

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TAVUK ORJİNLİ TERMOFİLİK *CAMPYLOBACTER*
TÜRLERİNİN BİYOFİLM ÖZELLİKLERİ VE ANTİBİYOTİK
DUYARLILIKLARI**

**Hazırlayan
Özgün ÖZKAN**

**Danışman
Prof. Dr. Fuat AYDIN**

Yüksek Lisans Tezi

**Ocak 2012
KAYSERİ**

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TAVUK ORJİNLİ TERMOFİLİK *CAMPYLOBACTER*
TÜRLERİNİN BİYOFİLM ÖZELLİKLERİ VE ANTİBİYOTİK
DUYARLILIKLARI**

**Hazırlayan
Özgün ÖZKAN**

**Danışman
Prof. Dr. Fuat AYDIN**

Yüksek Lisans Tezi

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından
TSY-103084 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Ocak 2012
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Özgün ÖZKAN

İmza :

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

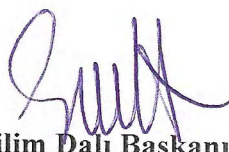
“Tavuk Orjinli Termofilik *Campylobacter* Türlerinin Biyofilm Özellikleri ve Antibiyotik Duyarlılıkları” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.



Tezi Hazırlayan
Özgün ÖZKAN



Danışman
Prof. Dr. Fuat AYDIN



Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Fuat AYDIN

Prof. Dr. Fuat AYDIN danışmanlığında Özgün ÖZKAN tarafından hazırlanan “Tavuk Orjinli Termofilik *Campylobacter* Türlerinin Biyofilm Özellikleri ve Antibiyotik Duyarlılıkları” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

26/04 / 2012

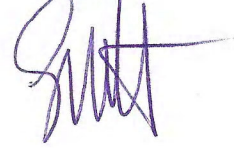
JÜRİ

Danışman : Prof. Dr. Fuat AYDIN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Seçil ABAY

Üye : Yrd. Doç. Dr. Nurhan ERTAŞ

İmza



ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof.Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı gerçekleştirmemde bana yol gösteren ve destek olan Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve danışmanım Sayın Prof. Dr. Fuat AYDIN'a, Sayın Doç. Dr. K. Semih GÜMÜŞSOY'a, çalışmanın tüm aşamalarında değerli katkılarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Seçil ABAY ve Arş. Gör. Harun HIZLISOY'a, yardımlarından dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Nurhan ERTAŞ'a ve her konuda olduğu gibi bu çalışmamda bana destek veren ve güvenen babam Mehmet ÖZKAN'a, annem Huriye ÖZKAN'a, ağabeyim Erdal ÖZKAN'a ve Vet. Hek. N. Özlem ATABAY'a teşekkürlerimi sunarım.

TAVUK ORJİN Lİ TERMOFİLİK CAMPYLOBACTER TÜR LERİNİN BİOFİLM ÖZELLİKLERİ VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARI

Özgün ÖZKAN

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Ocak 2012

Danışman: Prof. Dr. Fuat AYDIN

KISA ÖZET

Bu çalışmada tavuk orjinli termofilik *Campylobacter* türlerinin biyofilm özellikleri ve antibiyotik duyarlılıkları araştırıldı. Araştırma kapsamında termofilik *Campylobacter* türlerinin izolasyonu amacıyla broylerlerden 100 adet barsak, aynı broylerlere ait 100 adet karkas ve yumurtacı tavuklardan 100 adet dışkı örneği incelendi. Örnekler izolasyon amacıyla mCCDA (cefoperazone charcoal desoxycholate agar)'a ekildi. Termofilik *Campylobacter*'lerin identifikasyonunda fenotipik testler ve PZR (Polymerase Chain Reaction)'den yararlanıldı.

İzolasyon sonuçlarına göre broyler barsak örneklerinin % 94'ü, broyler karkas örneklerinin %100'ü, yumurtacı dışkı örneklerinin % 84'ü termofilik *Campylobacter* türleri yönünden pozitif bulundu ve toplam 348 termofilik *Campylobacter* izolatu (337 *C. jejuni* ve 11 adet *C. coli*) elde edildi. Elde edilen *C. jejuni* izolatları içinden rastgele seçilen 60 adet (her bir orijinden 20 adet olmak üzere) izolat, biyofilm oluşturma özelliği yönünden incelendi. Biyofilm özellikleri açısından broyler karkas, broyler barsak ve yumurtacı dışkı örnekleri arasında fark gözlenmedi. İncelenen 60 adet *C.jejuni* izolatının 34 adedi biyofilm oluşturmazken, 25 adedinin zayıf, 1 adedinin ise orta derecede biyofilm oluşturduğu tespit edildi. Biyofilm özellikleri incelenen toplam 60 adet *C. jejuni* izolatının antibiyotik duyarlılıkları E test yöntemi ile belirlendi. Tüm suşların trimetoprim-sulfametoksazol'e dirençli olduğu, gentamisine, duyarlı olduğu saptandı. Sırasıyla eritromisin, metronidazol, enrofloksasin, amoksisilin ve tetrasiklin duyarlılıkları % 96,7, % 45, % 91,7, % 16,7 ve % 53,3 olarak saptandı. Zayıf ve orta derecede biyofilm oluşturan izolatlarla biyofilm oluşturmayan izolatlar arasında antibiyotik duyarlılığı açısından fark gözlenmedi.

Sonuç olarak, termofilik *Campylobacter* türlerinin tavuklardaki yüksek izolasyon oranı kümeslerde ve kesimhanelerde hijyen kurallarına yeterince uyulmadığını düşündürmektedir. *Campylobacter* enfeksiyonlarında sıklıkla kullanılan antibiyotiklerin dirençliliği de göz önünde bulundurulduğunda kanatlı etinin insan sağlığı açısından ciddi bir risk olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik duyarlılık, biofilm, *campylobacter*, tavuk

**BIOFILM FEATURES AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTABILITY OF CHICKEN
ORIGINATED – THERMOPHILIC CAMPYLOBACTER STRAINS**

Özgün ÖZKAN

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Veterinary Microbiology

Master' s Thesis, January 2012

Supervisor: Prof. Dr. Fuat AYDIN

ABSTRACT

In this study, biofilm features and antibiotic susceptibilities of chicken-originated thermophilic *Campylobacter* species were investigated. For the isolation of thermophilic *Campylobacter* species, 100 samples of intestine from broilers, 100 samples of carcass belonging to the same broilers and 100 samples of feces from layer hens were examined. The samples were plated onto mCCD (cefoperazone charcoal desoxycholate) agar for the isolation. In order to identify thermophilic *Campylobacter* spp., phenotypic tests and PCR (polymerase chain reaction) were performed.

According to isolation results, 94% of broiler intestine samples, 100% of broiler carcass samples, 84% of layer hen feces samples were found positive for thermophilic *Campylobacter* species. A total of 348 Thermophilic *Campylobacter* strains (337 *C. jejuni* and 11 *C. coli*) were obtained. 60 *C. jejuni* strains (20 strains from each origin) were randomly selected among *C. jejuni* isolates were examined in terms of biofilm formation feature. No difference was observed on biofilm features among broiler carcass, broiler intestine and layer hen samples. It was detected that while 34 samples of 60 *C. jejuni* isolates did not form biofilm, 25 of them formed it weakly and 1 of them formed it moderately. Antibiotic susceptibilities of 60 samples of *C. jejuni* stains were determined with Test E method. It is monitored that all strains were resistant to sulfametaxazol – trimetoprim and sensitive to gentamicin. Susceptibilities of erythromycin, metronidazole, enrofloxacin, amoxicillin and tetracycline were 96,7%, 45%, 91,7%, 16,7% and 53,3% respectively. No difference for antibiotic susceptibility was observed among isolates that weakly and moderately form biofilm and those that did not form biofilm.

In conclusion, high isolation rates of thermophilic *Campylobacter* species in chicken causes us to think that hygienic measures in coops and slaughterhouses are not fulfilled properly. Having in mind the resilience of antibiotics that are frequently used in *Campylobacter* infections, poultry meat is a serious risk for human health.

Keywords : Antibiotic susceptibility, biofilm, campylobacter, chicken

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
İÇ KAPAK	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
TABLO, ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ.....	xi
KISALTMALAR.....	xii
 1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	 1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.SINIFLANDIRMA	3
2.2.MORFOLOJİK VE FİZYOLOJİK ÖZELLİKLERİ	5
2.3.BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ	6
2.4.ÜREME VE KÜLTÜR ÖZELLİKLERİ	6
2.5.FİZİKSEL VE KİMYASAL ETKENLERE DUYARLILIK	7
2.6.CAMPYLOBACTER ENFEKSİYONLARI	8
2.7.CAMPYLOBACTER ENFEKSİYONLARINDA TANI	9
2.7.1.Mikroskopik İnceleme.....	9
2.7.2.Kültür Ortamında İzolasyon	9
2.7.3.İdentifikasyon	9
2.7.4.Moleküler Tanı Yöntemleri	10
2.7.4.1.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	10
2.8.TERMOFİLİK CAMPYLOBACTERLER.....	11
2.9.BİYOFİLM.....	17
2.9.1.Biyofilm Oluşum Aşamaları	18
2.9.2.Bakterilerin Biyofilm Oluşturma Nedenleri	18
2.10. BİYOFİLM VE ANTİBAKTERİYEL DİRENÇ	20

	<u>Sayfa no</u>
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1.GEREÇ	21
3.2.CAMPYLOBACTER SPP. İZOLASYONU VE İDENTİFİKASYONUNDA KULLANILAN BESİYERLERİ, SUPPLEMENT VE DİĞER KİMYASALLAR	21
3.2.1. Modified Charcoal Cephoperazone Desoxycholate (mCCDA) Besiyeri.....	21
3.2.2. Kanlı Agar Besiyeri	23
3.2.3. Brucella Broth Besiyeri	23
3.2.4. Katalaz Test Ayırıcı.....	24
3.2.5.Oksidaz Test Kiti	24
3.2.6. Hippurat Test Ayırıcı.....	24
3.2.7. Triple Sugar Iron (TSI) Agar Besiyeri	25
3.2.8. Mikroaerobik Ortam Kitleri.....	25
3.3. MULTİPLEKS PZR İŞLEMİNDE KULLANILAN MALZEMELER.....	26
3.3.1. Primer Çiftleri.....	26
3.3.2. TBE solüsyonu.....	26
3.3.3. Ethidium Bromide.....	27
3.3.4. Agaroz jel	27
3.3.5. Standart Suslar	27
3.4. BİYOFİLM AKTİVİTESİ ÖLÇÜMÜ İÇİN KULLANILAN BESİYERLERİ VE MALZEMELER.....	27
3.4.1. Müller-Hinton Buyyon	27
3.5. ANTİBAKTERİYEL DİRENÇ ÖLÇÜMÜ İÇİN KULLANILAN TESTLER	27
3.6. YÖNTEM.....	28
3.6.1.Termofilik <i>campylobacter</i> Türlerinin İzolasyonu	28
3.6.2.Termofilik <i>campylobacter</i> Türlerinin İdentifikasyonu	28
3.6.2.1. Gram Boyama ve Mikroskopik Muayene	28
3.6.2.2. Hareket Testi.....	28
3.6.2.3.Katalaz Testi	28
3.6.2.4.Oksidaz Testi	29
3.6.2.5.Hippurat Hidrolizi	29
3.6.2.6. H ₂ S Olusumu.....	29

	<u>Sayfa no</u>
3.7. <i>CAMPYLOBACTER</i> İZOLATLARININ MUHAFAZASI.....	29
3.8. <i>CAMPYLOBACTER</i> İZOLATLARININ mPZR YÖNTEMİ İLE İDENTİFİKASYONU	29
3.8.1.Genomik DNA'nın Ekstraksiyonu.....	29
3.8.2. İzolatların Multipleks PZR Yöntemi ile Tür Tayinlerinin Yapılması.....	29
3.8. <i>CAMPYLOBACTER</i> TÜRLERİNİN BİYOFİLM OLUŞTURMA YETENEKLERİNİN BELİRLENMESİ	31
3.9. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTİ.....	32
3.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	32
4. BULGULAR.....	33
4.1. İZOLASYON VE İDENTİFİKASYON SONUÇLARI.....	33
4.2. <i>CAMPYLOBACTER</i> TÜRLERİNİN BİYOFİLM AKTİVİTELERİ.....	34
4.3.TERMOFİLİK <i>CAMPYLOBACTER</i> TÜRLERİNİN ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARI	34
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	37
6.KAYNAKLAR	42
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Tip bazında moleküler tanımlamada kullanılan kriterler	11
Tablo 2.2. Termofilik <i>Campylobacter</i> türlerinin biyokimyasal özellikleri	13
Tablo.3.1 Termofilik <i>Campylobacter</i> türlerinin izolasyonunda kullanılan besiyeri ve supplement	21
Tablo 3.2. <i>Campylobacter</i> Blood-Free Selective Agar Base besiyeri içeriği	22
Tablo 3.3. mCCDA selektif supplement içeriği (Oxoid, SR155E).....	22
Tablo 3.4. Blood Agar Base No:2 besiyeri içeriği.....	23
Tablo 3.5. Brucella Broth Besiyeri İçeriği	24
Tablo 3.6. Sodyum Hippurat solüsyonu içeriği	24
Tablo 3.7. Triple Sugar Iron Agar Besiyeri içeriği	25
Tablo 3.8. PZR isleminde Kullanılan Malzeme Listesi	26
Tablo 4.1. İzolasyon ve identifikasyon sonuçları	34
Tablo 4.2. Örnek türlerine göre biyofilm formasyonları	35
Tablo 4.3. Broyler barsak örneklerinde <i>C. jejuni</i> izolatlarının MİK değerleri ve duyarlılık oranları.....	35
Tablo 4.4. Broyler karkas örneklerinde <i>C. jejuni</i> izolatlarının MİK değerleri ve duyarlılık oranları.....	36
Tablo 4.5. Yumurtacı dışkı örneklerinde <i>C. jejuni</i> izolatlarının MİK değerleri ve duyarlılık oranları.....	36
Şekil 2.1. <i>Campylobacter</i> genusu ve filogenetik olarak yakın olan genuslar.....	4
Şekil 4.1. PZR sonuçlarının % 1,5lik agarozdaki görüntüsü.	34

KISALTMALAR

AX:	Amoksisilin
Bp :	Baz çifti
ceuE :	Demir bağlama geni
CDT:	Sitoletal Distending Toksin
CJT :	Campylobacter jejuni toksini
CLT :	Cholera-like toksin
CSA :	Campylobacter Selective Agar
DNA :	Deoksiribonükleik asit
E:	Eritromisin
ENR:	Enrofloksasin
EPS:	Extracelluler polymeric substances - Hücre Dışı Polimerik
Madde	
GBS :	Guillain-Barré Sendromu
GM:	Gentamisin
glyA :	Serine hydroxymethyltransferase
LOS :	Lipooligosakkarit
LPS :	Lipopolisakkarit
mCCDA :	Modifiye Charcoal Cephoperazone Desoxycholate Agar
MET:	Metronidazol
mPCR :	Multipleks PCR
µg :	Mikrogram
µl :	Mikrolitre
µm :	Mikrometre
PZR :	Polymerase Chain Reaction - Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA :	Ribonükleik Asit
rRNA :	Ribozomal Ribonükleik Asit
SXT:	Sulfametoksazol –Trimetoprim
TBE :	Tris-Borik asit – EDTA
TE:	Tetrasiklin
TSI :	Triple Sugar Iron Agar
VBNC :	Viable but nonculturable - Canlı fakat kültüre edilemeyen

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Campylobacteriosis tüm dünyada yaygın olarak görülen zoonotik bir enfeksiyondur. Çeşitli evcil hayvanların gastrointestinal ve genital sistemin normal florasında bulunurlar. Bu hayvanların dışkıları ile kontamine olmuş et, süt ve içme sularının tüketilmesi ile veya kontamine ürünlerle direkt temas sonucu insanlara bulaşabilen bir enfeksiyondur (1, 2).

