	1	0,56
-	440	24	17	2	10	23	3	12	1	0,56
-	606	24	21	2	2	89	59	6	1	0,56
-	4305	24	71	79	62	11	67	269	1	0,56
-	3727	48	7	10	4	183	7	1	1	0,56
-	2856	180	194	2	213	19	231	148	1	0,56
-	1370	200	2	42	4	235	40	3	1	0,56
-	5794	316	17	2	15	23	3	12	1	0,56
-	6532	346	2	3	4	5	9	3	1	0,56

Yeni sekans tipleri (ST)

Çalışmamızın MLST bölümünde 3 adet insan *C.jejuni* izolatu (H33, H86 ve H99) ile 1 adet tavuk *C.jejuni* izolatu (T19) MLST veritabanında yer almayan sekans tiplerine sahip oldukları saptanmış olup bu izolatların allel sayıları ve her bir gen bölgesinin sekans sonuçları MLST veritabanına kayıt edilmiştir. Buna göre veritabanı curatörü tarafından H33 nolu izolata **ST 8082**, H86 ve H99 nolu izolatlara **ST 8083** ve T19 nolu izolata ise **ST 8084** numaraları verilmiştir. Bu sekans numaraları araştırmamızdaki izolatlara özgü olup ilgili veritabanı sayfasının adresi aşağıda verilmiştir.

ST 8082 ile ilgili bilgilerin yer aldığı web sayfası

http://pubmlst.org/perl/bigsdb/bigsdb.pl?page=profileInfo&db=pubmlst_campylobacter_seqdef&scheme_id=1&profile_id=8082

Profile information for ST-8082 (MLST)

ST	aspA	glnA	gltA	gltA	pgm	tki	uncA	clonal complex
8082	7	200	2	2	58	3	6	ST-353 complex

sender: Fuat Aydın, Erciyes Univ. Faculty of Veterinary Medicine, Kayseri
curator: Alison Cody, Department of Zoology, Oxford University, UK (E-mail: Alison.Cody@zoo.ox.ac.uk)
update history: 1 update show details
date entered: 2015-12-16
datestamp: 2015-12-16

Client database

PubMLST isolates: Contains data for a collection of isolates that represent the total known diversity of *C. jejuni* and *C. coli*. For every allelic profile in the profiles database there is at least one corresponding isolate deposited here. Any isolate may be submitted to this database and consequently it should be noted that it does not represent a population sample. 1 isolate

ST 8083 ile ilgili bilgilerin yer aldığı web sayfası

http://pubmlst.org/perl/bigsdb/bigsdb.pl?page=profileInfo&db=pubmlst_campylobacter_seqdef&scheme_id=1&profile_id=8083

Profile information for ST-8083 (MLST)

ST	aspA	glnA	gltA	gltA	pgm	tki	uncA	clonal complex
8083	2	4	5	2	2	12	5	ST-206 complex

sender: Fuat Aydın, Erciyes Univ. Faculty of Veterinary Medicine, Kayseri
curator: Alison Cody, Department of Zoology, Oxford University, UK (E-mail: Alison.Cody@zoo.ox.ac.uk)
update history: 1 update show details
date entered: 2015-12-16
datestamp: 2015-12-16

Client database

PubMLST isolates: Contains data for a collection of isolates that represent the total known diversity of *C. jejuni* and *C. coli*. For every allelic profile in the profiles database there is at least one corresponding isolate deposited here. Any isolate may be submitted to this database and consequently it should be noted that it does not represent a population sample. 2 isolates

ST 8084 ile ilgili bilgilerin yer aldığı web sayfası

http://pubmlst.org/perl/bigssdb/bigssdb.pl?page=profileInfo&db=pubmlst_campylobacter_seqdef&scheme_id=1&profile_id=8084



Antibiyotik duyarlılık testi sonuçları

İnsan orijinli *C.jejuni* izolatları

E test yöntemi ile yapılan antibiyotik duyarlılık testi sonuçları Tablo 11 ve Grafik 1’de verilmiştir. Buna göre test edilen 77 adet *C.jejuni* izolatının 42’si (%54,54) nalidiksik asit ve siprofloksasine duyarlı bulunurken, 35’i (%45,45) nalidiksik asite, 33’ü (%42,85) de siprofloksasine dirençli bulundu. İki (%2,59) izolat da siprofloksasine orta derecede duyarlı bulundu.

Tablo 11. İnsan orijinli *C.jejuni* izolatlarının E test yöntemi ile yapılan antibiyotik duyarlılık test sonuçları

Antibiyotik	MIC Dağılımı			MIC sonuçlarına göre <i>C.jejuni</i> izolatlarının dağılımı															
	S	I	R	0.002	0.016	0.12	0.25	0.5	1	2	3	4	6	8	16	32	64	128	256
NA	≤16	-	≥32					1	2		4	5		9	21	18	10	4	3
CIP	≤1	2	≥4				9	15	18	2		17	10	3	3				

NA: Nalidiksik asit, 0.016-256 mcg

CIP: Siprofloksasin, 0.002-32 mcg

Tablo 12. İnsan orijinli *C.jejuni* izolatlarının E test yöntemi ile yapılan antibiyotik duyarlılık test sonuçları

İzolat No	NA	CIP	İzolat No	NA	CIP	İzolat No	NA	CIP
H1	r	r	H47	s	s	H85	r	r
H3	s	s	H49	r	r	H86	s	s
H4	s	s	H51	r	r	H88	s	s
H5	s	s	H52	r	r	H89	r	r
H8	s	s	H54	s	s	H90	r	r
H9	s	s	H55	r	i	H91	s	s
H10	s	s	H56	s	s	H92	r	i
H11	s	s	H58	r	r	H94	r	r
H12	s	s	H59	r	r	H95	r	r
H17	r	r	H60	s	s	H97	r	r
H18	s	s	H61	r	r	H98	s	s
H22	r	r	H62	s	s	H99	s	s
H24	r	r	H63	s	s	H100	r	r
H26	r	r	H65	s	s	H101	r	r
H28	r	r	H66	s	s	H102	r	r
H29	s	s	H69	s	s	H103	s	s
H30	r	r	H70	s	s	H104	s	s
H32	r	r	H71	r	r	H105	s	s
H33	r	r	H72	s	s	H106	r	r
H34	s	s	H73	s	s	H107	r	r
H35	s	s	H74	r	r	H108	s	s
H36	r	r	H76	s	s	H109	s	s
H38	s	s	H80	s	s	H110	s	s
H41	s	s	H82	s	s	H111	r	r
H43	s	s	H83	r	r	H113	s	s
H45	r	r	H84	r	r			

NA: nalidiksik asit
i: intermediate

CIP: siprofloksasin
r: dirençli s: duyarlı

Köpek orijinli *C. jejuni* izolatları:

E test yöntemi ile yapılan antibiyotik duyarlılık testi sonuçları Tablo 13 ve Grafik 1’de verilmiştir. Buna göre test edilen 34 adet *C.jejuni* izolatının 18’i (%52,94) nalidiksik asite duyarlı 16’sı (%47,05) da dirençli bulundu. İzolatların 22’si (%64.70) enrofloksasine duyarlı, 7’si (%20.58) dirençli, 5’i (%14,70) de orta derecede duyarlı bulundu

Tablo 13. Köpek orijinli *C.jejuni* izolatlarının E test yöntemi ile yapılan antibiyotik duyarlılık test sonuçları

Antibiyotik	MIC Dağılımı			MIC sonuçlarına göre <i>C.jejuni</i> izolatlarının dağılımı															
	S	I	R	0.002	0.016	0.12	0.25	0.5	1	2	3	4	6	8	16	32	64	128	256
NA	≤16	-	≥32									1	2	6	9	7	5	2	2
ENR	≤0.25	0.5-1	≥2			5	17	3	2	3	3	1							

NA: Nalidiksik asit, 0.016-256 mcg

ENR: Enrofloksasin, 0.002-32 mcg

Tablo 14. Köpek orijinli *C.jejuni* izolatlarının E test yöntemi ile yapılan antibiyotik duyarlılık test sonuçları

İzolat No	NA	ENR	İzolat No	NA	ENR
K1	s	s	K20	s	s
K2	s	s	K21	s	s
K3	r	r	K23	s	s
K4	s	s	K24	r	i
K5	s	s	K25	r	r
K6	r	i	K26	r	r
K8	r	s	K27	r	s
K9	s	s	K28	s	s
K11	s	s	K29	r	r
K12	s	s	K30	s	s
K13	r	s	K31	s	s
K14	s	s	K33	r	i
K15	s	s	K34	r	r
K16	r	s	K35	r	i
K17	s	s	K36	r	r
K18	s	s	K37	r	r
K19	i	s	K38	r	i

NA: nalidiksik asit

ENR: enrofloksasin

i: intermediate

r: dirençli

s: duyarlı

Sığır orijinli *C. jejuni* izolatları

E test yöntemi ile yapılan antibiyotik duyarlılık testi sonuçları Tablo 15 ve Grafik 1’de verilmiştir. Buna göre test edilen 35 adet *C.jejuni* izolatının 32’si (%91,42) nalidiksik asite duyarlı 3’ü (%8,57) de dirençli bulundu. İzolatların 32’si (%91,42) enrofloksasine duyarlı, 2’si (%5,71) dirençli, 1’i (%2,85) de orta derecede duyarlı bulundu

Tablo 15. Sığır orijinli *C.jejuni* izolatlarının E test yöntemi ile yapılan antibiyotik duyarlılık test sonuçları

Antibiyotik	MIC Dağılımı			MIC sonuçlarına göre <i>C.jejuni</i> izolatlarının dağılımı																
	S	I	R	0.002	0.016	0.12	0.25	0.5	1	2	3	4	6	8	16	32	64	128	256	
NA	≤16	-	≥32										2	7	23	1	2			
ENR	≤0.25	0.5-1	≥2		6	10	16		1	1	1									