Özellikle 90'lı yıllardan itibaren gelişmiş ülkelerde *Campylobacter* enfeksiyonlarına *Salmonella* ve *Shigella* enfeksiyonlarından daha sık rastlanmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmalarda gelişmiş ülkelerde *Campylobacter* türlerinin neden olduğu gastroenteritlerin % 90'ından *C. jejuni*, % 5-10'undan da *C. coli*'nin sorumlu bulunduğu bildirilmektedir (3). İnsanlarda ciddi enfeksiyonlarda kullanılan kinolonlar, beta-laktam gurubu antibiyotikler ve makrolidler gibi birçok antibiyotiğe karşı direnç gösteren *Campylobacter* suşlarının giderek arttığı gösterilmiştir (4).

Birçok çalışma insanlarda ve hayvanlarda *Campylobacteriosis*'in en yaygın nedeninin termofilik *Campylobacter*ler olduğunu göstermektedir. Üreme ısılarının kanatlı vücut ısısına uygun olmasından dolayı termofilik *Campylobacter* olarak adlandırılan *C. jejuni*, *C. coli* ve *C. lari*'nin kanatlı barsağına adaptasyonu oldukça fazladır ve normal barsak florasında hastalık oluşturmada bulunurlar. Termofilik türler içerisinde ise bağırsak mukozasında özellikle *C. jejuni* kolonizasyonuna rastlanmaktadır (3, 5, 6).

Üretim aşamasında hem tavuk eti hem de yumurta *Campylobacter* türleri ile kontamine olabilmektedir. Bu sebeple *Campylobacter* kaynaklı gastroenteritlerin en yaygın nedeni tavuk eti olarak bildirilmektedir (7). Kontaminasyonun önlenmesi amacı ile kullanılan dezenfektanlar ve tedavi amacı ile kullanılan antibiyotikler *Campylobacter* türlerinin planktonik formları üzerine etkili olmalarına karşın, etkenin biyofilm formlarına yeterince etkili olamamaktadır (4).

Bu çalışmanın amacı,

- Yumurtacı ve broylerlerden izole edilen termofilik *Campylobacter* türlerinin biyofilm oluşturma özelliklerinin ve antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması,
- Yumurtacı ve broyler örnekleri arasında biyofilm oluşum düzeylerinin karşılaştırması
- Biyofilm ve planktonik formları arasındaki antibiyotik duyarlılık farklılıklarının araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.SINIFLANDIRMA

Campylobacterler'le ilgili ilk sınıflandırma, 1963 yılında yapılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre *Campylobacterler*'in vibriolardan farklı bir tür oldukları ve bu mikroorganizmaların fenotipik özellikleri dikkate alınarak *Spirillaceae* familyası içerisinde *C. fetus* ve *C. bubulus* olarak adlandırılan 2 cins içerisine alındıkları bildirilmiştir. Bu sınıflamadan on yıl sonra biyokimyasal ve immünolojik özellikleri ile G + C içeriğine göre sınıflandırma yeniden düzenlemiş ve daha önce *V. jejuni* ve *V. coli* olarak sınıflandırılan 2 tür de *C. jejuni* ve *C. coli* adı ile *Campylobacter* cinsi içerisine dahil edilmiştir (8).

Bakterilerin son sınıflandırmasında fenotipik özelliklerden çok bakteri DNAsındaki 16S rDNA dizilerinin baz olarak alındığı genotipik yöntemler kullanılmaktadır. *Campylobacterler*, *Campylobacterler*'le ilişkili diğer bakterileri ve isimlendirilemeyen *Campylobacter* benzeri mikroorganizmalar, Vandamme and Ley tarafından, DNA-RNA hibridizasyon yöntemi, 16 S ribozomal RNA sekans analizleri ve immün tiplendirme teknikleri kullanılarak *Proteobacteria* takımı içerisinde "rDNA superfamily VI" adlı yeni bir filogenetik gruba dahil edilmiştir. Aynı araştırmacılar, Superfamily VI içerisindeki bakterileri, gösterdikleri filogenetik heterojeniteye göre, kendi aralarında üç

RNA homoloji gurubuna ayırmışlardır. RNA homoloji I’de gerçek *Campylobacter*ler ve *Bacteroides ureolyticus*, rDNA homoloji II’de *Arcobacter* cinsi, rDNA homoloji III’de *Helicobacter* cinsi ve *Wollinella succinogenes* yer almaktadır. rDNA homoloji grup I ve II içerisindeki bakteriler filogenetik olarak yakın ilişkili olduklarından *Campylobacteraceae* familyası içerisinde yer almaktadır (9).

Son olarak 2007 de yapılan çalışmalarda *Campylobacteraceae* familyasında *Campylobacter*, *Arcobacter* ve *Sulfurospirillum* cinslerinin bulunduğu ve *Campylobacter* cinsine ait 17 tür ve 8 alt tür bulunduğu gösterilmiştir (10). (Şekil 2.1).

Alem: *Bacteria*

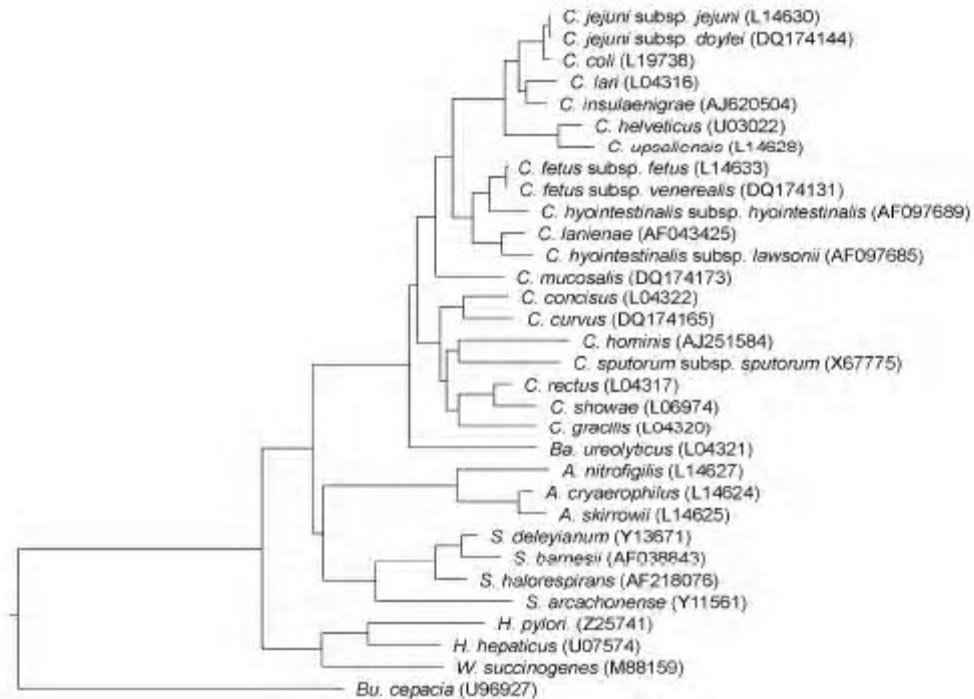
Bölüm: *Proteobacteria*

Sınıf: *Epsilonproteobacteria*

Takım: *Campylobacterales*

Aile: *Campylobacteraceae*

Cins: *Campylobacter*



Şekil 2.1. *Campylobacter* genusu ve filogenetik olarak yakın olan genuslar.(10).

Campylobacter cinsi içinde yer alan türler ve alt türler şunlardır; *C. fetus subsp.fetus*, *C.fetus subsp. venerealis*, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *C. helveticus*, *C. hyointestinalis subsp. hyointestinalis*, *C. hyointestinalis subsp. Lawsonii*, *C. sputorum*, *C. faecalis*, *C. mucosalis*, *C. concisus*, *C. showae*, *C. curvus*, *C. rectus*, *C. gracilis*, *C. hominis*, *C. lanienae* (11)

2.2.MORFOLOJİK VE FİZYOLOJİK ÖZELLİKLERİ

Campylobacter ismi Yunanca “eğik-çubukcuk” anlamına gelen “kampylos” kelimesinden türetilmiştir. *Campylobacterler* Gram negatif, kapsülsüz, sporsuz bakterilerdir. 0,5-5 µm uzunluğunda, 0,2-0,9 µm genişliğinde çomak formundadırlar. Diğer bakterilere oranla daha ince bir yapıya sahip olduklarından 0,65 ve 0,45 µm çapındaki filtrelerden geçebilirler. *Campylobacterler* mono ya da bipolar monotrik flagellaları sayesinde aktif hareketlidirler. Taze preparatlarda faz-kontrast veya karanlık saha mikroskopunda tırbüşon benzeri "cork screw" hızlı hareketleri tipiktir. *Campylobacterler* kıvrımlarının sayısına bağlı olarak mikroskopta S, virgül ya da martı kanadı şeklinde görünürler (11, 12, 13). Katı besiyerinde üretilen yeni kolonilerden hazırlanan preparatlarda spiral veya flemantöz şekil daha belirgin iken, eskimiş kültürde veya yüksek oksijenli ortamda kokoid şekle (Dormand, VBNC-Viable but non-culturable) dönüşebilirler (12, 13). Fimbria veya pilusları yoktur. Aside dirençli olmadıkları için alkalen-metilen mavisi, kristal viyole ve karbol fuksinle iyi boyanırlar. DNA’larının G+C oranı termofilik türlerde % 30-36 diğer türlerde % 29-46’dır (12).

Campylobacterler’in hücre duvarı dışta lipoprotein tabaka, ortada lipopolisakkarit tabaka ve içte mukopeptid tabakadan oluşur ki bu yapı diğer bakterilerde de aynıdır. Fosforile glikolipitlerden oluşan Lipopolisakkarit (LPS) ya da Lipooligosakkarit (LOS) yapı, dış membranda yer alır ve *Campylobacter* türlerinin majör yüzey antijenlerini içerirler. LPS de yer alan ve tekrarlayan oligosakkarit ünitelerinin lineer birleşmesinden oluşan O-polisakkarit zinciri, anomerik konfügurasyonunda ve tekrarlayan şeker ünitelerinde değişiklikler göstererek O-antijenine özgünlüğünü kazandırmaktadır (14). *Campylobacter* enfeksiyonu sırasında bakteriye ait bu antijenik determinantlara karşı gelişen antikor cevabı, sinir hücresi myelin tabakasındaki ganglioizid reseptörlerinin tahribine sebep olur. Böylece, Guillain-Barre sendromu (GBS) ve Miller-Fisher sendromu olarak tanımlanan periferik sinir hücrelerinde myelin kaybına bağlı olarak gelişen nörolojik komplikasyonlar ortaya çıkar (15). Bir diğer önemli yüzey antijeni de

Campylobacterler'in flagellasını oluşturan Flagellin adı verilen proteindir. *Campylobacter* enfeksiyonları sırasında, flagelline karşı intestinal (IgA) ve serum (IgM, IgG) antikorlarının oluştuğu bildirilmektedir (16).

2.3.BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Campylobacter gracilis dışında tüm *Campylobacter* türleri oksidaz pozitifdir. Yine katalaz negatif ya da zayıf katalaz reaksiyonu gösteren *C. upsaliensis* hariç, tüm *Campylobacter* türleri katalaz pozitifdir. *Campylobacterler* jelatini ve üreyi hidroliz etmezler. Lipaz aktiviteleri yoktur. Karbonhidratları kullanamadıkları için Voges Proskauer ve Metil Red testleri negatiftir. Diğer enterik bakterilerin çoğunda olduğu gibi nitratları redükte ederler (12, 17). *Campylobacterler*'in TSI agarda H₂S oluşturma, nitrat redüksiyonu, hippuratın hidrolizi ve ısı tolerans testleri gibi sınırlı sayıdaki fenotipik özellikten yararlanılmaktadır (11).

2.4.ÜREME VE KÜLTÜR ÖZELLİKLERİ

Optimal üreme ısıları 37 °C'dir. *Campylobacter* türlerinin çoğu obligat mikroaerofilik bakteriler olup, üremelerinde %10 CO₂, %5 O₂ ve %85 N₂'a gereksinim duyarlar ve en iyi 48-72 saatte ürerler (11, 17). Optimum üreme şartlarının oluşması açısından atmosferdeki CO₂ miktarı türler arasında farklılık gösterebilir. Ribonükleotid redüktaz enziminin aktivasyonu için, % 5-15 O₂ konsantrasyonunda oksijene ihtiyaç duyan *C.jejuni* ortamdaki yüksek oksijen yoğunluğunda üreyemez. Buna karşılık, *C. fetus*, *C. sputorum* *C. concisus* ve *C. mucosalis* gibi bazı *Campylobacter* türleri, fumarat, aspartat veya nitrat gibi elektron akseptörlerinin varlığında, anaerop ortamda da üreyebilirler (17).

Mikroaerofilik ortam, desikatör içerisine mum yerleştirilmesi, anaerobik jarların havası alınıp yerine % 5 O₂, % 10 CO₂ ve % 85 N₂ gaz karışımlarının verilmesi ya da günümüzde daha çok tercih edilen yöntem olan Campy-Pack, Campy-Gen v.d. gibi ticari olarak üretilen, kullanıma hazır, gaz üreten iyon zarflarının yerleştirilmesi ile sağlanır (12).

Campylobacter genomunun diğer bakterilere oranla daha küçük olması sebebi ile metabolik aktiviteleri, daha yavaş ve seçicidir. *Campylobacterler* güçlü oksidaz aktivitesine sahip olmalarına rağmen 6 -fosfofruktokinaz enzimleri yoktur. Bu sebeple, karbonhidratları oksidatif veya fermentatif yolla metabolize edemezler. Üreme için

gerekli olan enerjiyi trikarboksilik asit siklusundan elde ederler. Siklusa dahil ettikleri karbon ve nitrojeni aminoasitlerden ve atmosferdeki CO₂'den sağlarlar. Karbon metabolizmasının son ürünleri asetat, format ve laktattır (18). Metabolik defekt sebebi ile in vitro şartlarda adi besiyerlerinde üretilmeleri son derece zordur. Üremenin optimizasyonu için besiyerine protein, yağ ve eser element kaynağı olarak % 7-10 oranında defibrine at, koyun veya insan kanı ve B vitamin kompleksleri ve çeşitli supplementler ilave edilmektedir. *Campylobacterler*, 24-48 saat mikroaerofilik atmosferde inkübasyon süresi sonunda, mukoid, saydam, hemoliz yapmayan, birbirine karışma eğilimindeki kolonileri gözle görülür hale gelmektedir. Ancak, nem oranı koloni morfolojisini etkilemektedir. Nem oranı düşük besiyerlerinde 1-2 mm çapında, düzgün, granüler tarzda, gri veya kahverengi renkte, parlak koloniler oluşurken, nem oranı yüksek besiyerlerinde, çapı 10 mm'ye kadar ulaşabilen, basık, yaygın, düzensiz kenarlı ve gri renkte koloniler oluşmaktadır Koloni morfolojileri türler arasında, hatta aynı tür içinde bile farklılık gösterebilir (11, 12).

Campylobacterler normal şartlarda kültüre edilmelerine karşın, olumsuz koşullarda (besin yetersizliği, yüksek ya da düşük sıcaklık derecesi, aerobik ortam, kültürün eskimesi, antibiyotiklerin varlığında), mikroskopta kokoid şekilde görülen canlı fakat kültüre edilemeyen forma dönüşmektedir (19).

2.5.FİZİKSEL VE KİMYASAL ETKENLERE DUYARLILIK

Campylobacterler'in düşük ısıya duyarlı olmalarına rağmen, doğal sularda uzun süre yaşayabilmeleri, bu sulardaki diğer fermentatif mikroorganizmaların ürünü olan format ve maleatı solunumlarında, substrat olarak kullanabilmeleri ile açıklanmıştır. Yüksek ısıya son derece duyarlı olan *Campylobacterler* katı ve sıvı gıdalar içerisinde 60 °C de kısa sürede inaktif hale gelirler. Yine standart şartlarda klorlanan içme suyu ve pastörize edilmiş süt içerisindeki *Campylobacterler* hızla ölürler (20).

Campylobacterler, makrolidler ve kinolon grubu antibakteriyel ajanlara genellikle duyarlı, sefalothin, sefaperazon, sefazolin gibi sefalosporin grubu antibakteriyel ajanlarla trimethoprime karşı dirençlidirler. *C.lari* suşlarında nalidiksik asite de direnç tanı koydurucu olup onun diğer termofilik türlerden ayırt edilmesinde kullanılır (21).

Campylobacter cinsine ait bakteriler çevresel strese duyarlı olsalar da pek çok bakteri gibi kendilerini bu stres faktörlerinin öldürücü ya da gelişmeyi engelleyici etkilerinden korumayı başaracak farklı formlara dönüşebilmektedirler. Bu formların başında VBNC formu gelmektedir. Bu forma dönüşen *Campylobacterler*'in genellikle hücresel morfolojileri de değişmektedir. Etkenlerin soğuk yüzey sularında, VBNC formda aylarca canlı kalabildikleri saptanmıştır (22, 23). *Campylobacterler*'in çevresel etkilerden korunması için en uygun alanlardan birinin de biyofilm yapıları olduğu ve *Campylobacterler*'in oluşturduğu biyofilm yapıların antibiyotik, dezenfektan ve çevresel sıcaklık derecelerine karşı koruyucu özellik gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca *C. jejuni*'nin biyofilm yapılarında da VBNC formda bulunabileceği gösterilmiştir (24).

2.6.CAMPYLOBACTER ENFEKSİYONLARI

Campylobacter türleri normal barsak florasında bulunmakta ve bu hayvanlarda enterik enfeksiyonlar ve genital sistem enfeksiyonlarına neden olmaktadır. *C.jejuni*'nin insanlarda görülen gastroenteritlerin önemli sebeplerinden olduğu belirtilmiştir (25, 26, 27, 28).

C. fetus subsp. fetus, koyunlarda epidemik, sığırlarda sporadik abortuslara, diğer hayvanlarda sporadik enfeksiyonlara neden olurlar. *C.fetus subsp. venerealis*, sadece sığırlarda bulunur ve abortus veya infertilite ile seyreden venereal enfeksiyona neden olur. *C. jejuni*, *C. coli* ve *C. lari*, ortak konaklara sahiptir ve benzer enfeksiyonlar oluştururlar. Çeşitli hayvan türlerinin ve insanların barsaklarına yerleşir, başta gastroenterit ve abortus olmak üzere çeşitli enfeksiyonlara neden olurlar. *C. upsaliensis* ve *C. helveticus*, kedi, köpek ve insanlarda bulunur ve intestinal kökenli enfeksiyonlara neden olurlar. *C. faecalis* sığır ve koyunların dışkılarında bulunurlar. *C. sputorum*, boğa prepusyumunda, insanların ağız boşluğunda, gingiva florasında yer alır ve hastalığa neden olmaz. *C. hyointestinalis subsp. hyointestinalis*, *C. hyointestinalis subsp. Lawsonii*, *C. hyoilei* ve *C. mucosalis*'in primer konağı domuzlardır. *C. concisus*, *C. showae*, *C. curvus* ve *C. rectus* insanların gingival boşluklarında bulunurlar ve periodontal hastalıklara neden olurlar. *C. gracilis* insanların baş boyun ve visseral derin yumuşak dokularında enfeksiyonlara neden olurlar. *C. hominis* ve *C. lanienae* insan barsaklarından izole edilmişlerdir (11).

2.7.CAMPYLOBACTER ENFEKSİYONLARINDA TANI

2.7.1.Mikroskopik İnceleme

Klinik materyal etken yönünden, taze preparatlarda veya boyalı preparatlarda karakteristik hareket veya görünümünün tespiti açısından değerlendirilmelidir. Örnek alındıktan sonra iki saat içinde, karanlık saha veya faz-kontrast mikroskobunda incelenir. Bu incelemede *Campylobacterler*'in tirbuşon tarzında, hızlı tipik hareketlerinin görülmesi tanıya yardım eder.

Gram boyama veya sadece % 1'lik bazik fuksin ile boyanarak soluk pembe renkte, martı kanadı, S veya virgül şeklindeki tipik görünümleri aranır. *Campylobacter* enfeksiyonlarında, direkt mikroskobiye ait yöntemlerin duyarlılığı çeşitli yayınlarda % 66-94 olarak bildirilmektedir (21).

2.7.2.Kültür Ortamında İzolasyon

Besiyerleri, ekim yapıldıktan sonra 37°C'de % 5 O₂, % 10 CO₂ ve % 85 N₂ içeren mikroaerofilik ortamda inkübe edilir. *Campylobacterler* kanlı agarda 24-48 saatlik inkübasyon sonunda, 0,3-0,5 mm çapında, su damlası gibi nemli, gri/beyaz, hemoliz yapmayan tipik kolonileri oluşurlar. Kansız kömür tozu içeren besiyerinde ise; 72-96 saatlik inkübasyon sonunda 0,5 mm çapında, grimsi renkte, bazen metalik refle veren düz yüzeyli ancak yayılma eğilimi gösteren koloniler oluştururlar (21).

2.7.3.İdentifikasyon

Katı besiyerlerinde üretilen şüpheli koloniler koloni morfolojileri, mikroskopik morfolojik özellikleri, oksidaz ve katalaz aktiviteleri, ısı, tuz ve glisin tolerans testleri, antibakteriyel duyarlılıkları ile hippuratı hidrolize edebilme özelliklerini göre identifiye edilirler (29). Hippurat hidroliz testi, *C.jejuni*'yi diğer türlerden ayıran en önemli biyokimyasal testtir. Ancak hippurikaz negatif *C.jejuni* suşlarının gösterilmesi, hippurat hidroliz testinin identifikasyondaki değerini azaltmıştır. Düşük hippürikaz aktivitesinin bu testte belirlenememesi ve ekilen bakteri yoğunluğunun yöntemin duyarlılığını etkilemesi bu testin dezavantajı olarak gösterilmektedir (30).

2.7.4.Moleküler Tanı Yöntemleri

Campylobacter’in tanısında kullanılan klasik identifikasyon yöntemleri, uygulanması zor, pahalı, zaman alıcı, düşük duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğundan son yıllarda klinik örneklerden *Campylobacter* tanısında, daha yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olan Nükleik asit amplifikasyonu bazlı moleküler yöntemler kullanılmaya başlanmıştır. Moleküler tanı yöntemleri ile *Campylobacter* türlerinin genom düzeyinde tanımlanması ve tiplendirilmesinin yanı sıra, patogenez ve antibakteriyel direncinden sorumlu genler ve gen mutasyonlarının tespiti de mümkün olabilmektedir (31,32).

2.7.4.1.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Türler içindeki genetik farklılıkların belirlenmesi, türler arasındaki farklılıkların belirlenmesinden daha zordur. DNA dizisindeki farklılıklar ve mutasyonlar sonucu ortaya çıkan varyasyonlar her zaman fenotipe yansımayabilir. Üstelik aynı yapıdaki genler farklı fenotipik özelliklerin kaynağı da olabilmektedir. Bu nedenlerden dolayı özellikle aynı türün farklı bireyleri arasındaki farklılıklar en kesin ve doğru biçimde moleküler tiplendirme yöntemleri kullanılarak ortaya konulabilmektedir (33).

Gonzalez et al, *C. jejuni* ve *C. coli*’nin ayrımında her iki türde farklı dizilim gösteren ve siderofor taşıma proteinini kodlayan *ceuE* genini kullandıklarını bildirmişlerdir (34). PZR reaksiyonu üç aşamada gerçekleşmektedir. Bunlar sırasıyla; hedef DNA çift zincirinin açılması (denaturation; 94°C’de 30-90 saniye), primerin bağlanması (annealing; 55-60 °C’de 0,5-2 dakika) ve primerin uzaması (extension; 72°C’de 1 dakika) aşamalarıdır. Bu sıcaklık döngüsü 30-35 defa tekrar ettirildikten sonra polimerizasyonun tam olarak gerçekleşmesi için son aşamada 5 dakika daha beklenerek reaksiyon tamamlanır. Bir sonraki kullanımına kadar PZR ürünleri 4-25°C’de bekletilir. Burada her bir döngüden sonra oluşan zincirler yeni döngünün hedef zinciri olarak görev yapmaktadır (35).

Campylobacter türlerinin moleküler tanımlanmasında aşağıdaki bilgilerden faydalanılmaktadır (31).

1. Termofilik *Campylobacter* türlerinin 23S rDNA geni
2. Bu gende 43. ve 69. heliksler arasında yer alan 491bp uzunluğundaki spesifik bölge

3. *Alu* I ve *Tsp* 5091 restriksiyon enzimleriyle kesim sonucu elde edilen DNA fragmentlerinin polimorfizmi

Tip bazında moleküler tanımlamada kullanılan kriterler Tablo 2.1’de her tür için verilmiştir

Tablo 2.1.Tip bazında moleküler tanımlamada kullanılan kriterler (31).

Tip	<i>Alu</i> I	<i>Tsp</i> 5091
<i>C.jejuni</i>	202bp /166 bp/ 124 bp	491 bp
<i>C.coli</i>	290bp/ 202bp	491 bp
<i>C.upseliensis</i>	290 bp/ 202bp	339 bp/126 bp
<i>C.upseliensis var.I</i>	290 bp/115 bp/87 bp	339 bp/126 bp
<i>C.lari</i>	290 bp/115 bp/ 51 bp	177 bp/162 bp/126 bp

2.8.TERMOFİLİK *CAMPYLOBACTERLER*

Termofilik *Campylobacterler* özellikle *C. jejuni* ve *C. coli* türleri, dünyanın pek çok bölgesinde insan ve hayvanlarda ishal ve enteriris vakalarının en sık rastlanan nedenleri arasında yer almaktadır (29, 36, 37).

Termofilik *Campylobacter* türleri (çoğunlukla *C.jejuni* ve *C.coli*) çok özel ekolojik ortamlara adapte olmuş zorunlu mikroaerofilik mikroorganizmalardır. Ticari olarak yetiştirilen ve serbest yaşayan evcil hayvanlar dışında yabani kanatlılar da termofilik *Campylobacter* türleri için doğal konakçılar olarak kabul edilmektedir (26, 38, 39). Kanatlı hayvanlardan en sık izole edilen *Campylobacter* türü ise *C. jejuni*’dir (26, 37, 40). *Campylobacter* türlerinin kanatlı hayvanlarda diğer hayvan türlerine göre daha yaygın bulunmasının başlıca nedenleri arasında kanatlı hayvanların vücut sıcaklığının *Campylobacter* türlerinin optimal üreme sıcaklığı olan 42°C’ye yakın olması yer almaktadır (41, 42). Bu sıcaklık derecesi, aynı zamanda rekabetçi floranın baskılanmasını sağlar (43).

Campylobacter türlerinin kanatlı barsağına adaptasyonunu kolaylaştıran diğer özellikler;

1. Tirbuşon şeklindeki hızlı hareketleri ile oldukça viskoz olan barsak mukozasında hareket edebilirler.
2. Kemotaktik mekanizmaları sayesinde barsak mukozasının bileşiminde bulunan fukoza yönelirler.
3. Mikroaerofilik özellikleri barsakta kolonize olmalarını kolaylaştırır.
4. Gastrointestinal sistemdeki bakterilerle temel besin maddeleri için rekabet edebilmek amacıyla bazı mekanizmalar geliştirmiştir. Örneğin bazı suşlar demir bağlayıcı moleküller olan sideroforları üretirler. Siderofor üretemeyen suşlar ise diğer bakteriler tarafından üretilen sideroforları ortamdan uzaklaştırabilirler (42).

C. jejuni, *C. coli* ve *C. lari* birbirlerine çok yakın ve ortak özelliklere sahiptirler. 0,2-0,3×1,5-2,5 µm boyutlarındadırlar. “S” harfi yada virgül şeklinde olan bakterilerin kıvrımlarının açıklığı 1,1 µm dir. Genom büyüklükleri 1,7 megabazdır. DNA % G+C oranı *C. jejuni*’de 29-32, *C. coli* ve *C. lari* de 31-33 moldür (11). *C.jejuni*, *C. coli* ve *C. lari* gibi insanlarda ishal oluşturan türler hem 37°C’de hem de 42°C’de üreyebilirler ve bu termofilik özellikleri sebebi ile diğer türlerden ayırt edilirler. Termofilik türlerin 35°C altında üremeleri oldukça yavaşlamaktadır. Mesela *C.jejuni* logaritmik üreme fazını 34°C’de 12 saatte, 30-34°C’de ise 48 saatte tamamlamaktadır (44). *C. jejuni*’nin üreyebildiği pH değeri 4,9–9,0 olup, optimum pH değeri 6,5–7,5’tir. *C. jejuni* 0,2-0,9 µm genişliğinde, 0,5-5,0 µm uzunluğundadır. *C. jejuni*’nin flagellalarının uzunluğu etkenin 2-3 katıdır. Etkenler, düşük su aktivitesi (aw) değerlerine ve kurumaya karşı oldukça duyarlı olup, 0,97’nin altındaki aw değerlerinde canlılığını sürdüremez. Benzer şekilde, %2 tuz içeren besiyerlerinde de üreyemediği bildirilmiştir Termofilik *Campylobacter* türleri üremelerinde mikroaerofilik ortama (% 10 CO₂, % 5 O₂ ve % 85 N₂) gereksinim duyarlar (17). *C. jejuni*, ısıya *Salmonella* ve *E. coli* O157:H7 gibi diğer Gram negatif patojenlerden daha hassastır. Ayrıca, kurutma, asitlik, dondurma, tuzlama, ozmotik stres ve basınç, % 5’in üzerindeki O₂ konsantrasyonu ile çeşitli kimyasal madde ve dezenfektanlara duyarlıdır (45, 46).

Koloni morfolojileri ortamın nem oranına göre değişir. 42°C’de 24-48 saat inkübasyon sonunda, nem oranı düşük besiyerlerinde 1-2 mm çapında, yuvarlak ve düzgün kenarlı, granüler tarzda, gri veya kahverengiden kuru gül rengine kadar değişen renkte, şeffaf

“S” tipi koloniler oluştururlar. Nem oranı yüksek besiyerlerinde ise 10 mm’ye kadar ulaşabilen çapta, basık, yaygın, düzensiz kenarlı ve gri renkte koloni oluştururlar. Besiyerinin zeri su dökülmüş görüntüsü alır (swarming koloni). Etkenler kanlı agarda hemoliz oluşturmazlar ancak bazı suşlar kan ile reaksiyona girerek pembe renkli koloniler oluştururlar (11).

Termofilik *Campylobacter* türlerinden sadece *C. jejuni*’nin hippuratı hidrolize ettiği, *C.coli*’nin H₂S retme yeteneğinin zayıf olduğu kaydedilmiştir. *C. jejuni* ve *C. coli* nalidiksik aside duyarlı, sefolotine dirençlidir (17). Termofilik *Campylobacter* türlerini birbirlerinden ayıran başlıca biyokimyasal zellikler Tablo 2.2’de gösterilmiştir.