NA: Nalidiksik asit, 0.016-256 mcg

ENR: Enrofloksasin, 0.002-32 mcg

Tablo 16. Sığır orijinli *C.jejuni* izolatlarının E test yöntemi ile yapılan antibiyotik duyarlılık test sonuçları

İzolat No	NA	ENR	İzolat No	NA	ENR
S1	s	s	S19	s	s
S2	s	s	S20	s	s
S3	s	s	S21	s	s
S4	s	s	S22	s	s
S5	s	s	S23	s	s
S6	s	s	S24	s	s
S7	s	s	S25	s	s
S8	s	s	S26	s	s
S9	s	s	S27	s	s
S10	s	s	S29	s	s
S11	s	s	S30	s	s
S12	r	i	S31	s	s
S13	s	s	S32	s	s
S14	s	s	S33	s	s
S15	s	s	S34	r	r
S16	s	s	S35	r	r
S17	s	s	S36	s	s
S18	s	s			

NA: nalidiksik asit ENR: enrofloksasin
i: intermediate r: dirençli s: duyarlı

Tavuk orijinli *C. jejuni* izolatları

E test yöntemi ile yapılan antibiyotik duyarlılık testi sonuçları Tablo 17 ve Grafik 1’de verilmiştir. Buna göre test edilen 32 adet *C.jejuni* izolatının 13’ü (%40,62) nalidiksik asite duyarlı 19’ü (%59,37) dirençli bulundu. İzolatların 16’sı (%50,00) enrofloksasine duyarlı, 14’ü, (%43,75) dirençli, 2’si (%6,25) de orta derecede duyarlı bulundu.

Tablo 17. Tavuk orijinli *C.jejuni* izolatlarının E test yöntemi ile yapılan antibiyotik duyarlılık test sonuçları

Antibiyotik	MIC Dağılımı			MIC sonuçlarına göre <i>C.jejuni</i> izolatlarının dağılımı															
	S	I	R	0.002	0.016	0.12	0.25	0.5	1	2	3	4	6	8	16	32	64	128	256
NA	≤16	-	≥32										3	5	5	6	5	5	3
ENR	≤0.25	0.5-1	≥2		4	5	7		2	5	4		4		1				

NA: Nalidiksik asit, 0.016-256 mcg

ENR: Enrofloksasin, 0.002-32 mcg

Tablo 18. Tavuk orijinli *C.jejuni* izolatlarının E test yöntemi ile yapılan antibiyotik duyarlılık test sonuçları

İzolat No	NA	ENR	İzolat No	NA	ENR
T1	s	s	T51	r	r
T4	s	s	T52	r	r
T5	r	r	T54	s	s
T7	r	r	T55	s	s
T8	r	i	T57	s	s
T10	r	s	T58	r	s
T13	r	r	T59	r	r
T19	r	s	T60	r	r
T22	r	i	T61	r	r
T24	s	s	T62	s	s
T27	s	s	T65	r	r
T29	r	r	T67	r	r
T31	s	s	T70	s	s
T34	r	r	T78	s	s
T37	s	s	T79	r	r
T49	r	r	T82	s	s

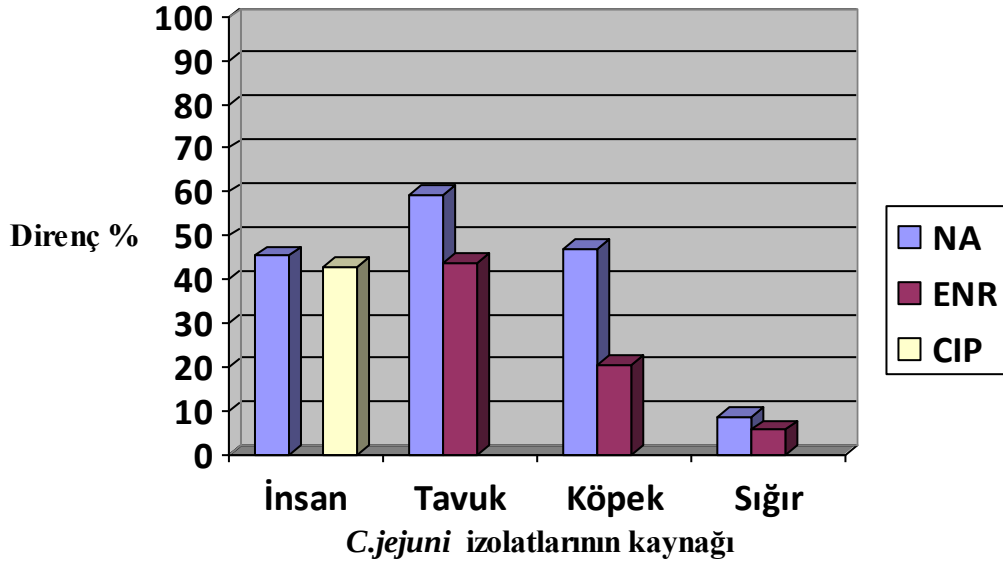
NA: nalidiksik asit

i: intermediate

ENR: enrofloksasin

r: dirençli

s: duyarlı

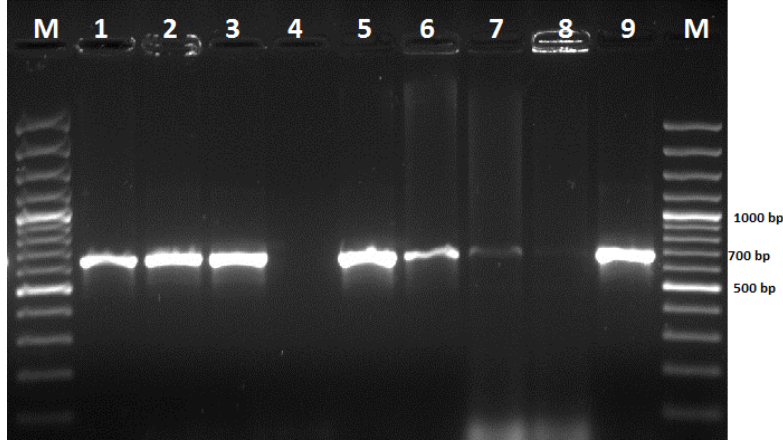


Grafik 1. İnsan, tavuk, köpek ve sığır orijinli *C.jejuni* izolatlarının Nalidiksik asit (NA), Enrofloksasin (ENR) ve Siprofloksasine (CIP) direnç oranları

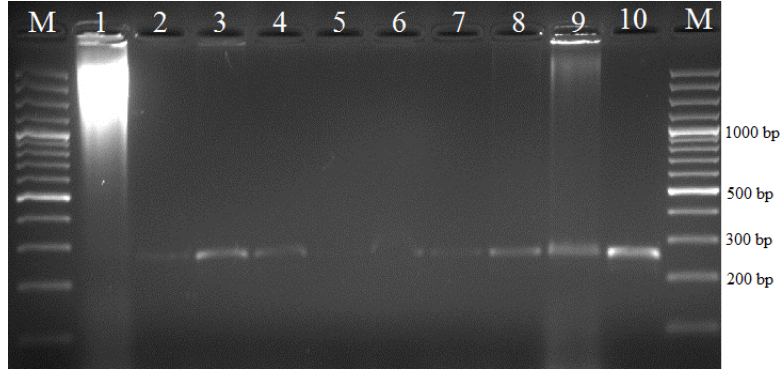
Florokinolon direncinin genetik analizi sonuçları

Kromozomal orijinli florokinolon direncinin analiz sonuçları

E test ile kinolon dirençli oldukları saptanan insan orijinli 35, köpek orijinli 16, sığır orijinli 3 ve tavuk orijinli 19 olmak üzere toplam 73 adet *C. jejuni* izolatında florokinolon dirençliliği ile ilişkili gyrA geni QRDR (quinolone resistance determining) ve gyrA mutasyonu başarılı bir şekilde gösterilmiştir. Dirençli olan tüm izolatlarda QRDR (quinolone resistance determining) 673 bp, (Resim 13) *C.jejuni* gyrA mutasyonu ise 265 bp büyüklüğünde bantlar ile tanımlanmışlardır (Resim 14). Mutasyon saptanan bu izolatlara ait ampikonlar GZgyrA7 ve GZgyrA8 primerleri sekanslanılmışlardır. Elde edilen dizi analiz sonuçları daha sonra BLAST ile GenBank’da referans diziler ile karşılaştırılmışlardır. Sekans analizi sonunda dirençli izolatlarda öncelikle 86. aminoasitte treonin, izolösin (CT) mutasyonuna rastlanmıştır. Bunun yanında dirençli bazı izolatlarda diğer aminoasitlerde de (81.,119., 120., 121.) mutasyonların varlığı tespit edilmiştir.



Resim 13. Kinolon dirençli *C.jejuni* izolatlarında *gyrA* geni üzerinde bulunan QRDR (quinolone resistance determining)’ye ait amplifiye ürünlerin agaroz jeldeki görüntüsü. 4: Negatif kontrol, 1 2 3 5 6 7 8 9: Pozitif örnek (673 bp) M: marker (100 bp plus DNA ladder,Thermo)



Resim 14. Kromozomal kinolon direncine ait amplifiye ürünlerin agaroz jeldeki görüntüsü. 1: Negatif kontrol, 2 3 4: Pozitif örnek (265 bp) insan orijinli *C.jejuni* izolatu 5 6: Pozitif örnek (265 bp) tavuk orijinli *C.jejuni* izolatu 7 8: Pozitif örnek (265 bp) sığır orijinli *C.jejuni* izolatu 9 10: Pozitif örnek (265 bp) köpek orijinli *C.jejuni* izolatu M: marker (100 bp DNA ladder)

Plazmid ilişkili florokinolon direncinin analiz sonuçları

Çalışmada test edilen 178 adet *C.jejuni* izolatının enrofloksasine dirençli köpek orijinli 7, tavuk orijinli 14 ve sığır orijinli 2 adet *C.jejuni* izolatının tümü plazmid ilişkili florokinolon direnç geni yönünden negatif bulunmuştur. Siprofloksasine dirençli insan orijinli 33 adet *C.jejuni* izolatu da benzer şekilde plazmid ilişkili florokinolon direnç geni yönünden negatif bulunmuştur (Tablo 19).