Tablo 2.2.Termofilik *Campylobacter* türlerinin biyokimyasal zellikleri (43).

Tür Adı	Oksidaz	şeker fermentasyonu	Hidrojen sülfür oluşumu	Hippurat hidrolizi	%1 Glisin	25°C’de reme	37°C’de reme	42°C’de reme	Nalidiksik asit	Sefolotin
<i>C. jejuni</i>	+	-	-	+	+	-	+	+	S	R
<i>C. coli</i>	+	-	-	-	+	-	+	+	S	R
<i>C. lari</i>	+	-	-	-	+	-	+	+	R	R

(S) Sensitive; duyarlı (R) Resistant; dirençli (-); Negatif (+); Pozitif

Campylobacter’ler üreme ihtiyaçları ve ortak fenotipik karakterleri onların mikrobiyolojik tespitini ve identifikasyonlarını oldukça zaman alıcı ve hassas bir işlem haline getirmektedir. Birbirine çok yakın olan bu *Campylobacter* türlerinin biyokimyasal ve serolojik olarak ayırt edilmesi oldukça problemlidir. Bu ayırımı çoğunlukla *C. jejuni*’nin Na-hippuratı hidrolize etmesi esasına dayanır ki, bu da her zaman doğru sonuç vermemektedir (34).

C.jejuni suşlarının üçte ikisinde, hücre duvarında LPS yerine O-polisakkarit zinciri içermeyen, kor-oligosakkarit ve lipid A’dan oluşan ve bu nedenle daha düşük moleküler ağırlığa sahip olduğu bildirilen LOS yapı bulunur. Hem LPS hemde LOS’un yapısında yer alan ve kısa heteroşeker dizilerinden oluşan kor oligosakkaritleri de antijenik

varyasyonlar göstermektedir. Ayrıca, *C.jejuni*'nin bazı suşlarında kor oligosakkaridi, diğer prokaryotlarda bulunmayan, insanda özellikle periferik sinir sisteminde GM1, GM1b, GD1a, GalNAc-GD1a ve GQ1b gibi gangliositlerin yüzeyinde bulunan D-galaktoza bağlı N-asetil nöraminik asit (sialik asit) rezidüleri içermektedir (14).

Campylobacterler'in genomu üzerinde yapılan çalışmalarda, bazı *C.jejuni* suşlarının genomunda, *E.coli*'nin kapsül sentezinden sorumlu gen bölgesi (*kps*) ile benzer nükleotid dizilerinin yer aldığı gösterilmiştir. Bu benzerlik daha önce bilinenin aksine *C.jejuni*'nin kapsüllü olabileceğini düşündürmüştür. Daha sonra yapılan araştırmalarda fosfolipid ve tekrarlayan oligosakkarit ünitelerinden oluşan ve hücre yüzeyine zayıfça bağlanmış *C.jejuni* kapsülünün varlığı gösterilmiştir. Ayrıca *C.jejuni* kapsülünün farklı antijenik determinantlar içerdiği ve hatta daha önce hücre duvarında yer aldığı düşünülen ve Penner yöntemi ile belirlenen LPS yapıdaki ısıya dirençli antijenlerinde *C.jejuni* kapsülünde yer aldığı belirlenmiştir. *Campylobacter* kapsülü antijenik özelliğin dışında bakteri için önemli bir virülans faktörüdür (47).

C. jejuni tarafından üretilen sitotoksinin hücre seçiciliği bakımından farklı özellikler taşıması Shigella benzeri toksinden, CDT'den ve hemolizinlerden farklı olduğu gözlenmiştir. Yapılan bir araştırmada, *C. jejuni*'nin enterotoksin ürettiği ve genetik olarak kolera toksini ile ilişkisinin olmadığı fakat kolera toksinine benzer şekilde sulu ishale sebep olduğu saptanmıştır. Genellikle sitotoksin olarak bilinen ve *E. coli* tarafından üretilen cdt ABC genlerinin *C. jejuni* tarafından da kodlandığı bildirilmiştir (48).

C. jejuni ile konakçı barsak epitel hücreleri arasındaki etkileşim dört aşamada oluşmaktadır: İlk aşamada etken hareketlilik özelliği ile mukus tabakasını geçerek konakçı hücrelerine tutunabilmektedir. Burada adezin reseptör etkileşimleri [(major OMP, lipooligosakkarit, kapsüler oligosakkarit, fibronektin bağlama proteini (CadF), yüzey lipoprotein A (JlpA) ve polyoma antijenik protein (PEB1)] önemli rol oynamaktadır. İkinci aşamada, mikrofilament ve mikrotubuller yardımıyla hareketlilik kazanan *C. jejuni*, hücre içinde çoğalmaya başlamaktadır. Üçüncü aşamada, bakteri tarafından salgılanan DNase özelliğine sahip sitoletal distending toksin (CDT), konakçı hücrelerinin gelişimini inhibe etmektedir. CDT'nin salınım zamanı tam olarak bilinmemekle birlikte, konakçı tarafından alınımı takiben barsaklardan salınmaya

başladığı düşünülmektedir. Son aşamada ise hücreler arası bağlantı sağlayarak diğer hücrelerde de invazyona neden olmaktadır (49).

Termofilik *Campylobacter* türlerinin minimal enfeksiyon dozu, konağın hassasiyetine, çevresel stresin bakteri hücresinde oluşturduğu zarara ve türe bağlı olarak değişmektedir. Gıda enfeksiyonuna neden olan bakterilerin çoğunun aksine *Campylobacteriosis* ortamda oldukça düşük popülasyonda bakteri bulunsa dahi gerçekleşebilmektedir. Termofilik *Campylobacter* türlerinin insanda enfeksiyona sebep olabilmesi için 500 canlı bakteri hücresi bile yeterli gelmektedir. Bu nedenle tavuk eti temel enfeksiyon kaynağı olarak gösterilmektedir. Tavuk etinin yanı sıra çiğ sütün ve klorlanmamış suların da kontaminasyon kaynağı olabileceği bildirilmiştir (36, 50).

Kuluçkudan çıkan civcivlerin tümünün *Campylobacter*'den ari olduğunun ve broylerler kümese girdikten 3 hafta sonra kolonizasyonun hızla arttığı ve kesime gelen broyler cinsi tavuklarda bu oranın % 95'e ulaştığı, bu dönemdeki tavukların dışkılarındaki *C. jejuni* yoğunluğunun ise 10^9 cfu/g'a kadar yükseldiği bildirilmektedir (51). Doğal beslenen ev tipi ve özel çiftliklerde yetiştirilen kümes hayvanlarında kolonizasyonun başlama yaşı ve sıklığı arasında fark gösterilememiş ve kolonizasyonun süresinin konağa ve suşa göre değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (52, 53, 54, 55). Tavuklar koprofajik olduğundan, etkenin dışkı ile çıkışı enfeksiyonun sürüde yayılması açısından önemli bir yer tutmaktadır. Sürüde ilk *Campylobacter* varlığı saptandıktan sonra, etkenin yayılışı çok hızlı olur ve sadece birkaç gün içinde tavukların tümü enfekte olur (56). *Campylobacter*ler'in kolonizasyonunda daha çok horizontal bulaşma üzerinde durulmakta ve altlık, yem, su, önemli bulaşma kaynakları olarak düşünülmektedir (53, 57). Yetiştirme döneminde kümeslerde başlayan bu kontaminasyon tavukların kesimhane girmesinden sonra proses boyunca da devam etmektedir. Tavuk işletmelerinde haşlama, tüy yolma, organ çıkarma, soğutma ve paketleme işlemleri esnasında *Campylobacter* kontaminasyonu olabilmektedir. Özellikle iç organ çıkarma basamağı kontaminasyon riski açısından önemli bir noktadır. İşlem esnasında barsağın kesilmesi veya delinmesi bu riski artırmaktadır. Bu aşamalarda karkas kontamine olabilmekte ve az pişmiş kontamine ürünlerin tüketimi de insanlarda *Campylobacter* enfeksiyonlarının gelişmesine neden olabilmektedir (58). Son yıllarda insan, tavuk karkası, et ya da çevreden izole edilen pek çok *Campylobacter* suşunun tıp ve veteriner

hekimlik alanında kullanılan genel antibiyotiklere dirençli olduğunun gözlenmesi *Campylobacterler*'in insanlar için yarattığı tehlikenin boyutlarını da arttırmaktadır (59).

Kanatlı et işletmelerinde karkas kontaminasyonu sıklıkla haşlama ve soğutma tankından kaynaklandığı da bildirilmektedir. Soğutma ve haşlama tankları ise biyofilm oluşumu için ideal ortamlar olup bu biyofilmlerden sıklıkla *C. jejuni*, *Salmonella* spp., *S. aureus* ve *E. coli* izole edilmektedir. Laboratuvar testleri *Campylobacterler*'in optimum koşullarda paslanmaz çelik ve cam yüzeylerde 2 gün içerisinde biyofilm yapabilme yeteneğinde olduklarını göstermiştir. Biyofilm içerisindeki canlı *C. jejuni* miktarı; bu bakterinin biyofilm oluştururken tekrar VBNC forma dönüşebildiğini ortaya koyan, kültür tekniğinden ziyade direkt canlı sayım tekniği kullanılarak daha iyi belirlenebilmektedir. Biyofilm oluşturarak *C. jejuni*'nin 12-23°C sıcaklık aralığında 7 günlük bir periyot boyunca hayatta kalabilme yeteneğini arttırabildiği bildirilmektedir. *Campylobacterler*'in bulunduğu yüzeyde gıda kalıntısı ya da rutubet olması yaşama şanslarını arttırmaktadır. Odunsu yüzeylerdeki girinti çıkıntılar *C. jejuni* hücrelerini O₂'nin öldürücü etkisinden koruduğu için odun ve benzeri yüzeylerde de oldukça iyi biyofilm oluşturarak hayatta kalabilmektedirler. Biyofilm içerisindeki *Campylobacter* türleri planktonik hallerine göre antibakteriyel maddelere daha çok direnç gösterebilmektedir. Bu nedenle temas ettikleri yüzeyden uzaklaştırılmaları çok kolay olmamaktadır (60). *C.jejuni* çevreye adaptasyonunu sağlayan VBNC formuna, *C.coli*'ye göre de daha hızlı dönüşmekte ve bu formda, yüzey sularında uzun süre bulunabilmektedir. Kültür plağındaki *Campylobacterler*'in tümü VBNC forma dönüştüğünde, pasajlandıklarında üretilmemektedir. Ancak, VBNC formunda alınan *C.jejuni*'nin intestinal fazdan sonra tekrar kültüre edilebilir hale geldiği, adezyon ve enteropatojenite özelliğini yeniden kazandığı, hayvanlar üzerinde deneysel olarak gösterilmiştir (19). VBNC formdaki bakteriler, metabolik aktivitelerini sürdürdüklerinden dolayı, gıda kaynaklı enfeksiyonlarda risk olarak değerlendirilirler. Ancak VBNC forma geçen bakterilerden kaynaklanan, gıda enfeksiyonları bildirilmemiştir (61).

2.9.BİYOFLM

Pek çok mikroorganizma savunma, adezyon ve kolonizasyon oluşturma, yaşanabilir çevre geliştirme ve topluluk oluşturabilme amacıyla biyofilm yapmaktadır. Biyofilm yapan mikroorganizmaların büyük bir çoğunluğu insan ve hayvanlarda ki patojen mikroorganizmalardır. Ayrıca gıdanın yapısındaki su ve içeriğindeki besin maddeleri, optimum pH değeri ve ideal sıcaklık gibi faktörler mikroorganizmalar için en uygun ortamı sağladığından, özellikle gıdalar ve gıda işletmeleri, birçok mikroorganizma için biyofilm geliştirmek için uygundur. Özellikle taze ve işlenmiş, bitkisel gıdalar, et, tavuk, balık, süt ve süt ürünleri gibi hayvansal orijinli gıda işleyen işletmelerde sıklıkla rastlanmaktadır (60).

Bakteriyel hücrelerin dönüşümsüz olarak polisakkarit matriks ve yüzey ile bağlantı kurması ve bu yapıda üreyip gelişmesi sonucu makroskopik olarak opak yapıda, ortalama 100-500 mm yükseklikte koşullara göre değişen boyutlarda, kaygan, pürüzsüz, giderilmesi çok zor olan yapıya biyofilm denir. Matriks içinde kan pıhtısı, kristaller, toprak, metal korozyon artıkları bulunabilir bu nedenle biyofilmin rengi bulunduğu ortama göre değişir. Bakteriler değişik yüzeylere tutunabilirler; bu yüzeyler arasında canlı dokular, doğal deliklerden vücut içi uygulanan medikal cihazlar, endüstriyel ve içilebilir su sistemleri, doğal su sistemleri yer alır (62).

Watnick and Kolter (63), biyofilmi cansız yada canlı bir yüzeye tutunmuş birçok bakterinin salgıladıkları muköz yapı içerisinde bir araya gelmesiyle oluşan, “mikroplar şehri” olarak tanımlamışlardır. Biyofilm; bakteriyel olarak değişime uğramış, yüzeye ya da birbirine tutunarak, matriks ya da hücre dışı polimerik madde (Extracellular polymeric substances-EPS) içine gömülmüş olan planktonik hücrelerden çoğalma, genetik yapı ve protein sentezi açısından tamamen değişik yapıda olan biyolojik bir oluşumdur (62, 63).

Yapılan araştırmalar, biyofilmlerin sadece yüzeye yapışmış durumda bulunan ve içerisinde mikroorganizmaların bulunduğu homojen bir tabakadan ibaret olmadığını, bakterilerin belirli bir yapıya sahip, koordinasyon yeteneği bulunan fonksiyonel toplulukların oluşturduğu biyolojik sistemler olduğunu ortaya koymuştur (64).

Donlan and Costerton biyofilm tanımını daha da genişleterek biyofilmleri aşağıdaki özelliklere sahip bakteri hücrelerinden oluşan hareketsiz bir topluluk olarak tanımlamışlardır:

- 1) Hücreler irreversibl olarak bir substrata, ara yüze veya birbirlerine tutunmuşlardır.
- 2) Hücreler kendi ürettikleri ekstrasellüler polimerik maddelerden oluşan bir matriks içerisinde gömülüdürler.
- 3) Büyüme hızları ve gen transkripsiyonları açısından serbest dolaşan türdeşleri ile aralarında farklılıklar vardır (65).

2.9.1.Biyofilm Oluşum Aşamaları

Biyofilm oluşumu bakterilerin bir yüzeye tutunmaları ile başlayan dinamik bir prosestir. Bu rasgele gerçekleşen bir olay değildir, bakteriler biyofilm oluşturmak için çeşitli quorum sensing mekanizması kullanırlar. Yüzeye tutunan bakterilerin sayısı arttıkça, bu sinyalin lokal konsantrasyonları artmaktadır. Bu sinyal molekülünün konsantrasyonundaki artış ile birlikte, biyofilm oluşumuna yönelik bir dizi işlem başlatılmış olur. İkinci basamak ise bakterilerin yüzeye yapışma veya kuvvetli bir şekilde tutunma işlemidir. Üçüncü evrede ise bakteriler mikrokoloniler haline dönüşürler. Dördüncü evrede ise mikrokoloniler büyürler ve kompleks, mantar şeklindeki yapılara veya kulelere dönüşürler. Çeşitli yüksekliklerde kuleler oluşturan mikrokolonilerin aralarında, besinlerin ulaştırılması ve metabolik atık ürünlerin uzaklaştırılması için primitif bir dolaşım sistemi olarak görev yapan su kanalları bulunmaktadır. Biyofilm gelişiminin beşinci evresi ise kopma veya ayrılma evresidir. Bu evrede tek bir bakteri veya bakteri kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama yayılır. Bu ayrılma işlemi dış kuvvetlerin etkisiyle olabileceği gibi, biyofilm oluşum prosesinin bir parçası olarak tek bir hücrenin veya multipl hücrelerin emboli şeklinde kopmasının bir sonucudur (66).

Biyofilmin en küçük birimi mikro kolonidir. Mikro kolonideki hücrelerin yakınlığının; besin maddesi sentezi, gen değişimi ve Quorum Sensing için ideal ortamı sağladığı belirtilmiştir. Farklı mikroorganizmalardan oluşan mikro kolonilerde ise redoks reaksiyonlarına bağlı olarak, değişik elementlerin (nitrojen, sülfür, karbon, oksijen) alışverişinin görüldüğü bildirilmiştir (67).

2.9.2.Bakterilerin Biyofilm Oluşturma Nedenleri

Bakteriler gerek in vitro gerekse in vivo ortamlarda biyofilm oluşturmak suretiyle bir dizi avantaja sahip olurlar. Biyofilmler bakterileri nem, ısı ve pH değişiklikleri gibi çevresel koşullardaki fluktuasyonların ve ultraviyole ışığa maruz kalmanın doğuracağı

zararlardan korur. Besinlerin depolanmasının ve atıkların uzaklaştırılmasının kolaylaştırılması da biyofilm oluşumunun getirdiği diğer avantajlardır. Bakterilerin kümeler halinde ve ekzopolisakkarid matriks içerisinde bulunmaları sonucu fagosit edilmeleri güçleşir ve humoral immün sistem bileşenlerinin bakterilere ulaşmaları engellenmiş olur (66).

Biyofilmleri oluşturan ekstraselüler polimerler biyofilm çevresindeki besin ve iyon değişimini kontrol etmektedir. Bu değişiklikler bakteriye antibiyotik dirençliliği, biyosid ve immün sistemden korunma yeteneği kazandırmaktadır (68).

Biyofilmin planktonik bakteriden üstünlükleri Donlan (62) tarafından dört madde altında toplanmıştır. Bunlar sırasıyla:

1. EPS çevreden besin maddelerini (C - N - PO₄ gibi) konsantre ederek bakterilerin kullanımına sunar.
2. Biyofilm oluşumunda bulunan bakteriler antibakteriyel maddeler, yüzey gerilimi değiştiren ajanlar, sıcaklık, konakçıya ait fagositler, konakçı oksijen radikalleri, proteazlar gibi çeşitli koşullara ve maddelere karşı dirençlilik geliştirirler. Bu direnç, gelişimin durdurulup canlılığın korunmasından, genetik düzenleme ile yukarı ya da aşağıya doğru düzenleme ile modifikasyona kadar değişen reaksiyonlar halinde gözlemlenir.
3. Tabakalı dizilim sonucu yüzeyde bulunan çeşitli bakteriler mekanik kalkan etkilerinin yanısıra; katalaz, peroksidaz, proteaz ve lipaz inhibitörleri salgılayarak antibakteriyellere karşı iç yüzeyde bulunan bakterileri korurlar.
4. Biyofilm parçaları koparak yeni yüzeylere yayılır. Planktonik bir hücrenin tutunmasından daha kolay bir tutunma gerçekleştirirler.

Hücrelerin bireysel olarak yaşamak yerine neden biyofilm oluşturdıkları ile ilgili öne sürülen bu mekanizmalar arasında en ön planda çevrenin zararlı etkilerinden korunmak, besin elde etme ve metabolik işbirliği, yeni genetik özelliklerin kazanılması yer alır. EPS matriksinin bir iyon değiştiricisi gibi davranarak çeşitli ajanların biyofilm içerisine girişlerini engellediği bilinmektedir. Ayrıca UV ışıma, pH değişiklikleri, osmotik şok ve kuruma gibi çevresel streslerin zararlı etkilerinden korumada rol oynar. Biyofilm içerisindeki bulunan su kanalları hem besinlerin biyofilm içerisinde eşit bir şekilde dağıtılması, hem de potansiyel olarak toksik metabolitlerin uzaklaştırılması görevini

üstlenir. Horizontal gen transferi doğal bakteriyel toplulukların evrimi ve genetik çeşitliliği için çok önemlidir. Bu durum özellikle çoklu ilaca direnç gösteren bakterilerin ortaya çıkmasında önemlidir. Özellikle biyofilm içerisindeki kapalı ortam konjugasyonun kolaylıkla yapılabilmesine imkan tanır (64).

2.10. BİYOFİLM VE ANTİBAKTERİYEL DİRENÇ

Antibiyotikler bakteri hücre duvarı sentezinin inhibe edilmesi, hücre membranının permabilitesinin arttırılması, ribozomal protein sentezinin bozulması ve ara metabolizmanın bozulması yolları ile etki gösterirler (69). Direnç mikroorganizmanın antibakteriyel ajanın üremeyi durdurucu veya öldürücü etkisinden korunabilme yeteneğidir. Minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerinin dünya standartlarında (CLSI gibi) belirtilen MİK değerinden daha yüksek olması antibakteriyel direnç olarak tanımlanır (70). Bakterilerin antibiyotik direncinin mekanizmaları; dışarı atım pompaları (effluxpumps), enzim modifikasyonları, belli hedeflerin mutasyonlarıdır (target mutations). Ancak bu mekanizmaların biyofilm bakterilerinde işe yaramadığı ortaya konmuştur. *Klebsiella pneumoniae*'ya ait Beta-laktamaz negatif suşun planktonik halinin 2 mg/ml ampicilin bulunan sıvı ortamda inhibe olduğu, aynı planktonik bakterinin biyofilm geliştirdikten sonra inhibisyonu için 5000 mg/ml ampicilin gerektiği ve bu miktarın planktonik hücrelerin yaklaşık % 66'sının inhibisyonuna yeterli olduğu bildirilmiştir (71).

Biyofilmlerin antibakteriyel ilaçlara direnci birden fazla mekanizmayla açıklanmaktadır.

1. Biyofilm matriksi içerisindeki polimerik maddeler antibiyotik difüzyonunu güçleştirmektedir. Bu durum yeterli antibiyotik konsantrasyonuna ulaşamaması ile sonuçlanmaktadır.
2. Biyofilm içerisindeki hücrelerden en azından bir kısmı besin yetersizliği yaşamakta ve bu nedenle yavaş büyüme fazına girmek zorunda kalmaktadırlar.
3. Yavaş büyüyen veya büyüme göstermeyen hücreler birçok antibakteriyel maddeye karşı duyarlı değildirler ve birçoğu hayatta kalabilmektedirler.
4. Biyofilm içerisindeki bakteriler arasında direnç gösteren genlerin değişimi söz konusudur (72).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.GEREÇ

Çalışmamızda 2011 yılı Mayıs-Ağustos aylarında Kayseri ilindeki farklı kümes ve kesimhanelerden alınan toplam 300 örnek kullanıldı.

3.2.CAMPYLOBACTER SPP. İZOLASYONU VE İDENTİFİKASYONUNDA KULLANILAN BESİYERLERİ, SUPPLEMENT VE DİĞER KİMYASALLAR

3.2.1. Modified Charcoal Cephoperazone Desoxycholate (mCCDA) Besiyeri

Tablo.3.1 Termofilik *Campylobacter* türlerinin izolasyonunda kullanılan besiyeri ve supplement

Besiyeri	Supplement
mCCDA Besiyeri Campylobacter Blood-Free Selective Agar Base (Oxoid CM739)	Charcoal Desoxycholate (CCD) Agar Selective Supplement (Oxoid SR155E) Cephoperazone 8 mg/l Amphotericin 10 mg/l

Kültür tekniginde selektif katı besiyeri olarak kullanılmak üzere, *Campylobacter* Blood-Free Selective Agar Base (Oxoid CM 739) hazır besiyerinden 22,75 g tartıldı ve 500 ml distile su içerisinde çözdürüldü. pH değeri $7,4 \pm 0,2$ 'ye ayarlandıktan sonra sıcak su banyosunda eritildi. 121°C 'de 15 dakika otoklavda sterilizasyonu sağlandıktan sonra 50°C 'ye kadar soğutuldu ve üzerine 2 ml steril distile su ile süspanse edilmiş Charcoal Cephoperazone Desoxycholate (CCDA) Selective Supplementten eklendi.

Tablo 3.2. *Campylobacter* Blood-Free Selective Agar Base besiyeri içeriği

İçerik	Miktar (g/l)
Nutrient Broth No:2	25,0
Bakteriyolojik kömür	4,0
Kasein hidrolizat	3,0
Sodyum desoksikolat	1,0
Ferros Sülfat	0,25
Sodyum piruvat	0,25
Agar	12,0
Distile Su	1000 ml

Tablo 3.3. mCCDA selektif supplement içeriği (Oxoid, SR155E)

İçerik	Miktar (mg/vial)
Cephoperazone	16mg/vial
Amphotericin B	5mg/vial

3.2.2. Kanlı Agar Besiyeri

Blood Agar Base No:2 (Oxoid CM 271 B) hazır besiyerinden 40 g tartıldı ve 1 lt distile su içerisinde çözdürüldü. pH değeri $7,4\pm0,2$ 'ye ayarlandıktan sonra sıcak su banyosunda eritildi. 121°C 'de 15 dakika otoklavda sterilizasyonu sağlandıktan sonra 50°C 'ye kadar sogutuldu ve üzerine % 7 steril koyun kanı eklendi. Besiyeri her biri 20 ml olacak şekilde steril petrilere döküldü ve donmaya bırakıldı. Kullanılincaya kadar 4°C 'de muhafaza edildi.

Tablo 3.4. Blood Agar Base No:2 besiyeri içeriği

İçerik	Miktar (g/l)
Proteose peptone	15,0
Liver digest	2,5
Yeast extract	5,0
Sodium chloride	5,0
Agar	12,0
Distile Su	1000 ml

3.2.3. Brucella Broth Besiyeri

Elde edilen izolatların PZR ile identifikasyonu yapılana kadar uygun şartlarda saklanması için Brucella Broth hazırlandı. Brucella Broth Base (Sigma B 3051) hazır besiyerinden 4,215 g alınarak 150 ml distile su içinde çözdürüldü ve üzerine %10 gliserin ilave edildi. 121°C 'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi ve sogumasını takiben buzdolabına kaldırılarak kullanılincaya kadar saklandı.

Tablo 3.5. Brucella Broth Besiyeri İçeriği

İçerik	Miktar (g/l)
Casein Enzymic Hydrolysate	10,0
Peptik Digest of Animal Tissue	10,0
Dekstroz	1,0
Maya özütü	2,0
Sodyum klorid	5,0
Sodyum bisülfid	0,1
Distile Su	1000 ml

3.2.4. Katalaz Test Ayıracı

% 30'luk 2 ml hidrojen peroksit (H_2O_2) (Merck 107209), 27 ml distile suda karıştırılarak testte kullanılmak üzere % 3'lük H_2O_2 solüsyonu hazırlandı.

3.2.5. Oksidaz Test Kiti

Ticari Oxydase test kitleri (Oxoid BR 64) kullanıldı.

3.2.6. Hippurat Test Ayıracı

PBS (Phosphate Buffered Saline) içinde hazırlanan %1'lik sodyum hippurat solüsyonu filtrasyon yöntemi ile sterilize edildi. Steril tüplere paylaştırılarak $-20^{\circ}C$ 'de muhafaza edildi. 3,5 g ninhidrin, 50 ml aseton ve 50 ml bütanol kullanılarak hazırlanan % 3,5 ninhidrin solüsyonu ise taze olarak kullanıldı.

Tablo 3.6. Sodyum Hippurat solüsyonu içeriği

İçerik	Miktar(g/l)
Sodyum hippurat	10
PBS (Phosphate Buffered Saline)	
Sodyum klorit	8,5
Disodyum hidrojen fosfat dihidrat	8,98
Sodyum dihidrojen fosfat monohidrat	2,71
Distile su	1000 ml

3.2.7. Triple Sugar Iron (TSI) Agar Besiyeri

H₂S olusum testinde kullanmak üzere hazırlandı. Triple Sugar Iron (TSI) Agar hazır besiyerinden (Oxoid CM 277) 65 g alınarak 1 lt distile su içerisinde çözündürüldü ve pH değeri 7,4±0,2'ye ayarlandı. Su banyosunda kaynatılarak eritildikten sonra sıvı halde iken tüplere 10 ml olacak şekilde dağıtıldı. 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra yatık agar şeklinde hazırlandı ve 4 °C'de muhafaza edildi.

Tablo 3.7. Triple Sugar Iron Agar Besiyeri içeriği

İçerik	Miktar (g/l)
Peptone from casein	15,0
Peptone from meat	5,0
Et ekstraktı	3,0
Maya özütü	3,0
Sodyum klorid	5,0
Laktoz	10,0
Sukroz	10,0
D (+) glukoz	1,0
Amonyum demir (III) sitrat	0,5
Sodyum tiyosülfat	0,5
Fenol kırmızısı	0,024
Agar-agar	12,0
Distile Su	1000 ml

3.2.8. Mikroaerofilik Ortam Kitleri

Anaerobik jarlar (Merck, M116387.0001) ve içinde mikroaerofilik ortam sağlayan ticari gaz kitleri (Anaerocult C, Merck M116275.0001) kullanıldı.

3.3. MULTİPLEKS PZR İŞLEMİNDE KULLANILAN MALZEMELER

PZR işleminde kullanılan malzemeler aşağıda listelenmiştir.

Tablo 3.8. PZR işleminde Kullanılan Malzeme Listesi

Malzeme	Miktar
Taq DNA polymerase (Dr.Zeydanlı, DZTQ-5)	500 U
PZR Buffer (Dr.Zeydanlı, DZPBS10-05)	10X
MgCl ₂ (Merck, 105833)	25 mM
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Dr.Zeydanlı, DZ010-S)	10 mM

3.3.1. Primer Çiftleri

Campylobacter jejuni için; 323 baz çifti (bp) büyüklüğünde DNA bandı veren, *C. jejuni* *hipO* gen primeri kullanıldı. (Alpha DNA, Montreal, Kanada)

Primer-I (CJF) : 5' - ACT TCT TTA TTG CTT GCT GC - 3'

Primer-II (CJR) : 5' - GCC ACA ACA AGT AAA GAA GC - 3'

Campylobacter coli için; 126 baz çifti büyüklüğünde DNA bandı veren, *C. coli* *glyA* gen primeri kullanıldı. (Alpha DNA, Montreal, Kanada)

Primer-I (CCF) : 5' - GTAAAACCAAAGCTTATCGTG -3'

Primer-II (CCR) : 5' - TCCAGCAATGTGTGCAATG -3'

Campylobacter lari için; 251 baz çifti büyüklüğünde DNA bandı veren, *C. lari* *glyA* gen primeri kullanıldı. (Alpha DNA, Montreal, Kanada)

Primer-I (CLF) : 5' - TAGAGAGATAGCAAAAGAGA -3'

Primer-II (CLR) : 5' - TACACATAATAATCCCACCC -3' (73).

3.3.2. TBE solüsyonu

Tris-Borik Asit-EDTA hazır stok solüsyonu (Dr.Zeydanlı, DZTBE10-1) olarak temin edilen 10X (TBE) 1 lt'lik tampon çözelti olarak kullanılmıştır.

3.3.3. Ethidium Bromide

Ethidium Bromid stok solüsyon (Dr.Zeydanlı, DZEB-10) 10 µg/ml olarak temin edilmiş ve 1:9 oranında sulandırılarak 1 µg/ml konsantrasyonda kullanılmıştır.