Tablo 19. Plazmid ilişkili florokinolon direnci analiz sonuçları:*C.jejuni* izolatlarının kaynağı, dirençli izolat sayısı* ve florokinolon direnç geni taşıyan izolat sayısı†

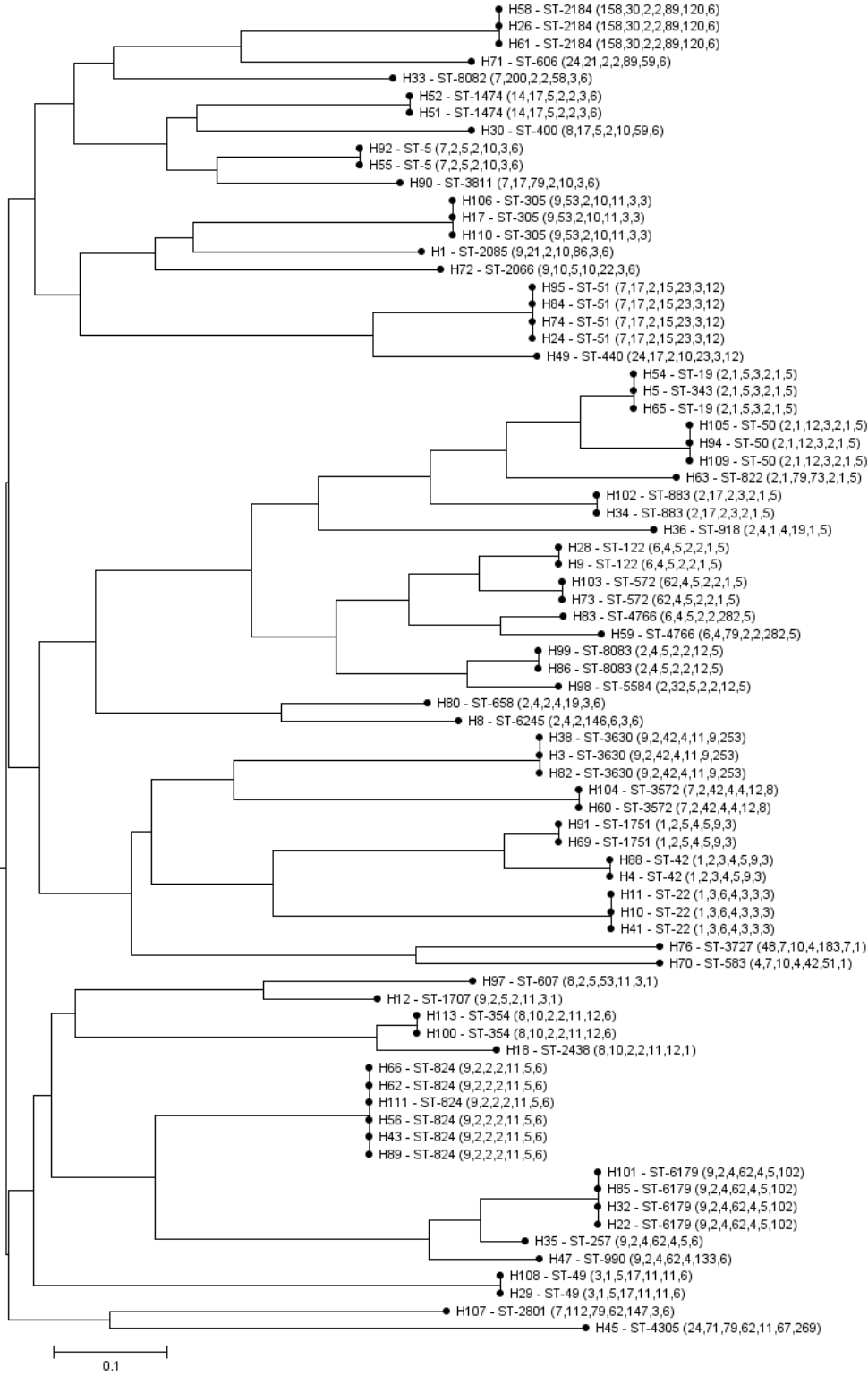
Antibiyotik	Orijin			
	İnsan	Köpek	Sığır	Tavuk
Enrofloksasin		7* / 0†	2* / 0†	14* / 0†
Siprofloksasin	33* / 0†			

Dendrogram

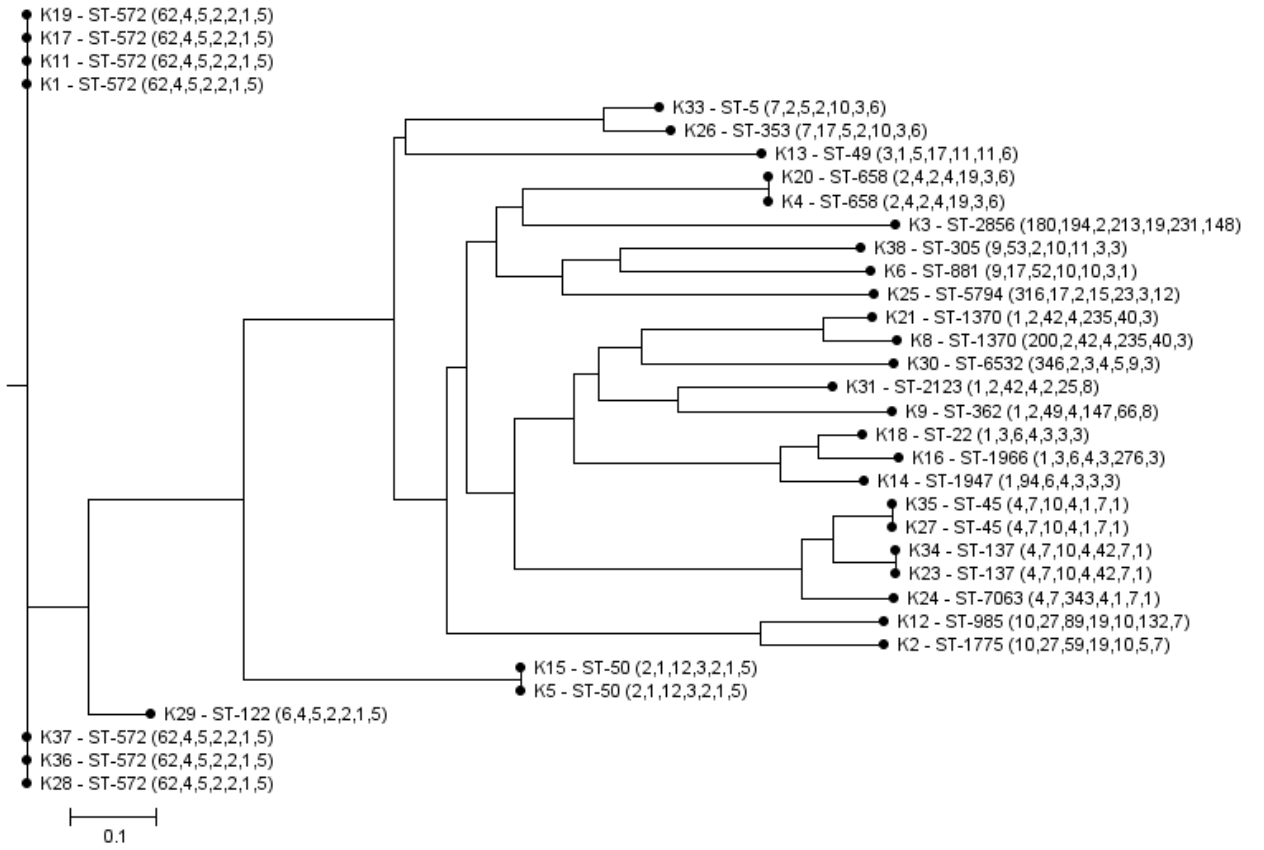
START2 (Sequence Type Analysis and Recombinational Tests) programında (<http://pubmlst.org/software/analysis/>) elde edilen dendrogram sonuçları her türe ait izolatlar için ayrı ayrı olarak ve ayrıca tüm izolatların bir arada değerlendirildiği aşağıdaki şekillerde verilmiştir.

Dendrogram sonuçları genel olarak, izolatların çok geniş bir heterojeniteye sahip olduğunu göstermektedir.