3.3.4. Agaroz jel

% 1,5'luk agaroz jel için, 4,5 g agaroz (HyAgarose LE, Vivantis) ve 300 ml 1X TBE eklenerek mikrodalga fırında 90 saniyede eritilmiştir. Yaklaşık 50°C'ye soğutulduktan sonra içerisine 18 µl Ethidium Bromide eklenmiş ve katılaşmaya bırakılmıştır.

3.3.5. Standart Suslar

Bu çalışmada, termofilik *Campylobacter* türlerinin izolasyon, identifikasyon ve PZR işlemleri aşamasında *C. jejuni* NCTC 11168, *C. coli* DCC2 ve *C. lari* DCC4 referans susları kullanılmıştır.

3.4. BİYOFİLM AKTİVİTESİ ÖLÇÜMÜ İÇİN KULLANILAN BESİYERLERİ VE MALZEMELER

3.4.1. Müller-Hinton Buyyon

Dehidre besiyeri (Merck 1.10293) 21,0 g/l olacak şekilde distile su içinde eritildi ve tüplere dağıtılıp, otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi.

İçerik	Miktar (g/l)
Meat infusion	2,0
Casein hydrolysate	17,5
Starch	1,5

3.5. ANTİBAKTERİYEL DİRENÇ ÖLÇÜMÜ İÇİN KULLANILAN TESTLER

Campylobacter izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları E test yöntemi ile belirlendi. E-test katı besi yerinde difüzyon yoluyla MİK değerinin saptanması prensibine dayanan kantitatif bir yöntemdir. Antibiyotik içeren plastik stripler agar ortamına yerleştirildiğinde içerdikleri antibiyotik ortama difüze olur.

Çalışma kapsamında gentamisin, tetrasiklin, metronidazol, enrofloksasin, amoksisilin, eritromisin, trimetoprim+sulfametaksasol antibiyotik diskleri kullanıldı (AB Biodisk, bioMérieux).

3.6. YÖNTEM

Farklı kümeslerden alınan (broyler tavuklardan 100 adet barsak, aynı broylerlere ait 100 adet karkas ve yumurtacı tavuklardan 100 adet dışkı örneği) numuneler soğuk zincirde laboratuvara getirildi.

3.6.1. Termofilik *Campylobacter* Türlerinin İzolasyonu

Alınan numunelerden direkt *Campylobacter* selektif supplement ilave edilmiş CCD agara ekimler yapıldı. Mikroaerofilik ortamda 37°C’de 48–72 saat inkubasyonu takiben besiyerinde üreyen *Campylobacter* süpheli koloniler öncelikle koloni morfolojisi, rengi ve kıvamı açısından değerlendirildi. Tipik *Campylobacter* kolonileri kanlı agarda saflaştırıldıktan sonra Gram boyama, hareket muayenesi ve biyokimyasal testler yapıldı.

3.6.2. Termofilik *Campylobacter* Türlerinin İdentifikasyonu

3.6.2.1. Gram Boyama ve Mikroskopik Muayene

CCD agarda üreyen kolonilerinden bir öze dolusu alınarak, Gram boyama işlemi gerçekleştirildi. Mikroskopta (YS2-H Nikon, Japonya) incelenen Gram negatif, kıvrık spiral veya martı kanadı görünümündeki mikroorganizmalar *Campylobacter* spp. Olarak değerlendirildi (74).

3.6.2.2. Hareket Testi

CCD agarda üreyen kolonilerden bir öze ile alınarak lam üzerine konuldu ve faz kontrast mikroskopunda hareketlilik ve morfolojik açıdan incelendi. Helezon sekilli, kıvrık ve hızlı hareket pozitif olarak değerlendirilmiştir (74).

3.6.2.3. Katalaz Testi

Taze üremeden bir öze dolusu alınarak lam üzerinde bir damla % 3’lük H₂O₂ içinde süspanse edildi. Gaz kabarcıklarının oluşması pozitif reaksiyon olarak kabul edildi. (74).

3.6.2.4.Oksidaz Testi

Taze kültürden alınan bir öze dolusu koloni bactident oxidase kağıt şeridi üzerine sürüldü. Şeritte mor rengin oluşması pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi (74).

3.6.2.5.Hippurat Hidrolizi

Taze *Campylobacter* kültüründen bir öze dolusu alınarak 0,4 ml'lik sodyum hippurat solüsyon içinde süspanse edildi ve 37°C'lik su banyosunda 2 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda 0,2 ml % 3,5 ninhidrin solüsyonu eklendi. 37°C de 10 dakika inkübasyon sonunda üstte koyu mor renk halka oluşumu pozitif olarak değerlendirildi (74).

3.6.2.6. H₂S Olusumu

Test için kanlı agardan alınan izolatlar, yatık TSI agara inoküle edilerek 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda besiyerinde renk degisiminin olmaması *Campylobacter* spp. pozitif olarak degerlendirildi (74).

3.7. *CAMPYLOBACTER* İZOLATLARININ MUHAFAZASI

Elde edilen izolatlar moleküler identifikasyonları yapılana kadar % 10 gliserol içeren, Brucella broth besiyerinden hazırlanan cryotüpler içerisinde – 85 °C'de (Sanyo MDF-U5186S) dondurularak saklandılar (74).

3.8. *CAMPYLOBACTER* İZOLATLARININ mPZR YÖNTEMİ İLE İDENTİFİKASYONU

3.8.1.Genomik DNA'nın Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu amacıyla araştırmacılar tarafından daha önce birçok kez kullanılan direkt kaynatma metodu kullanılmıştır. Bu amaçla izolatlar, 200'er µl steril distile su içinde homojenize edildikten sonra 15 dakika su içinde kaynatma işlemine tabi tutuldu.

Kaynatılan örnekler 15000 rpm'de 10 dakika santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5430 R) edilerek DNA ekstraksiyonu sağlandı. Üstteki süpernatant template DNA kullanılmak üzere baska ependorf tüpe alındı. DNA'lar mPZR islemi yapılana kadar -20°C'de muhafaza edildi (75).

3.8.2. İzolatların Multipleks PZR yöntemi ile Tür Tayinlerinin Yapılması

Amplifikasyon 2,5 µl hedef DNA, 5 µl 10x PZR buffer, 1.25U *Taq* polymerase, 0,2 mM dNTP, karışımı, 2 mM MgCl₂, 0,5 uM *C.jejuni* ve *C.coli* primer çifti ve 1 uM *C.lari*

primer çifti içeren toplam 25 µl hacimde hazırlanan PZR karışımında gerçekleştirildi. DNA amplifikasyonu 95°C'de 6 dk ön denatürasyon ve 30 siklus, 95°C'de 30 sn, 59°C'de 30 sn 72°C'de 30 sn ve son olarakta 72°C'de 7dk olacak şekilde uygulandı.

Amplifikasyon işlemi sonrasında hedeflenen bölgeyi temsil eden büyüklükteki ampikonların varlığını gösterebilmek amacı ile ampikonlar elektrikli ortamda agaroz jel içerisinde migrasyonel seperasyona tabi tutuldu. Bu işlem aşağıdaki şekilde yapıldı;

1. Elektroforez matriksi olarak kullanılmak üzere % 1,5'lik agaroz jel 0,5xTBE solüsyonu ile hazırlandı.
2. Daha iyi homejenizasyon sağlamak amacıyla karışım iki ayrı balonda hazırlandı. İki ayrı balon içerisine tartılarak konulan 2,25'şer gr agaroz üzerine 150'şer ml 0,5xTBE ilave edildi.
3. Karışımlar homojenizasyon sağlanana kadar mikrodalga fırında eritildi.
4. Oda ısısında 60°C'nin altına düşmeyecek şekilde bekletilerek soğutuldu.
5. Eriyik haldeki her 2 agaroz içerisine stok solüsyondan 9'ar µl ethidium bromide (50 ml buffere 3 µl) eklendi.
6. Hazırlanan %1,5'lik agaroz jel, tarakları yerleştirilmiş jel kalıbının üzerine yavaşça döküldü.
7. Oda sıcaklığında 20-30 dakika bekletilerek jel kalıbının katılaşması sağlandı.
8. Taraklar yavaşça çıkarılarak, jel kalıbı elektroforez tankına yerleştirildi. Üzerine 0,5xTBE ilave edildi.
9. DNA örneklerinden 5'er µl alınarak parafilm üzerinde 1'er µl loading dye solution ile karıştırıldı. 2. kuyudan itibaren açılan her kuyuya bu karışımlar konuldu. İlk ve son kuyulara 10 µl DNA ladder yüklendi.
10. 100 watt, 500 amperde 1,5 saat koşturuldu.
11. Jel görüntüleme sistemi ile UV ışığı altında incelendi.

3.9. *CAMPYLOBACTER* TÜRLERİNİN BİYOFİLM OLUŞTURMA YETENEKLERİNİN BELİRLENMESİ

Elde edilen *C. Jejuni* izolatları biyofilm oluşturma özelliği yönünden incelenmesinde Teh'in (76) bildirdiği yöntem kullanıldı.

Bu yönteme göre

- *C. jejuni* izolatları Mueller-Hinton buyyon içerisinde 42°C de bir gecelik inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrası elde edilen sıvı kültürden 1ml alınarak 5ml Mueller Hinton buyyon içerisine inoküle edildi.
- Hazırlanan bu inokulumdan her bir örnek için 96'lık polisteren mikropleytlerin 24 kuyucuğuna 200'er µl konuldu. Aynı zamanda her örnek için 12 kuyucuğa herhangi bir inokulasyon yapılmamış Mueller-Hinton buyyondan 200'er µl konuldu.
- Bu mikropleytler jar içerisinde (anaerocult C) mikroaerofilik ortamda 37 °C ye ayarlanmış su banyosu içerisinde 72 saat hafif çalkalamalı olarak (30 rpm) inkübasyona bırakıldı. İlk 48 saat sonrası jar içerisindeki mikroaerofilik kit yenilendi.

İnkübasyon sonrası pleytlerde oluşan biyofilm formasyonunun okunması amacıyla mikropleytler sırasıyla aşağıdaki işlemlere tabi tutuldu.

1. Pleytlerdeki içerik boşaltıldı ve distile su ile 3 kere elle yıkandı.
2. 42°C de 30 dakika kurutma işlemi uygulandı.
3. Her bir örnek için 3 tane 12 kuyucuk kullanıldığında ilk 24 inokulasyon yapılmış Mueller Hinton buyyon içeren kuyucukların ilk 12 sine ve inokulasyon olmayan kuyucuklara % 0,5 kristal viyole solusyonundan 200'er µl konuldu ve 15 dakika oda ısısında boyandı.
4. Kristal viyole döküldü pleytler 3 kere steril distile su ile yıkandı.
5. 30 dakika 42°C'de kurutuldu. Pleytlerin her bir kuyucuğuna % 98'lik etil alkolden 200'er µl konuldu. Kuyucukların OD (optik dansite) si 595 nm de ölçüldü.
6. Bu işlemlerden sonra biyofilm formasyonunun hesaplanması için $BFI = (AB - CW)/G$ formülü kullanıldı.

BFI: Biyofilm formasyon indeksi

AB: Bakteri bulunan ve boyanan kuyucukların optikal dansitesi

CW: Bakteri bulunmayan ve boyanan kuyucukların optikal dansitesi

7. Biyofilm formasyonu Naves at al (77) çalışmalarındaki skalaya göre değerlendirildi.

Güçlü (G): $\geq 1,10$

Orta (O): 0,70-1,09

Zayıf (Z): 0,35-0,69

Negatif (N): $< 0,35$

3.10. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTİ

Campylobacter izolatları içerisinde seçilen 60 adet *C. jejuni* suşunun antibiyotik duyarlılıkları E test yöntemi ile belirlendi. *Campylobacter* suşları 0,5 McFarland yoğunluğuna getirilerek Mueller Hinton agar yüzeyine eküvyonla yayıldı. Agar yüzeyine E-test şeritleri yerleştirildi. 37° C de 48 saat mikroaerofilik ortamda inkübe edildi. Şerit etrafında oluşan inhibisyon elipsinin şerit üzerindeki ölçekle kesiştiği nokta MİK değeri olarak değerlendirildi. Duyarlılık ve dirençlilik sınırları NCCLS kriterlerine göre belirlenmiştir (78).

3.11. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Çalışmada istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences for Windows 13.0) programı kullanıldı. Niteliksel veriler Ki-kare (χ^2) testi ile değerlendirilmiştir. BFI, Microsoft Excel programı kullanılarak hesaplanmıştır.

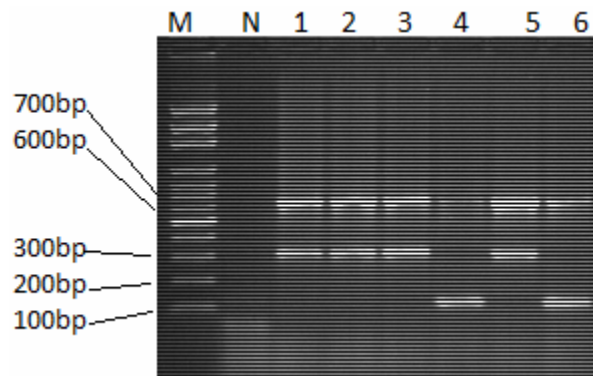
4. BULGULAR

4.1. İZOLASYON VE İDENTİFİKASYON SONUÇLARI

Araştırma kapsamında termofilik *Campylobacter* türlerinin izolasyonu amacıyla broylerlerden 100 adet barsak, aynı broylerlere ait 100 adet karkas ve yumurtacı tavuklardan 100 adet dışkı örneği incelendi. Yapılan izolasyon sonuçlarına göre broyler barsak örneklerinin % 94'ü, broyler karkas örneklerinin % 100'ü, yumurtacı dışkı örneklerinin % 84'ü termofilik *Campylobacter* türleri yönünden pozitif bulundu. Pozitif 94 broyler barsak örneğinden 123, pozitif 100 broyler karkas örneğinden 114 ve pozitif 84 yumurtacı dışkı örneğinden 111 *Campylobacter* spp izolatı olmak üzere toplam 348 izolat elde edildi. PZR sonuçlarına göre broyler barsak örneğinden elde edilen 123 *Campylobacter* spp izolatının 121 adedi *C. jejuni*, 2 adedi *C. coli*, broyler karkas örneğinden elde edilen 114 *Campylobacter* spp izolatının tamamı *C. jejuni* ve yumurtacı dışkı örneğinden elde edilen 111 *Campylobacter* spp izolatının 102 adedi *C. jejuni*, 9 adedi *C. coli* olarak tespit edildi (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. İzolasyon ve identifikasyon sonuçları

Örnek Türü	Örnek Sayısı	<i>Campylobacter</i> pozitif örnek Sayısı (%)	Toplam İzolat Sayısı	Tür Dağılımı	
				<i>C. jejuni</i> (%)	<i>C. coli</i> (%)
Broyler Barsak	100	94 (94)	123	121 (98,4)	2 (1,6)
Broyler Karkas	100	100 (100)	114	114 (100)	0 (0)
Yumurtacı Dışkı	100	84 (84)	111	102 (91,9)	9 (8,1)
Toplam	300	278 (92,6)	348	337 (96,8)	11 (0,3)



Şekil 4.1.PZR sonuçlarının % 1,5lik agarozdaki görüntüsü. M:100 bp DNA ladder, N: Negatif kontrol (steril distile su), 1-3: *C.jejuni* izolatları, 4: *C.coli* izolatu, 5: *C.jejuni* standart suş (NCTC 11168), 6: *C.coli* standart suş.(DCC2). (*C.jejuni* 323 bp, Genus pozitif 23s 650 bp, *C.coli* 126 bp).

4.2. *CAMPYLOBACTER* TÜRLERİNİN BİYOFİLM AKTİVİTELERİ

Bütün örneklerde baskın tür olarak *C. jejuni* saptandı. Bu sebeble elde edilen *C. jejuni* izolatları içerisinde 20 adet tavuk karkas, 20 adet yumurtacı dışkı ve 20 adet broyler barsak orjinli rastgele seçilen toplam 60 izolat, biyofilm oluşturma özelliği yönünden incelendi. Biyofilm özellikleri açısından broyler karkas, broyler barsak ve yumurtacı örnekleri arasında fark gözlenmedi. İncelenen 60 adet *C.jejuni* izolatının 34 adedi biyofilm oluşturmazken, 25 adedinin zayıf, 1 adedinin ise orta derecede biyofilm oluşturduğu tespit edildi (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2.Örnek türlerine göre biyofilm formasyonları

Örnek Türü	Örnek Sayısı	Güçlü (G)	Orta (O)	Zayıf (Z)	Negatif (N)
Broyler Barsak	20	0	0	10	10
Broyler Karkas	20	0	0	6	14
Yumurtacı Dışkı	20	0	1	9	10
Toplam	60	0	1	25	34

4.3.TERMOFİLİK *CAMPYLOBACTER* TÜRLERİNİN ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARI

C. jejuni izolatları içinden biyofilm oluşturma özelliği incelenen 20 adet broyler karkas, 20 adet yumurtacı dışkı ve 20 adet broyler barsak orjinli izolat antibiyotik dirençliliği yönünden değerlendirildi. Toplam 60 adet *C. jejuni* izolatına E- test uygulanarak MİK değerleri tespit edildi. Zayıf ve orta derecede biyofilm oluşturan izolatlarla biyofilm oluşturmayan izolatlar arasında antibiyotik duyarlılığı açısından fark gözlenmedi. Örnek türlerine göre antibiyotik duyarlılıkları tablo 4.3.1., tablo 4.3.2. ve tablo 4.3.3. de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Broyler barsak örneklerinde *C. jejuni* izolatlarının MİK değerleri ve duyarlılık oranları

<i>C. Jejuni</i> (n:20)	MİK Aralığı	MİK 50	MİK 90	Duyarlı	Dirençli
SXT	16-128	64	128	% 0	% 100
E	1-8	2	4	% 95	% 5
GM	1-4	1	2	% 100	% 0
MET	1-64	8	32	% 47	% 53
ENR	0,5-8	2	4	% 92	% 8
AX	0,25-32	16	32	% 16	% 84
TE	0,125-64	8	32	% 52	% 48

SXT: Sulfametoksazol –Trimetoprim, E: Eritromisin, GM: Gentamisin, MET: Metronidazol, ENR: Enrofloksasin, AX: Amoksisilin, TE: Tetrasiklin

Tablo 4.4. Broyler karkas örneklerinde *C. jejuni* izolatlarının MİK değerleri ve duyarlılık oranları

<i>C. Jejuni</i> (n:20)	MİK Aralığı	MİK 50	MİK 90	Duyarlı	Dirençli
SXT	16-128	64	128	% 0	% 100
E	1-8	2	4	% 97	% 3
GM	1-2	1	2	% 100	% 0
MET	1-64	8	32	% 46	% 54
ENR	1-8	2	4	% 90	% 10
AX	0,5-32	16	32	% 16	% 84
TE	0,125-64	8	32	% 53	% 47

SXT: Sulfametoksazol –Trimetoprim, E: Eritromisin, GM: Gentamisin, MET: Metronidazol, ENR: Enrofloksasin, AX: Amoksisilin, TE: Tetrasiklin

Tablo 4.5. Yumurtacı dışkı örneklerinde *C. jejuni* izolatlarının MİK değerleri ve duyarlılık oranları

<i>C. Jejuni</i> (n:20)	MİK Aralığı	MİK 50	MİK 90	Duyarlı	Dirençli
SXT	32-128	64	128	% 0	% 100
E	0,5-8	2	4	% 96	% 4
GM	0,5-4	1	2	% 100	% 0
MET	0,5-64	8	32	% 43	% 57
ENR	0,5-8	2	4	% 90	% 10
AX	0,25-32	16	32	% 18	% 82
TE	0,25-64	8	16	% 55	% 45

SXT: Sulfametoksazol –Trimetoprim, E: Eritromisin, GM: Gentamisin, MET: Metronidazol, ENR: Enrofloksasin, AX: Amoksisilin, TE: Tetrasiklin

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünya’da tavuk eti tüketimiyle bulaşan patojenler arasında insanlarda akut ishale yol açan *Campylobacter* türleri diğer diyare etkeni patojenlerden daha yüksek sıklıkla izole edilmektedir. Çeşitli türdeki hayvanlarda hastalık oluşturmaktadır. Özellikle evcil ve yabani kanatlıların barsağına adaptasyonu fazla olduğundan kanatlılarda sıklıkla izole edilmektedir. Bu çalışmada 100 adet broyler karkas örneğinde % 100 oranında termofilik *Campylobacter* izole edilmiş ve tamamında *C.jejuni*, kontaminasyonu saptanmıştır. Aynı broylerlere ait barsak örneğinden % 94 oranında izole edilen termofilik *Campylobacterler*’in, % 98,4’ü *C. jejuni*, % 1,6’sı *C. coli*, olarak bulunurken, 100 adet yumurtacı dışkı örneğinden % 84 oranında izole edilen termofilik *Campylobacterler*’in % 91,9’u *C. jejuni*, % 8,1 ‘i *C. coli* olarak bulunmuştur.

Akan ve ark. (79), broyler karkaslarında, *C. jejuni* sıklığının yüksek düzeyde olduğunu (%90-100) saptamışlardır. Gülmez (80), Kars yöresinde marketlerde satışa sunulan dondurulmuş tam piliç, göğüs, but ve kanattan muhafaza süresinin 10. 20. 30. ve 45. günlerinde doğrudan ekim ve zenginleştirme yöntemiyle ekim yaparak termofilik *Campylobacter* yönünden değerlendirmiştir. Doğrudan ekim yöntemiyle muhafaza süresinin 10. ve 20. günlerinde tüm örnek türlerinden *Campylobacter* izole edildiğini, 30. günde sadece tüm piliç ve butta *Campylobacter* izole edildiğini, 45. günde ise hiçbir

örnekte *Campylobacter* izole edilemediğini bildirmiştir. Svapla yapılan ekimin piliç etlerinde *Campylobacter* izolasyonu için yeterli olduğunu ve bu etkenlerin dondurma ısısına ve bekletmeye karşı duyarlı olduklarını göstermiştir. Ayrıca dondurulmuş ürünlerde tür düzeyinde yapılan incelemede % 97 oranında *C. jejuni*, % 3 oranında *C. coli* izole edilirken *C. lari* hiç izole edilememiştir. Dizgah (81), İstanbul piyasasında satışa sunulan çiğ tavuk karkaslarının 48'inde (% 96, termofilik *Campylobacter* izole edildiğini bildirmiştir. Kesimhanelerden alınan barsak içeriği örneklerinde termofilik *Campylobacter* türleriyle kontaminasyon üzerine yapılan çalışmalarda, Musgrove et al. (82) % 63,30 Saleha (83) % 72,63 düzeylerinde kontaminasyon bildirilmişlerdir. Arıkoğlu ve Aydın (6), Kars yöresinde çeşitli türde evcil ve yabani hayvanların rektal ve kloakal svapları incelemişler, *C. jejuni*'nin tavuklarda % 87,5 oranında olduğunu tespit etmişlerdir. Koluman (5), 160 kanatlı barsak içeriği örneğinin 106 (% 66,25)'sının termofilik *Campylobacter* türleri ile kontamine olduğu ortaya koymuş, bunlardan 82 (% 51,25)'sinde *C. jejuni* olduğu saptamıştır. Bu sonuçlar araştırma sonuçlarımızla uyum göstermektedir.

Ono ve Yamamoto (84), piliç kesimhanesinden iç organ çıkartma işlemi sonrasında aldıkları 44 piliç karkas örneğinde *C. jejuni* kontaminasyonunun % 77,8 düzeyinde olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırma da *C.jejuni* izolasyon oranının % 100 olması, karkasın iç organ çıkarma işleminden sonra (soğutma ve paketlenme işlemleri) kontamine olduğunu düşündürmektedir. Sampers et al (85), Belçika'da inceledikleri 11 tavuk eti işletmesinin tamamında *Campylobacter* spp. varlığı yönünden pozitif sonuç elde etmişler ve inceledikleri örneklerde % 8,89 ile % 84,81 oranları arasında termofilik *Campylobacter* türlerinin varlığını ortaya koymuşlardır. Hansson (10), 375 adet çiğ tavuk etini inceledikleri çalışmada ise örneklerde % 8,5 oranında termofilik *Campylobacter* türü ile kontamine olduğunu görmüşlerdir. Barsak içeriği örneklerinde *C. jejuni*'nin Stern et al.(86) % 40,90 Shreeve et al. (87) % 53 Herman et al. (88) % 54 ve Berrang et al. (89) % 63 düzeyinde bulunduğu bildirilmişlerdir. Araştırmamızda elde edilen izolasyon sonuçlarının bu çalışmalardan daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durum araştırmada kullanılan besi yerinin yüksek selektif özelliğine sahip olmasına bağlanabilir. Ridsdale et al (90), ördek karkasları üzerinde yaptıkları çalışmada *Campylobacter* türlerinin izolasyonu için CCD agara ekim yapılmasının en etkili metod olduğunu bildirmiştir. Diğer bir neden mevsimsel aktivite ile açıklanabilir. Termofilik *Campylobacterler*'in üreme ısıları yüksek olduğu için mevsimsel aktivite önemlidir.

Prevalansının yüksek olması örneklerin yaz mevsiminde toplanmış olması ile açıklanabilir. Ayrıca bölgesel farklar ve hijyen açısından işletmeler arasındaki farklılıklar da prevalansda önemli değişikliklere neden olmaktadır.

Bakteriler tarafından oluşturulan biyofilmler çeşitli antibakteriyellere, antiseptik ve endüstriyel biositlere daha dirençli oldukları, biyofilm bakterilerinin planktonik hallerine göre, 10–1000 kat daha dirençli oldukları bildirilmiştir (91, 92). Doğal ve endüstriyel çevrelerde oluşan biyofilmler bakteriyofaj, amipler ve çeşitli kimyasal biyosidlere karşı daha duyarlı iken, tıbbi alanda planktonik formda olan bakterilere oranla, antibiyotiklere çok daha fazla dirençli olabilmektedirler. Biyofilmlerin bu dirence multipl mekanizmalar aracılığıyla sahip oldukları düşünülmektedir (72).

Floyd et al (93), kanatlı eti işletmelerinde yaptıkları çalışmada, soğutma tankı ve haşlama tankında oluşmuş biyofilmden *C. jejuni*, *Salmonella* spp, *S. aureus*, *E. coli* izole etmişlerdir. Kanatlı karkaslarının kontaminasyonun da haşlama ve soğutma tanklarının önemli olduklarını ortaya koymuşlardır.

*Campylobacter*ler mikroaerofilik olmasına rağmen normal atmosfer koşullarında biyofilm içinde uzun süre canlı kalabilmektedir. Biyofilm içinde mikro-çevre oluştuğu ve böylece yüksek konsantrasyondaki oksijenin toksik etkisinden korunduğu düşünülmektedir (94). *C. jejuni*'nin gıda işleme ortamlarında bulunması biyofilm oluşumunda önemli rol oynayabilir.

Çalışmada % 96,8 oranında elde edilen *C. jejuni* izolatları arasından rastgele seçilen 60 izolatin biyofilm oluşturma özelliği incelendi. 34 adedinin biyofilm oluşturmadağı tespit edilirken, 25 adedinin zayıf, 1 adedinin ise orta derecede biyofilm oluşturduğı tespit edildi. Broyler karkas ve barsak örnekleri ile yumurtacı dışkı örnekleri arasında biyofilm oluşturma özelliği açısından fark gözlenmedi. Biyofilm aktiviteleri ile ilgili literatür ilişkisi bulunamamıştır.

Çalışma kapsamında biyofilm formasyonları incelenen 60 adet *C. jejuni* izolatına E-test yöntemi uygulanarak MİK değerleri tespit edildi. Broyler barsak, broyler karkas ve yumurtacı dışkı örnekleri arasında antibakteriyel direnç açısından fark gözlenmedi. Yıldırım ve ark. (95), termofilik *Campylobacter* türlerinin eritromisin duyarlılığını % 28 orta duyarlı, % 72 duyarlı, tetrasiklin duyarlılığını % 100 duyarlı olarak tespit etmişlerdir.

Yılmaz ve Tuğrul (3), termofilik *Campylobacter* türlerinin sulfametoksazol – trimetoprim’e karşı % 100 dirençli olduğunu, eritromisin’e % 87 duyarlı, gentamisin ve tetrasikline karşı % 100 duyarlı olduklarını saptamışlardır. Modolol et al (96), yaptıkları çalışmada MİK aralığı, MİK 50 ve MİK 90 değerlerini sırasıyla enrofloksasin için 1-8, 0.5-1, 4-8, eritromisin için MİK aralığını <0.06, gentamisin için 0.5-4, 2, 2-4, bulmuşlardır.

İça ve ark. (97), termofilik *Campylobacter* türlerinin metronidazol direncini %91.7 olarak tespit etmişlerdir.

Olson et al (98), antibiyotiklerin bakterilerin biyofilm formasyonlarına karşı dirençli olduklarını ortaya koymuştur. Kondoh et al (99), yaptıkları çalışmada clarithromycinin *Pseudomonas aeruginosa*’nın biyofilm oluşturma üzerindeki baskılayıcı etkisini araştırmışlar ve polisakkarid sentezini inhibe ederek biyofilm oluşumunu baskıladığını ortaya koymuşlardır. Clarithromycinin tedavi amacıyla kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Ichimiya et al (100), Klindamisin ve makrolitlerin *P. aeruginosa*’nın biyofilm oluşturmaya üzerine baskılayıcı etkileri olduğunu ortaya koymuşlardır. Kronik solunum yolları enfeksiyonlarında kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada biyofilm oluşturmayan *Campylobacter* türleri ile zayıf ve orta derecede biyofilm oluşturan *Campylobacter* türleri arasında antibiyotik duyarlılıkları açısından fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). *Campylobacter* türlerinin planktonik ve biyofilm formları arasında antibiyotik dirençliliği açısından fark gözlenmemesi, çalışmaların farklı bölgelerde yapılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak kanatlı orjinli örneklerde termofilik *Campylobacter* türleri yüksek oranda bulunmuştur. Bu durum, kümeslerde ve kesimhanelerde hijyen kurallarına yeterince uyulmadığını düşündürmektedir. *Campylobacter* enfeksiyonlarında sıklıkla kullanılan antibiyotiklerin dirençliliği de göz önünde bulundurulduğunda kanatlı etinin insan sağlığı açısından ciddi bir risk olduğu sonucuna varılmıştır.

Sağlıklı hayvanların etleri steril kabul edilmektedir. Fakat etler; kesim, yüzme, parçalama ve depolama sırasında kontamine olmaktadır. Ayrıca kesimhanelerde gerek proses gerekse muhafaza sırasında; alet, ekipman, hava, yıkama suyu, ambalaj malzemesi, uygun olmayan şartlarda taşıma, depolama ve personel kaynaklı çapraz ve direkt bulaşma söz konusudur. Üretim aşamasından önce de kümeslerde dışkı yoluyla

campylobacteriosis'in yayılma olasılığı yüksektir. Bu durum hem yetiştiricilik hemde et üretimi aşamasında kaliteyi düşürmektedir.