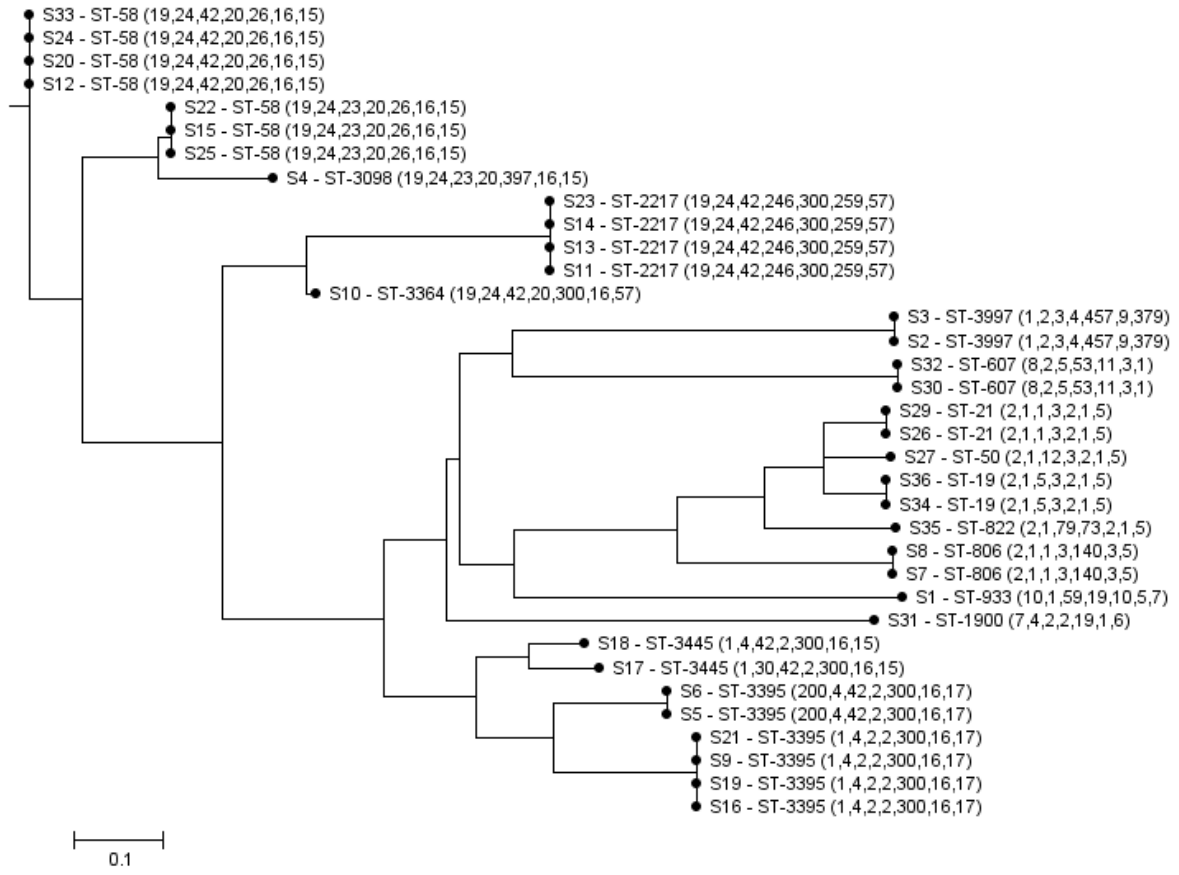
İnsan orijinli *C.jejuni* izolatları dendrogram sonuçları



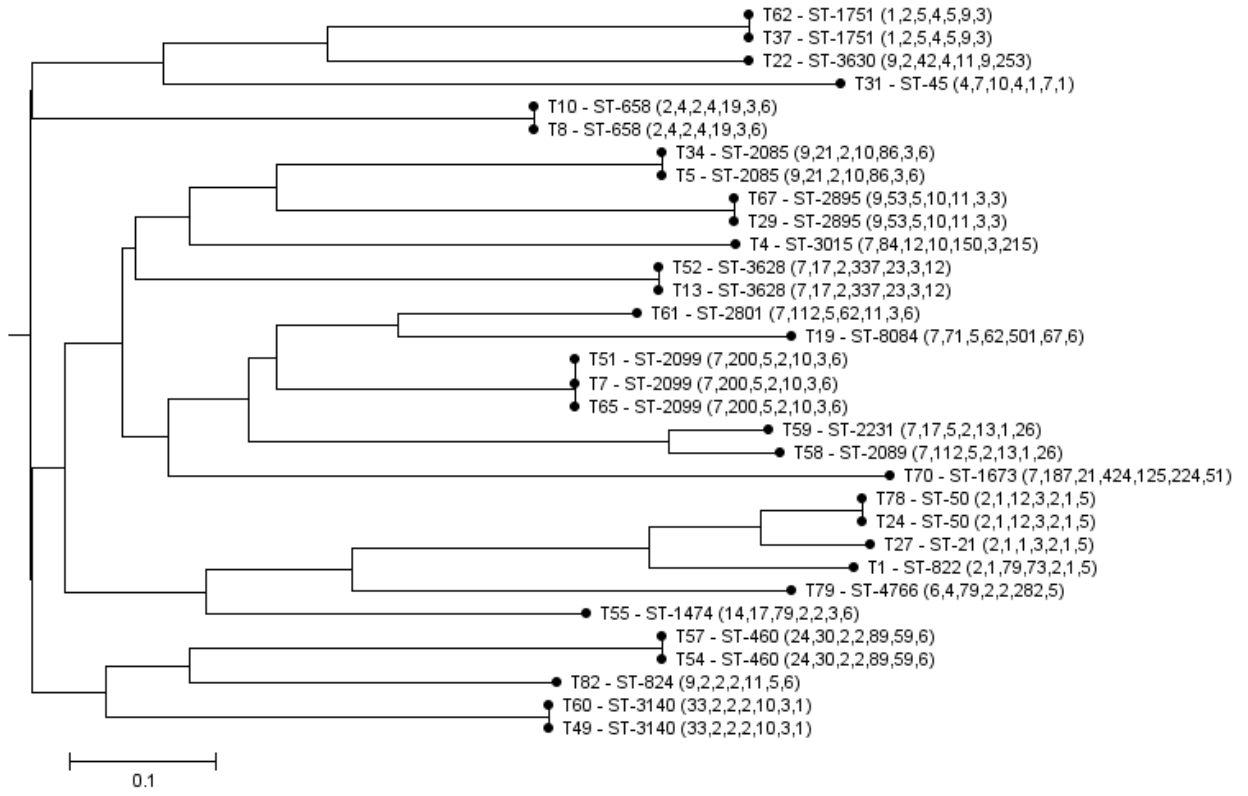
Köpek orijinli *C.jejuni* izolatları dendrogram sonuçları



Sığır orijinli *C.jejuni* izolatları dendrogram sonuçları

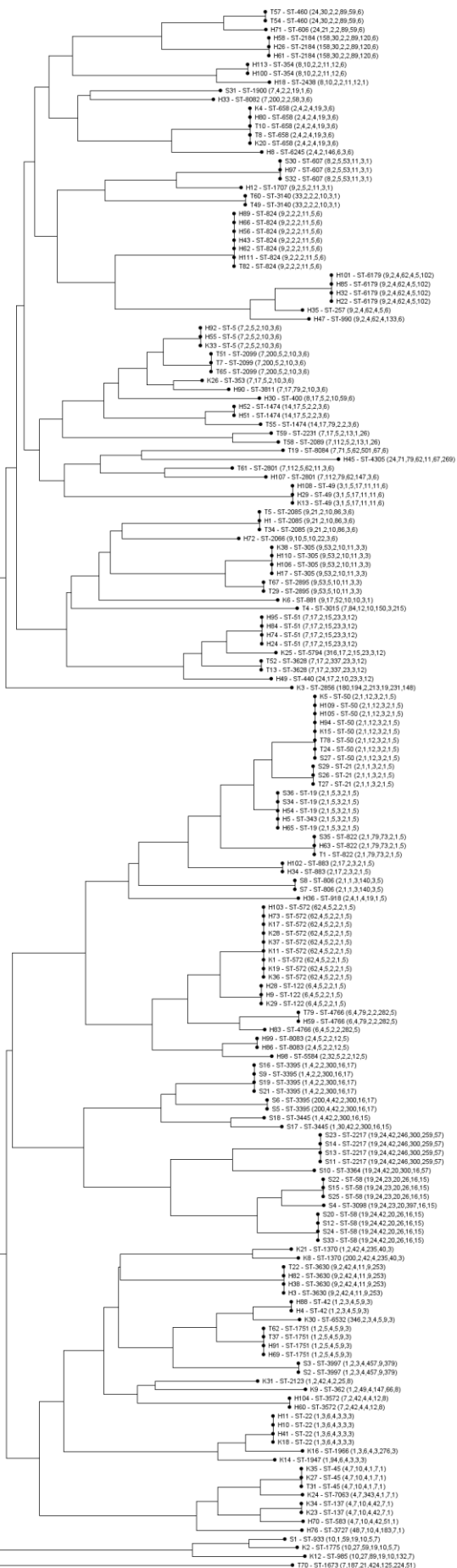


Tavuk orijinli *C.jejuni* izolatları dendrogram sonuçları



Tüm *C.jejuni* izolatlarının (178 adet) dendrogram sonuçları

Sığır, tavuk, köpek ve insan orijinli toplam 178 adet *C.jejuni* izolatının ST'lerinin arasındaki klonal ilişkinin belirlenmesi amacıyla yapılan dendrogram sonuçları aşağıdaki şekilde verilmiştir.



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus- Polymerase Chain Reaction)

Çalışmanın bu bölümünde ERIC-PCR ile farklı genotipe sahip *C.jejuni* izolatlarının seçilmesi işlemi yapılmıştır. Bu bölümde tablo 'de belirtilen *C.jejuni* izolatlarına genotiplendirme yapıldıktan sonra her izolatın bant profili gözle değerlendirilerek farklı karakterde olan izolatlar seçilerek MLST ve antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılmıştır. Köpek orijinli 360 izolat içerisinde 34, sığır orijinli 243 izolat içerisinde 35 ve tavuk orijinli 400 izolat içerisinde 32 *C.jejuni* izolatı seçilmiştir. Ancak klinik olgulardan izole edilmelerinden dolayı 77 adet insan *C.jejuni* izolatının tümü çalışmanın her aşamasında kullanılmıştır. Böylece 1080 *C.jejuni* izolatı içerisinde seçilen toplam olarak 178 izolat çalışmanın MLST ve antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılmışlardır.

ERIC-PCR hızlı ve güvenilir bir moleküler metot olup kampilobakter türlerinin genotiplendirilmesi amacıyla başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Wardak ve ark 2009, Rapp ve ark 2012). Çalışmamızda da test edilen tüm *C.jejuni* izolatları ERIC-PCR yöntemi ile başarılı bir şekilde genotiplendirilmiştir.

5.2. Multi Locus Sequence Typing (MLST)

MLST yakın zamanda geliştirilmiş olan bir genotiplendirme metodu olup, *Campylobacter.jejuni*'nin bu metot ile tiplendirilmesi ise Dingle ve ark (2001) tarafından 2001 yılında gerçekleştirilmiştir. Bu tarihten sonra çeşitli kaynaklardan ayrılan *C. jejuni* izolatlarının bu metot ile genotiplendirilmesine yönelik olarak diğer ülkelerde çok sayıda araştırma gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem genotiplendirme amacıyla bazı çalışmalarda tek başına kullanıldığı gibi bazı araştırmalarda ise diğer genotiplendirme yöntemleri ile beraber kullanılarak kıyaslanmaları yapılmıştır. Bu yöntem ile ilgili olarak kurulan veritabanında 25 Nisan 2016 tarihi itibarıyla 8167 ST yer almaktadır. Dünyanın her coğrafyasından araştırmacılar bu veritabanına kendi izolatlarının ST'lerini ve allel sayılarını girmekte ve diğer izolatlar ile kıyaslamasını yapabilmektedirler.

Ioannidou ve ark (2013) insan klinik olgularından izole edilen 68 *C.jejuni* izolatını MLST ile analiz etmişlerdir. Araştırmacılar, 41 farklı ST bulmuşlar, 56 izolatın da 15 farklı Klonal kompleks içinde sınıflandırıldığını bildirmişlerdir. Çalışmada elde edilen MLST sonuçları ile diğer tiplendirme metotları arasında bir ilişki saptanamamıştır.

Schallegger ve ark.(2016) Avusturya’da 15 broiler kümesinde yaz döneminde *Campylobacter* spp. kontaminasyon durumunu araştırmışlar ve 12 kümesin termofilik kampilobakterler yönünden pozitif olduğunu saptamışlardır. Çalışma kapsamında izole edilen *C. jejuni* izolatlarının MLST ile tiplendirilmesi sonucunda izolatların çoğuluğunun insan infeksiyonları ile ilişkili CC ST-446 ve ST-4373 olduğunu bildirmişlerdir.

Magnússon ve ark. (2011) insan, hayvan ve çevresel örneklerden izole edilen *C.jejuni* izolatlarının MLST ile analizini yapmışlar ve izolatların genel olarak MLST veritabanında yer alan ST’ler olduğunu bildirmişlerdir. Kovanen ve ark (2016) insan, tavuk ve yüzme havuzlarından izole edilen 198 *C.jejuni* izolatının genotiplendirilmesi için MLST kullanmışlardır. Araştırmacılar insan izolatlarının ST’lerinin %79 oranında tavuk izolatlarının ST ‘leri ile benzerlik gösterdiğini, ayrıca 4 ST’nin (ST-45, ST-230, ST-267 ve ST-677) insan izolatlarının %75’ini ve tavuk izolatlarının da %64’ünü içerdiğini bildirmişlerdir.

Duarte ve ark (2016) broiler karkas orijinli *C.jejuni* izolatlarının farklı tiplendirme meodu ile tiplendirmişler ve bunların kıyaslamasını yapmışlardır. Araştırmacılar MLST’nin fla-RFLP ile kombinasyonunun, broiler karkaslarından izole edilen kampilobakterlerin, kısa dönem içerisinde izlenmesinde ve tiplendirmesinde kullanılabilecek kolay ve uygulanabilir bir metot olduğunu bildirmişlerdir.

Gormley ark (2008) insan enterit olgularından ve tavuk etlerinden 2001 ve 2006 yıllarında ayırdıkları *C.jejuni* izolatlarını MLST ile analiz etmişler ve CC-21’in 2006 yılında 2001 yılına oranla prevalansının daha düşük olduğunu bildirmişler ve insan enfeksiyonları için kanatlı etlerinin önemini vurgulamışlardır. Nielsen ve ark. (2010) Danimarka’da 2002 ve 2003 yıllarına ait klinik olgulardan ayrılan insan orijinli 122 *C.jejuni* izolatının populasyon yapısını ve farklılığını saptamak için mlst kullanmışlardır. Araştırmacılar 18 klonal kompleks içinde 51 sekans tipi (STs) tanımlamışlar ve elde ettikleri ST-21, ST-45 ve ST-22 klonal komplekslerinin tüm izolatların %64’ü olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada Danimarka orijinli *C.jejuni* izolatları arasında klonal farklılığın olduğunu da rapor etmişlerdir. Sproston ve ark.(2010) sinek ve sümüklü böceklerden izole ettikleri *Campylobacter* izolatlarını MLST ile tiplendirmişler ve en yaygın görülen tipin (%40) *C.coli* ST-962 olduğunu, ayrıca sümüklü böcek orijinli 2 izolatın da ilk kez izole edilen STs olduğunu bildirmişlerdir. Yine yakın zamanda Japonya’da tanımlanan yeni ST’lerin (ST-4526) o coğrafyaya özgü olduğu bildirilmiştir (Asakura ve ark., 2012).

Oh ve ark (2015) tavuk etlerinden izole edilen 70 *C.jejuni* izolatının MLST ile analizinde izolatların çoğunun insan ifeksiyonlarıyla ilişkili izolatların yer aldığı klonal kompleks CC-21 ve klonal kompleks CC-45 içinde bulunduğunu rapor etmişlerdir.

Yukarıda görüldüğü gibi çeşitli kaynaklardan ayrılan *C.jejuni* izolatlarının MLST ile genotiplendirilmesine ilişkin değişik coğrafyalarda yürütülen çalışmalar mevcut olup sonuçlar ise *C.jejuni* izolatlarının çok geniş bir heterojenite gösterdikleri yönündedir. Yurdumuzda ise *C.jejuni* izolatlarının MLST ile genotiplendirilmesine ilişkin herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma ile yurdumuzda ilk defa *C.jejuni* izolatlarının MLST ile analizi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 77'si insan, 34'ü köpek, 35'i sığır ve 32'si tavuk olmak üzere toplam 178 *C.jejuni* izolatının MLST ile genotiplendirilmiştir. Araştırmamızda 77 insan izolatının tümü MLST ile genotiplendirilmiştir. Toplam olarak 43 sekans tipi elde edilmiş olup 22 farklı sekans tipinde (unique) 22 izolat yer alırken, sayıları 2 ile 6 arasında değişen toplam 55 izolat ise 21 farklı sekans tipinde toplanmıştır. En çok izolatın yer aldığı sekans tipi, ST 824 olup toplam 6 izolat yer almıştır. *Campylobacter* MLST veritabanında bulunmayan **ST 8082** (H33) ve **ST 8083** (H86, H99) 2 yeni ST olup, bu sekans tipleri ilk defa bu araştırma ile yurdumuzda saptanmışlardır.

Test edilen toplam 34 köpek orijinli *C.jejuni* izolatının tümü MLST ile tiplendirilmiştir. Toplam olarak 23 sekans tipi elde edilmiş olup 17 izolat 17 farklı sekans tipinde (unique) yer alırken, sayıları 2 ve 7 arasında değişen toplam 17 izolat 6 sekans tipinde toplanmıştır. En çok izolatın yer aldığı sekans tipi, ST 572 olup toplam 7 izolat yer almıştır.

Test edilen toplam 35 Sığır orijinli *C.jejuni* izolatının tümü MLST ile tiplendirildi. Toplam olarak 18 sekans tipi elde edilmiş olup 6 izolat 6 farklı sekans tipinde (unique) yer alırken, sayıları 2 ile 7 arasında değişen toplam 29 izolat 9 sekans tipinde toplanmıştır. En çok izolatın yer aldığı sekans tipi, ST 58 olup toplam 7 izolat yer almıştır.

Test edilen toplam 32 tavuk orijinli *C.jejuni* izolatının tümü MLST ile tiplendirildi. Toplam olarak 21 sekans tipi elde edilmiş olup 13 izolat 13 farklı sekans tipinde (unique) yer alırken, sayıları 2 ile 3 arasında değişen toplam 19 izolat 8 sekans tipinde toplanmıştır. En çok izolatın yer aldığı sekans tipi, ST 2099 olup toplam 3 izolat yer almıştır. Bu grupta yer alan T19 nolu izolatın sekans tipi **ST 8084** olarak belirlenmiş olup daha önce *Campylobacter* MLST veritabanına yer almayan bu Sekans tipi ilk kez yurdumuzdan bildirilmiştir. Başka coğrafyalarda yer almayan 3 yeni ST'nin (**ST 8082**, **ST 8083** ve **ST 8084**) yurdumuzda saptanmış olması çalışmanın en önemli sonucu olarak düşünülmektedir.

5.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi

Kinolonlar gerek veteriner hekimlikte ve gerekse beşeri hekimlikte yaygın olarak kullanılan anti bakteriyel ilaçlardır. Bu grubun ilk üyesi 1960'lı yılların başlarında geliştirilen ve yapısında flor ihtiva etmeyen nalidiksik asittir. 1980'lerde ise yapılarında 6-flor grubu bulunduran siprofloksasin gibi türevleri geliştirilmiştir. Enrofloksasin de veteriner hekimlikte ilk kullanılan florokinolon türevidir. Tüm florokinolonlar bakterisidal etkili olup etki mekanizması da bakterilerdeki DNA gyrase enzimini (Type II topoisomerase) hedef alırlar.

İlk uygulamaya sokulduklarında *Campylobacter* spp. için oldukça etkili olan bu grup antibakteriyel ilaçlarda, tüm dünyada yıllar içerisinde gözlenen ve yüksek oranlara ulaşan bir direnç gelişimi söz konusudur. Direnç gelişimine ilişkin durum yurdumuzda yapılan çalışmalarda da rapor edilmiştir. Tavuk ve insan orijinli *C.jejuni* izolatlarındaki direnç gelişimine ilişkin durum yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur.

Örneğin Savaşan ve ark (2004), 1987, 1992 ve 2000 yıllarında broilerlerden izole edilen *C.jejuni* izolatlarında nalidiksik asit, enrofloksasin ve siprofloksasin antibiyotiklerine ilişkin direnç gelişimini analiz etmişlerdir. Çalışmada 1987 yılına ait izolatlarda enrofloksasin ve siprofloksasin direnci gözlenmezken, 2000 yılına ait izolatlarda enrofloksasin, siprofloksasin ve nalidiksik asite sırasıyla %75.5, %73 ve %94,5 oranlarında bir direnç saptandığını bildirmişlerdir.

Yine yurdumuzda insan gastroenterit olgularından ayrılan *C.jejuni* izolatlarında kinolonlara karşı zaman içinde artan bir direnç gelişimi de çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Gür ve ark (1989) *Campylobacter* izolatlarının tümünü kinolonlara duyarlı bulurken, Akan ve ark (1994) 119 *Campylobacter* izolatının sadece birinde kinolon direnci saptamışlardır. Kinolon direncini Yıldırım ve ark (1996) %26, Öncül ve ark (2003) %14, Öngen ve ark (2007) %59, Güney ve Başustaoğlu (2010) ise %64.3 olarak bildirmişlerdir. Yine yakın zamanda Kayman ve ark (2013) gastroenterit orijinli *C.jejuni* izolatlarında nalidiksik aside %79.5, siprofloksasine %73.9 ve levofloksasine %75.6 oranında direnç bildirmişlerdir.

C.jejuni izolatlarında artış gösteren kinolon direnci diğer ülkelerden de bildirilmektedir (Cody et al 2010). Kashoma ve ark.(2015) sığır ve domuz orijinli *C.jejuni* izolatlarında siprofloksasine % 7.2, nalidiksik asite ise % 39.6 oranında direnç bildirmişlerdir. Bakhshi ve ark.(2016) insan ve gıda orijinli *Campylobacter* izolatlarında yüksek oranda siprofloksasin ve nalidiksik asit direncini rapor etmişlerdir

Kinolon türevi olan enrofloksasin ve sarafloksasinin veteriner hekimlik alanında enfeksiyondan korunma, hızlı büyüme ve et verimini artırma amacıyla kullanılıyor olmasının,

bu direnç gelişimine katkı sağladığı ileri sürülmektedir (Yıldırım ve ark 1996, Güney ve Başustaoglu 2010, Cody ve ark 2010, Kittl ve ark 2011).

Çalışmamızda insan izolatlarının 35'i (%45,45) nalidiksik asite, 33'ü (%42,85) de siprofloksasine dirençli bulunmuşlardır. Köpek izolatlarının 16'sı (%47,05) nalidiksik asite, 7'si (%20,58) enrofloksasine, sığır izolatlarının 3'ü (%8,57) nalidiksik asite 2'si (%5,71) enrofloksasine, ve tavuk izolatlarının 19'ü (%59,37) nalidiksik asite 14'ü, (%43,75) enrofloksasine dirençli bulundu. Bu sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, yukarı belirtilen araştırmacıların sonuçları ile uyum göstermektedir. Özellikle insan ve kanatlı orijinli izolatların yüksek florokinolon direnci dikkat çekicidir (Grafik 1).

5.3. Florokinolon direncinin moleküler analiz sonuçları

E test ile kinolon dirençli oldukları saptanan insan orijinli 35, köpek orijinli 16, sığır orijinli 3 ve tavuk orijinli 19 olmak üzere toplam 73 adet *C. jejuni* izolatında florokinolon dirençliliği ile ilişkili gyrA geni QRDR (quinolone resistance determining) ve gyrA mutasyonu başarılı bir şekilde gösterilmiştir. Dirençli olan tüm izolatlarda QRDR (quinolone resistance determining) 673 bp, (Resim 13) *C.jejuni* gyrA mutasyonu ise 265 bp büyüklüğünde bantlar ile tanımlanmışlardır (Resim 14). Mutasyon saptanan bu izolatlara ait amplikonlar GZgyrA7 ve GZgyrA8 primerleri sekanslanmışlardır. Elde edilen dizi analiz sonuçları daha sonra BLAST ile GenBank'da referans diziler ile karşılaştırılmışlardır. Sekans analizi sonunda dirençli izolatlarda öncelikle 86. aminoasitte treonin, izolösin (CT) mutasyonuna rastlanmıştır. Bunun yanında dirençli bazı izolatlarda diğer aminoasitlerde de (81.,119., 120., 121.) mutasyonların varlığı tespit edilmiştir. İlk kez 1999 yılında Zirnstein ve ark (1999) tarafından bildirilen bu moleküler analiz (MAMA PCR) daha sonra çeşitli araştırmacılar tarafından da kinolon direncinin moleküler analizi amacıyla kullanılmış olup oldukça duyarlı bir metottur. Elde ettiğimiz sonuçlar çeşitli araştırmacıların (Albert ve ark 2005, Said ve ark 2010, Sonnevend ve ark 2006, Woźniak ve ark 2011) bildirdiği sonuçlar ile uyumlu olup *C.jejuni* izolatlarında meydana gelen kinolon direncine ilişkin mutasyonları kısa süre içerisinde belirlemek amacıyla MAMA-PCR'nin kullanılmasının yararlı olacağı sonucuna varılmıştır.

5.4. Plazmid ilişkili florokinolon direncinin analiz sonuçları

Çalışmamızda test edilen 178 adet *C.jejuni* izolatının enrofloksasine dirençli köpek orijinli 7, tavuk orijinli 14 ve sığır orijinli 2 adet *C.jejuni* izolatının tümü plazmid ilişkili florokinolon direnç geni yönünden negatif bulunmuştur. Siprofloksasine dirençli insan orijinli 33 adet *C.jejuni* izolatı da benzer şekilde plazmid ilişkili florokinolon direnç geni yönünden negatif

bulunmuştur (Tablo 19). Benzer şekilde Chatzipanagiotou ve ark.2005 ve Öngen ve Nazik 2008 de analiz ettikleri kinolon dirençli *C.jejuni* izolatlarında plazmid aracılı direnç geni bulamadıklarını bildirmişlerdir.

- Sonuç olarak MLST analizinde insan izolatlarında 43, Köpek izolatlarında 23, Sığır izolatlarında 18, tavuk izolatlarında da 21 sekans tipi tanımlandı.
- Başka ülkelerde rapor edilmeyen ve MLST veritabanında yer almayan 3 yeni ST (ST 8082, ST 8083 ve ST 8084) ilk kez bu çalışma ile yurdumuzda tanımlanmıştır.
- Kinolon direnci insan izolatlarında %42.85, köpek izolatlarında %20.58 sığır izolatlarında %2,85 ve tavuk izolatlarında ise %43,75 olarak belirlenmiştir.
- Genomik kinolon direncinde, gyrA geni üzerindeki mutasyonlar sekans analizi ile tespit edildi.
- Kinolon dirençli *C.jejuni* izolatlarında Tre-86-İle mutasyonuna rastlanırken duyarlı izolatlarda bu mutasyona rastlanmadı.
- Kinolonlara dirençli *C.jejuni* izolatları plazmid ilişkili kinolon direnç geni yönünden negatif bulundu.
- Çalışma bu yönüyle yurdumuzda gerçekleştirilen ilk ve tek çalışma olup konu ile ilgili yapılacak çalışmalara önemli katkı yapacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Acke E., McGill K., Golden O., Jones B.R., Fanning S., Whyte P (2009). Prevalence of thermophilic *Campylobacter* species in household cats and dogs in Ireland. Vet. Rec., 164: 44-47,
- Akan ÖA, Hasçelik G, Akyön Y, Yurdakök K. (1994) *Campylobacter* türlerinin çeşitli antibiyotiklere in vitro duyarlılığı. Mikrobiyol Bül; 28: 122-6,
- Albert MJ, Neil L, Pazhoor AA, Haridas S, Rotimi VO, Khan I. (2005) Ciprofloxacin resistance and its molecular mechanism in *Campylobacter* spp. isolated in Kuwait. Microb Drug Resist. 11(3):266-270.
- Alterkuse S.F., Hunt, J.M., Tollefson, L.K., Madden, J.M. (1994) Food and animal sources of human *Campylobacter jejuni* infection. J. Am. Vet. Med. Assoc., 204, 57-61,
- Alterkuse S.F., Stern, N.J., Fields, P.I., Swerdlow, D.L. (1999) *Campylobacter jejuni* – an emerging foodborne pathogen . Emerg. Infect. Dis.,5, 28-35,
- Arıkan Akan Ö, Hasçelik G, Akyön Y, Yurdakök K. (1994) *Campylobacter* türlerinin çeşitli antibiyotiklere in vitro duyarlılığı.Mikrobiyol Bul; 28(2): 122-126.
- Atabay H.I., Corry J.E.L. (1997) The prevalence of campylobacters and arcobacters in broiler chickens. J. Appl. Microbiol., 83, 619-626,
- Asakura H, Brüggemann H, Sheppard SK, Ekawa T, Meyer TF, Yamamoto S, Igimi S. (2012) Molecular Evidence for the Thriving of *Campylobacter jejuni* ST-4526 in Japan. PLoS One.7(11). doi: 10.1371/journal.pone.0048394.
- Avrain L, Vernozzy-Rozand C, Kempf I. (2004) Evidence for natural horizontal transfer of tetO gene between *Campylobacter jejuni* strains in chickens. J Appl Microbiol.;97(1):134-140,
- Aydın F., Atabay H.İ., Akan M., (2001) The isolation and characterization of of *Campylobacter jejuni* subsp.*jejuni* from domestic geese (*Anser anser*). J. Appl. Microbiol., 90, 637-642,
- Aydın F.,Gümüşsoy, S., İça, T., Sümerkan, B., Eşel, D., Akan, M., Özdemir, A. (2007a) The prevalence of *Campylobacter jejuni* in various sources in Kayseri, Turkey, and molecular analysis of isolated strains by PCR-RFLP. Türk. J. Vet. Anim. Sci.,31:13-19,

- Aydin, F., K. S. Gumussoy, H. I. Atabay, Ica, T. Abay S. (2007b) 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,
- Bakhshi B, Naseri A, Alebouyeh M. (2016) Comparison of Antimicrobial Susceptibility of *Campylobacter* Strains Isolated from Food Samples and Patients with Diarrhea. *Iran Biomed J.* 20(2):91-96.
- Bostan K, Aydin A, Ang MK. (2009) Prevalence and antibiotic susceptibility of thermophilic *Campylobacter* species on beef, mutton, and chicken carcasses in Istanbul, Turkey. *Microb Drug Resist.* 15(2):143-149,
- Broman, T., Waldenstrom, J., Dahlgren, D., Carlsson, I., Eliasson, I., Olsen, B. (2004) Diversities and similarities in PFGE profiles of *Campylobacter jejuni* isolated from migrating birds and humans. *J. Appl. Microbiol.* 96, 834–843,
- Butzler P.J. (2004) *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clin. Microbiol. Infect. Dis.*,10, 868-876,
- Chatzipanagiotou S, Ioannidou V, Ioannidis A, Nicolaou C, Papavasileiou E, Chaniotaki S, Vatopoulos A, Tzouvelekis L, Legakis NJ. (2005) Absence of the plasmid-mediated quinolone resistance *qnrA* gene among *Campylobacter jejuni* clinical isolates from Greece. *Int J Antimicrob Agents.* 26(3):261-262.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), (2008) Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-Third Edition M31-A3 Vol. 28 no. 8 replaces M31-A2 Vol. 22 no. 6. (Wayne, PA) .
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), (2010a). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twentieth Informational Supplement M100-S20 Vol. 30, No. 1 Replaces M100-S19 vol. 29 no. 3. (Wayne, PA) .
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2010b) Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline-Second Edition M45-A2 Vol. 30 No. 18 replaces M45-A Vol. 26 No. 19. (Wayne, PA) .
- Cody AJ, Clarke L, Bowler IC, Dingle KE. (2010) Ciprofloxacin-resistant *Campylobacteriosis* in the UK. *Lancet*; 376(9757): 1987.

Cokal Y, Caner V, Sen A, Cetin C, Karagenc N (2009) *Campylobacter* spp. and their antimicrobial resistance patterns in poultry: an epidemiological survey study in Turkey. Zoonoses Public Health. 56(3):105-10

Cornelius A. J., Nicol, C., Hudson, J.A (2005) *Campylobacter* spp. in New Zealand raw sheep liver and human campylobacteriosis cases. Int. J. Food Microbiol. 99:99-105,

Diker K.S. İstanbulluoglu E. (1986) Ovine abortion associated with *Campylobacter jejuni*. Vet. Rec., 118, 307,

Diker K.S. (1997) Gram negatif mikroaerofilik hareketli bakteriler, s.125-146. In: Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N., Kahraman, M., Akay, Ö., Ilgaz, A., İzgür, M., Diker, K.S. Özel Mikrobiyoloji. Epidemiyoloji, Bakteriyel ve Mikotik Enfeksiyonlar. Medisan Yayın Serisi No.26., Ankara,

Diker K.S. (2008) *Campylobacter* ve Enterobakterilerde Quinolone ve Çoklu Antibiyotik Dirençliliğinin Genetik Analizi. Proje Numarası: 200308056. Ankara Üniversitesi, Bilimsel Arastırma Projeleri,

Dingle KE, Colles FM, Wareing DR, Ure R, Fox AJ, Bolton FE, Bootsma HJ, Willems RJ, Urwin R, Maiden MC. (2001) Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol., 39(1):14-23.

Duarte A, Seliwiorstow T, Miller WG, De Zutter L, Uyttendaele M, Dierick K, Botteldoorn N. (2016). Discriminative power of *Campylobacter* phenotypic and genotypic typing methods. J Microbiol Methods. Mar 18;125:33-39. doi: 10.1016/j.mimet.2016.03.004.

The Efsa Journal (2008) 732: 1-15,

Erganiş O., Yanarateş A. (1995) İshalli buzağı ve çocuklardan izole edilen *Campylobacter*lerin identifikasyonları ile antibiyotiklere duyarlılıkları üzerine çalışmalar.Bültendif.5, 8-10,

Ertaş, H.B., Çetinkaya B.,Muz A., Öngör H. (2004) Genotyping of broiler-originated *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates using fle typing and random amplified polymorphic DNA methods. Int.J.Food.Microbiol., 94, 203-209,

Eyles R.F., Brooks H.J.L., Townsend C.R., Burtenshaw G.A., Heng N.C.K, Jack R.W.. Weinstein P. (2006) Comparison of *Campylobacter jejuni* PFGE and Penner subtypes in human infections and in water samples from the Taieri River catchment of New Zealand. J. Appl.Microbiol.,101: 18–25,

Foster, G., Holmes, B., Steigerwalt, A.G., Lawson, P A., Thorne, P., Byrer, D.E., Ross, H., Xerry, J., Thompson, P.M., Collins, MD.: (2004) *Campylobacter insulaenigrae* sp. nov., isolated from marine mammals. Int J Syst Evol Microbiol., 54: 2369-2373.

Friedman, C., Neimann, J., Wegener, H., and Tauxe, R. (2000) Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialised nations. In *Campylobacter*, 2nd edn. Nachamkin, I., and Blaser, M.J.,(eds). Washington, DC, USA: American Society for Microbiology Press,; pp. 121–138.

Gormley, F.J., MacRae, M., Forbes, K.J., Ogden, I.D., Dallas, J. F., Strachan, N. J. C. (2008) Has Retail Chicken Played a Role in the Decline of Human Campylobacteriosis?. Appl. Environ. Microbiol., 74(2): 383–390,

Güney M, Başustaoğlu AC. (2010).Gülhane Askeri Tıp Akademisi Eğitim Hastanesi'nde Akut Bakteriyel Gastroenterit Etkenleri Arasında *Campylobacter jejuni* ve *Campylobacter coli*'nin Yeri ve Bunların Antimikrobiklere Duyarlılıklarının Araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg; 40: 183-92,

Gür D, Haşcelik G, Akyön Y, Akalın HE, Diker S. (1989) *Campylobacter jejuni* ve *Campylobacter coli*'nin Quinolone Grubu Antibiyotiklere İn Vitro Duyarlılıkları. Mikrobiyol Bül;23: 185-189,

Gurgan, T., Diker, K.S. (1994) Abortion associated with *Campylobacter upsaliensis*. J. Clin. Microbiol.,; 32(12); 3093-3094.

Hudson A.J., Nicol C., Wright J., Whyte R., Hasell K.S. (1999) Seasonal variation of *Campylobacter* types from human cases, veterinary cases, raw chicken, milk and water. J. Appl.Microbiol., 87, 115-124,

Humphrey, T., O'Brien, S., Madsen, M. (2007) Campylobacters as zoonotic pathogens: A food production perspective. Int. J. Food Prot., 117; 237-257,

http://pubmlst.org/perl/bigddb/bigddb.pl?db=pubmlst_campylobacter_isolates

<http://pubmlst.org/campylobacter/info/primers.shtml>

Ioannidou V, Ioannidis A, Magiorkinis E, Bagos P, Nicolaou C, Legakis N, Chatzipanagiotou S. (2013) Multilocus sequence typing (and phylogenetic analysis) of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from clinical cases in Greece. BMC Res Notes. 6:359. doi: 10.1186/1756-0500-6-359.

Ishihara, K., Yamamoto, T., Satake, S., Takayama, S., Kubota, S., Negishi, H., Kojima, A., Asai, T., Sawada, T., Takahashi, T., Tamura, Y. (2006) Comparison of *Campylobacter* isolated from humans and food-producing animals in Japan. J. Appl. Microbiol., 100: 153–160,

Jacoby GA, Chow N, Waites KB. (2003) Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. Antimicrob Agent Chemother, 47: 559–562.

Hong J, Kim JM, Jung WK, Kim SH, Bae W, Koo HC, Gil J, Kim M, Ser J, Park YH. (2007) Prevalence and Antibiotic Resistance of *Campylobacter* spp. Isolated from Chicken Meat, Pork, and Beef in Korea, from 2001 to 2006. J. Food Protect., 70(4): 860-866,

Kashoma IP, Kassem II, Kumar A, Kessy BM, Gebreyes W, Kazwala RR, Rajashekara G. (2015) Antimicrobial Resistance and Genotypic Diversity of *Campylobacter* Isolated from Pigs, Dairy, and Beef Cattle in Tanzania. Front Microbiol. 6:1240. doi: 10.3389/fmicb.2015.01240.

Kayman T, Abay S, Hızlısoy H. (2013) Identification of *Campylobacter* spp. isolates with phenotypic methods and multiplex polymerase chain reaction and their antibiotic susceptibilities. Mikrobiyol Bul. Apr;47(2):230-9.

Kittl S, Kuhnert P, Hachler H, Korczak BM. Comparison of genotypes and antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from humans and slaughtered chickens in Switzerland. J Appl Microbiol 2011; 110(2):513-520.

Kiuchi A., Hara M., Pham H.S., Takikawa K., Itoh R., Tabuchi K. (2000) Detection and investigation of *Campylobacter jejuni* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. Microbios. 102, 159-164,

Kovanen S, Kivistö R, Llarena AK, Zhang J, Kärkkäinen UM, Tuuminen T, Uksila J, Hakkinen M, Rossi M, Hänninen ML. (2016) Tracing isolates from domestic human *Campylobacter jejuni* infections to chicken slaughter batches and swimming water using whole-genome multilocus sequence typing. Int J Food Microbiol. 2;226:53-60.doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.009. Epub 2016 Mar 20.

Lior H. (1984) New extended biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, '*Campylobacter laridis*'. J. Clin. Microbiol., 20, 636-640,

Magnússon SH, Guðmundsdóttir S, Reynisson E, Rúnarsson AR, Harðardóttir H, Gunnarson E, Georgsson F, Reiersen J, Marteinnsson VT. (2011) Comparison of *Campylobacter jejuni* isolates from human, food, veterinary and environmental sources in Iceland using PFGE, MLST and fla-SVR sequencing. J Appl Microbiol. 111(4):971-981. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05100.x.

Nazik H., Öngen B. (2006) *Campylobacter* suşlarında plasmid kaynaklı kinolon direncinin araştırılması. ANKEM Derg., 20:16, P20, Ek-1.

Nelson, J. M., Chiller, T. M., Powers, J. H., Angulo F. J.: Fluoroquinolone-Resistant *Campylobacter* Species and the Withdrawal of Fluoroquinolones from Use in Poultry: A Public Health Success Story. Clin. Infect. Dis., 44:977–80, (2007)

Nielsen E.M., Engberg J., Fussing V., Petersen L., Brogren C.H., On S.L.W., Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry and cattle. J.Clin.Microbiol.,38 (10):3800-10, (2000).

Nielsen L.N, Sheppard SK, McCarthy ND, Maiden MC, Ingmer H, Krogfelt KA. MLST clustering of *Campylobacter jejuni* isolates from patients with gastroenteritis, reactive arthritis and Guillain-Barré syndrome.J Appl Microbiol.,108(2):591-599. (2010).

Oh E, McMullen L, Jeon B. (2015) High Prevalence of Hyper-Aerotolerant *Campylobacter jejuni* in Retail Poultry with Potential Implication in Human Infection. Front Microbiol. 6:1263. doi: 10.3389/fmicb.2015.01263.

On S.L.W., (2001) Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. J.Appl.Microbiol., 90, 1S-15S,

Oyarzabal O.A., Conner D.E., Hoerr F.J. (1995) Incidence of campylobacters in the intestine of avian species in Alabama. Avian Dis., 39, 147-151,

Öngen, B., Nazik, H., Kaya, I. (2007) rutin dışkı kültürlerinde üretilen campylobacter türleri ve antibiyotik duyarlılıkları: 5 yıllık sonuçların değerlendirilmesi. ANKEM Dergisi. 21(1):37-41.

Oncul O, Zarakolu P, Oncul O, Gur D. (2003) Antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter jejuni*: a comparison between E test and agar dilution method. Diag Microbiol Infect Dis;45: 69–71,

Öngen, B., Nazik, H. (2008) Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance among *Campylobacter* strains.Farmacî and Terapia.25, 3-4:37-39,

Öngen B, Nazik H, Kaya I. (2007) Rutin dışkı kültürlerinde üretilen *Campylobacter* türleri ve antibiyotik duyarlılıkları:5 yıllık sonuçların değerlendirilmesi. ANKEM; 21(1): 37-41.

Özer D., Ergün Ö. (1999). İstanbul piyasasında satışa sunulan çeşitli kanatlı eti ve ürünlerinde *Campylobacter jejuni*’nin varlığı üzerine araştırmalar. İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg., 25 (1), 81-88,

Peterson M. (2003) *Campylobacter jejuni* enteritis associated with consumption of raw milk. J. Environ. Health., 65: 20-21.

Praakle-Amin, K., Roasto, M., Korkeala, H., Hanninen, M. L. (2007) PFGE genotyping and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* in retail poultry meat in Estonia. Int. J. Food Microbiol., 114: 105-112,

Pratt A., Korolik V.: Tetracycline resistance of Australian *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 55: 452–460, (2005).

Quinn P.J., Carter M.E., Markey B., Carter G.R., *Campylobacter* species. In Clinical Veterinary Microbiology ed. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B. and Carter, G.R. pp. 268-272, (1998).

Rapp D, Ross CM, Pleydell EJ, Muirhead RW. (2012) Differences in the fecal concentrations and genetic diversities of *Campylobacter jejuni* populations among individual cows in two dairy herds. Appl Environ Microbiol. 78(21):7564-71. doi: 10.1128/AEM.01783-12.

Rautelin H., Jusufović J., Hanninen M.L. (1999) Identification of hippurat-negative thermophilic campylobacters. Diagn. Microbiol. Infect. Dis.,35, 9-12,.

Ribot E.M., Fitzgerald C., Kubota K., Swaminathan B., Baret T.J. (2001) Rapid pulsed field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. J.Clin.Microbiol.,39 (5), 1889-1894,

Said MM, El-Mohamady H, El-Beih FM, Rockabrand DM, Ismail TF, Monteville MR, Ahmed SF, Klena JD, Salama MS. (2010) Detection of gyrA mutation among clinical isolates of *Campylobacter jejuni* isolated in Egypt by MAMA-PCR. J Infect Dev Ctries. 4(9):546-554.

Savaşan S., Çiftçi A., Diker, K:S. (2004).: Emergence of Quinolone Resistance among Chicken Isolates of *Campylobacter* in Turkey. Turk J Vet Anim Sci.,28: 391-397,

Schallegger G Muri-Klinger S, Brugger K, Lindhardt C, John L, Glatzl M, Wagner M, Stessl B. (2016). Combined *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Rapid Testing and Molecular Epidemiology in Conventional Broiler Flocks. Zoonoses Public Health. Apr 9. doi: 10.1111/zph.12267.

Smibert R.M. (1984). *Campylobacter* genus. In: Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol.1.Ed.N.R.Krieg, J.G.Holt, 1984, Williams and Wilkins.Baltimore pp 111-118.

Smith S.I., Olukoya D.K., Fox A.J., Coker A.O. (2000). Genotyping of clinical and chicken isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Cytobios 103, 91-101.

Sonnevend A1, Rotimi VO, Kolodziejek J, Usmani A, Nowotny N, Pál T. (2006) High level of ciprofloxacin resistance and its molecular background among *Campylobacter jejuni* strains isolated in the United Arab Emirates. J Med Microbiol. 55:1533-1538.

Sproston EL, Ogden ID, MacRae M, Forbes KJ, Dallas JF, Sheppard SK, Cody A, Colles F, Wilson MJ, Strachan NJ. (2010): Multi-locus sequence types of *Campylobacter* carried by flies and slugs acquired from local ruminant faeces. J Appl Microbiol. 109(3):829-838.

Tezcan İ, Ceyhan M, Diker S, Tuncer AM, Dağlı E, Kinik E. (1984). *Campylobacter jejuni* enteriti. Mikrobiyol Bul;18(1): 23-8.

Unicomb I.E., Ferguson, J., Stafford, R.J., Ashbolt, R., et al.(2006): Low-level fluoroquinolone resistance among *Campylobacter jejuni* isolates in Australia. Clin. Infect. Dis., 42:1368-1374.

Wang G, Clark CG, Taylor TM, et al.(2002): Colony Multiplex PCR Assay for Identification and Differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C.fetus* subsp. *fetus*. J Clin Microbiol; 40: 4744–7.

Wardak S, Duda U, Wojśa B. (2009) Molecular investigation of relatedness of *Campylobacter coli* isolated from child with campylobacteriosis and healthy, household dog. Med Dosw Mikrobiol.;61(3):235-41.

Wassenaar T.M., Newell D.G.(2000) Genotyping of *Campylobacter* spp.. Appl. Environ. Microbiol., 66 (1), 1-9.

Wolfs T F W, Duim B, Geelen S P M, Rigter A, Thomson-Carter F, Fleer A, Wagenaar J A.(2001) Neonatal Sepsis by *Campylobacter jejuni*: Genetically Proven Transmission from a Household Puppy. Clin. Infect. Dis., 32 (5):97–99,

Woźniak A., Kuczkowski M., Chrzastek K., Mazurkiewicz M., Wardak S., Szych J., Wieliczko A. (2011) Prevalence of mutation in *gyrA* gene at Thr-86 position in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from poultry and humans. Bull Vet Inst Pulawy 55: 391-395.

Yıldırım M.S., Sümerkan B., Fazlı, Ş.A (1996) Dışkı kültürlerinden izole edilen *Campylobacter* türlerinin antimikrobiyal ajanlara duyarlılıkları. ANKEM Derg., 10(4), 393-398.

Yogasundram K., Shane S.M., Harrington K.S. (1989) Prevalence of *Campylobacter jejuni* in selected domestic and wild birds in Louisiana. Avian Dis., 33, 664-667,

Zirnstien G, Li Y, Swaminathan B, Angulo F. (1999) Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* isolates: detection of *gyrA* resistance mutations by mismatch

amplification mutation assay PCR and DNA sequence analysis. *J Clin Microbiol*, 37: 3276–3280.