Tavukçuluk işletmelerinde genel hijyen ve personel hijyeni kurallarına çok dikkat edilmiyor olması, çapraz bulaşmaları engelleyici önlemlerin yeteri kadar alınmamış olması, etkenin işletmedeki varlığını çeşitli formlara dönüşerek koruması ve bu formların kuvvetli dezenfektanlar kullanılarak da giderilemiyor olması nedenlerinden dolayı tavuk eti termofilik *Campylobacter* türleri bakımından temel enfeksiyon kaynağı olma özelliğini korumaktadır.

Tavuk yetiştiriciliğinde ve tavuk eti üretimi aşamalarında hijyen kurallarına uyulmasıyla olası campylobacteriosis vakalarının oluşma riski en aza indirilebilecektir. Kritik kontrol noktaları iyi bir biçimde belirlenerek proses sırasında rutin kontrollerin yapılması gerekmektedir.

Dykes et al (101), biyofilm içindeki *C. jejuni*'nin klor ile tamamen inaktive olduğunu bildirmişlerdir. *Campylobacter* enfeksiyonlarından korunmak için kümes ve kesimhanelerin klorlanması önerilmektedir.

Tüketicilerin de alması gereken bir takım önlemler mevcuttur. Tavuk et ve et ürünleri iyice pişirilmeden tüketilmemelidir. Hayvansal tüm ürünlerin ele alındıktan sonra muhakkak ellerin iyice sabunla yıkanması gerekmektedir. Dezenfekte edilmemiş su tüketilmemelidir. Mutfakta çapraz kontaminasyonun engellenmesi için, kullanılan materyallerin hijyenine dikkat edilmesi gerekir.

6. KAYNAKLAR

1. Stanley K, Jones K. Cattle and Sheep Farms As Reservoirs of *Campylobacter*. J Appl Microbiol 2003; 94: 104-113
2. Vliet V, Ketley JM. Pathogenesis of Enteric *Campylobacter* infection. J Appl Microbiol 2001; 90: 45-56
3. Yılmaz AA, Tuğrul HM. Edirne’de İshal Etkenleri Arasında *Campylobacter* Türlerinin Yerinin ve Antimikrobiklere duyarlılıklarının Araştırılması. Turk J Inf 2005; 19: 53-59
4. Aarestrup FM, Engberg J. Antimicrobial Resistance of Thermophilic *Campylobacter*. Vet Res 2001; 32: 311-21
5. Koluman A. Piliç Kümesleri ve Kesimhanelerinde *Campylobacter jejuni* Kontaminasyonunun Belirlenmesi. Türk Hij Den Biyol Derg 2010; 67: 57-64
6. Arıkoğlu Ç, Aydın F. Kars yöresi evcil ve yabani hayvanlarda *Campylobacter jejuni*’nin prevalansı. Kafkas Üniv Vet Fak Derg 1997; 3:173-180
7. Bostan K. *Campylobacter Jejuni*’nin Gıda maddelerindeki mevcudiyeti ve Halk sağlığı açısından önemi. İstanbul Üniv Vet Fak Derg 2000; 26: 489-501
8. Veron M, Chatelain R. Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Veron and designation of the neotype strain for the type species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Veron. Int J Syst Bacteriol 1973; 23: 122-134

9. Vandamme P, De Ley J. Proposal for a new family, Campylobacteraceae. Int J Syst Bacteriol 1991; 41: 451-455
10. Hansson I. Bacteriological and Epidemiological Studies of *Campylobacter* spp. in Swedish Broilers, Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala 2007: 22-25
11. İzgür M. *Campylobacter* Enfeksiyonları, In: Veteriner Mikrobiyoloji. Aydın N, Paracıklioğlu J (eds), Medisan Yayınevi, Ankara, 2006: 232-245
12. Smibert RM. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2th Ed), USA, Springer, 2005; 145–1165
13. Blaser MJ. In: *Campylobacter jejuni* and related species. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Principles and practice of infectious diseases (5th ed), Philadelphia, Churchill Livingstone, 2000; 2276-85
14. Karin G, Bart CJ, Wouter VR, Anne P, et al. Functional polymorphisms in LPS receptors CD14 and TLR4 are not associated with disease susceptibility or *Campylobacter jejuni* infection in Guillain–Barre patients. J Neuroimmunol 2004; 150:132–138
15. Ketley MJ, Konkel ME. *Campylobacter* Molecular and Cellular Biology (1th ed), Norfolk Horizon Bioscience, 2005
16. Karlyshev AV, Linton D, Gregson NA, Wren BW. A novel paralogous gene family involved in phase-variable flagella-mediated motility in *Campylobacter jejuni*. Microbiology 2002; 148: 473-480
17. Stern NJ, Kazmi SU. *Campylobacter jejuni*. In: Foodborne Bacterial Pathogens. Doyle MP. Marcel Dekker Inc, New York, 1989: 71-110
18. Kelly DJ, et al. The physiology and metabolism of *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*. J Appl Microbiol 2001; 90:16-24
19. Cappelier JM, Minet J, Magras C, Colwell R, Federighi RM. Recovery in embryonated eggs of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni* cells and maintenance of ability to adhere to hela cells after resuscitation. Appl Environ Microbiol 1999; 65: 5154-5157
20. Obiri-Danso K, Paul N, Jones K. The effects of UVB and temperature on the survival of natural populations and pure cultures of *Campylobacter jejuni*, *Camp. coli*, *Camp. lari* and urease-positive thermophilic *campylobacters* (UPTC) in surface waters. J Appl Microbiol 2001; 90:256-267

21. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P. Curved Gram negative bacilli and oxidase positive fermenters: Campylobacteraceae and Vibrionaceae. In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology (6th ed), Woods G (eds), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 2006: 321-361
22. Ayaz ND, Erol İ. Canlı Fakat Kültürü Yapılamayan Bakteriler ve Gıda Güvenliği Yönünden Önemi. Etlik Vet Mikrobiol Derg 2004; 15: 61-74
23. Cappelier JM, Lazaro B, Rossero A, Fernandez-Astorga A, Federighi M. Double staining (CTC-DAP) for detection and enumeration of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* cells. Vet Res 1997; 28: 547-555
24. Trachoo N, Frank JF, Stern NJ. Survival of *Campylobacter jejuni* in biofilms isolated from chicken houses. J Food Protect 2002; 65: 1110-1116
25. Diker KS, Esendal OM, Akan M. Epidemiology of ovine *Campylobacter* infection determined by numerical analysis of electrophoretic protein profiles. J Vet Med 2000; 47: 739-743
26. López CM, Giacoboni G, Agostini A, Cornero FJ, Tellechea DM, Trinidad JJ. Thermotolerant *Campylobacter* in domestic animals in a defined population in Buenos Aires, Argentina. Prev Vet Med 2002; 55: 193-200
27. Pezzotti G, Serafin A, Luzzi I, Mioni R, Milan M, Perin R. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. Int J Food Microbiol 2003; 82: 281-287
28. Moore JE, Corcoran D, Dooley SG, Fanning S, Lucey B, Matsuda M, et al. *Campylobacter*. Vet Res 2005; 36: 351-382
29. On SLW. Identification Methods for *Campylobacters*, *Helicobacters* and Related Organisms. Clin Microbol Rev 1996; 9: 405-422
30. Morris GK, et al. Comparison of four hippurate hydrolysis methods for identification of thermophilic *Campylobacter* spp. J Clin Microbol 1985; 22: 714-718
31. Fermér C, Engvall EO. Specific PCR Identification and Differentiation of the Thermophilic *Campylobacters*, *Campylobacter jejuni*, *C.coli*, *C.lari*, and *C.upsaliensis*. J Clin Microbol 1999; 37: 3370-3373
32. Kärenlampi RI, Tolvanen TP, Hänninen ML. Phylogenetic Analysis and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Identification of *Campylobacter* Species Based on Partial *groEL* Gene Sequences. J Clin Microbiol 2004; 42: 5731-5738

33. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Molecular Cell Biology. (4th ed), W.H. Freeman and Company, New York 2000: 1084
34. Gonzalez I, Grant KA, Richardson PT, Park SF, Collins MD. Specific identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using a PCR test based on *ceuE* gene encoding a putative virulence determinant. J Clin Microbiol 1997; 35: 759-63
35. Hill WE, Datta AR, Feng P, Lampel KA, Payne WL. Identification of foodborne bacterial pathogens by gene probes. Chapter 24 in, "FDA Bacteriological Analytical Manual (8th ed), 1995. Revision A. Published and Distributed by AOAC International". Gaithersburg, 2001
36. Akan M, Erdeğer J, İlhan Z. Tavuk orijinli *Campylobacter*'lerin immunblotting ile analizi. Turk J Vet Anim Sci 2002; 26: 1361-1365
37. Padungton P, Kaneene JB. *Campylobacter* spp. in humans, chickens, pigs and their antimicrobial resistance. J Vet Med Sci 2003; 65: 161-170
38. Adesiyun AA, Seepersadsingh N, Inder L, Caesar K. Some bacterial enteropathogens in wildlife and racing pigeons from Trinidad. J Wild Dis 1998; 34: 73-80
39. Jeffrey JS, Atwill ER, Hunter A. Prevalance of *Campylobacter* and *Salmonella* at a squab (young pigeon) processing plant. Poult Sci 2001; 80: 151-155
40. Yardımcı H, Erdeğer J, Akan M, Yıldırım M. Civcivlerin deneysel *Campylobacter* infeksiyonunda kolonizasyon, translokasyon ve antikor yanıtı. Turk J Vet Anim Sci 2002; 26: 1367-1374
41. Altekruze SF, Stern NJ, Fields PI, Swerdlow DL. *Campylobacter jejuni* an emerging foodborne pathogen. Emerg Infect Dis 1999; 5: 28-35
42. Park SF. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. Int J Food Microbiol 2002; 74: 177-188
43. Corry JEL, Post DE, Colin P, Laisney MJ. Culture media for the isolation of *Campylobacters*. Int J Food Microbiol 1995; 26: 43-76
44. Dorrell N, Mangan JA, Laing KG, et al. Whole genome comparison of *Campylobacter jejuni* human isolates using a low cost microarray reveals extensive genetic diversity. Genome Res 2001; 11:1706-1715
45. Solomon EB, Hoover DG. Inactivation of *Campylobacter jejuni* by high hydrostatic pressure. Lett Appl Microbiol 2004; 38: 505-509

46. Humphrey T. *Campylobacter* spp.: not quiet the tender flowers we thought they were. Microbiology 2002; 29: 7-8
47. Karlyshev A, McCrossan M, Wren B. Demonstration of polysaccharide capsule in *Campylobacter jejuni* using electron microscopy. Inf Immun 2001; 69: 5921–5924
48. Pickett CL, Pesci EC, Cottle DL, Russell G, Erdem AM, Zeytin H. Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* spp. cdtB genes. Inf Immun 1996; 64: 2070- 2078
49. Crushell E, Harty S, Sharif F, Bourke B. Enteric *Campylobacter*: Purging its secrets? Pediatr Res 2004; 55: 3-12
50. Darka Ö, Yılmaz YA. Tavuk Eti ve Campylobacteriosis. Hacettepe Tıp Derg 2004; 35: 100-102
51. Evans S, Sayers AR. A longitudinal study of *campylobacter* infection of broiler flocks in Great Britain. Prevent Vet Med 2000; 46: 209-223
52. Pearson A, Greenwood M, Feltham R, Healing T, Donaldson J, Jones D, Colwell R. Microbial ecology of *Campylobacter jejuni* in a United Kingdom Chicken Supply Chain Intermittent Common Source, Vertical Transmission, and Amplification by Flock Propagation. Appl Environ Microbiol 1996; 62: 4614
53. Newell DG, Fearnley C. Sources of *Campylobacter* Colonization in Broiler Chickens. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 4343-4351
54. Akan M. *Campylobacter* infeksiyonları. In: Kanatlı Hayvan Hastalıkları, İzgür M, Akan M (eds), Medisan Yayınevi, Ankara 2002; 69-77
55. Yıldız A, Diker KS. *Campylobacter* contamination in chicken carcasses. Turk J Vet Anim Sci 1992; 16: 433-439
56. Shreeve JE, Toszeghy M, Pattison M, Newell DG. Sequential spread of *Campylobacter* infection in a multipen broiler house. Avian Dis 2000; 44: 983-988
57. Pearson ADM, Greenwood TD, Healing D, Rollins M, Shahamat J, Donaldson R. Colonization of broiler chickens by waterborne *Campylobacter jejuni*. Appl Environ Microbiol 1993; 59: 987-996
58. Şener A, Temiz A. Tavuk Kesimhane ve İşletmelerinde Kullanılan Ticari Dezenfektanlar ve Etkinlikleri Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi 2004; 10: 1-28

59. Acar MS. Kasaplık Hayvan Etleri ve Tavuk Etinden Yapılan Döner Kebabların Mikrobiyolojik Kalitesinin Karşılaştırmalı Araştırması. Doktora Tezi, İstanbul Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 1996: 134
60. Wirtanen G, Salo S. Biofilm risks. In: Handbook of Hygiene Control in The Food Industry. Lelieveld H, Mostert T, Holah J (eds). Cambridge, Wppdhead Publishing Ltd. Pp. 2005: 46-68
61. Barer MR. Viable but non-culturable and dormant bacteria: time to resolve an oxymoron and a misnomer. J Med Microbiol 1997; 46: 629-631
62. Donlan RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. Emerg Inf Disease 2002; 8: 881-890
63. Watnick P, Kolter R. Biofilm city of microbes. J Bacteriol 2000; 182: 2675-2679
64. Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol Mol Biol Rev 2000 ;64: 847-67
65. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 167-93
66. Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 2004; 12: 185-90.
67. Willims V, Fletcher M. *Pseudomonas fluorescens* adhesion and transport through porous media are affected by lipopolysaccharide composition. Appl Environ Microbiol. 1996; 62: 1004
68. Öztürk ŞB, Sakarya S, Öncü S, Ertuğrul MB. Biyofilmler ve Yabancı Cisim İnfeksiyonları, Klimik Derg 2008; 21: 79-86
69. Gülay Z, Mutlu G, İmir T, ve ark. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitapevi, Ankara, 1999: 91-108
70. Yüce A. Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. Klimik Derg 2001; 14:41-46
71. Teale CJ. Antimicrobial resistance in food chain. J Appl Microbiol. Symposium Supplement. 2002; 92: 85-89
72. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms: A common Cause of persistent infections. Science 1999; 284:18-22
73. Wang G, Clifford GC, Tracy MT, et al. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. J Clinical Microbiol 2002; 40: 4744–4747

74. ANON (1995). Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for detection of thermotolerant *Campylobacter*. The International Organization for Standardization 10272
75. Englen MD, Cray PJF. Evaluation of commercial diagnostic PCR for the identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Lett Appl Microbiol 2002; 35: 353-356
76. Teh KH. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* in controlled mixed-Microbial populations, Master thesis, Food Technology at Massey University, New Zealand 2008:48-51
77. Naves P, Prado G, Huelves L, et al. Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *E. Coli* is method-dependent. J Appl Microbiol 2008; 105: 585-590
78. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Informational Supplement. NCCLS Document M31-S1 2011; 24
79. Akan M, Diker KS, Yıldırım M. Kanatlı *Campylobacter* infeksiyonlarının moleküler epidemiyolojisi. TÜBİTAK VHAG-1234, Ankara 1998: 53
80. Gülmez MC. *jejuni* izolasyonunda kullanılan bazı kültürel teknikler ve tavuk etlerinde *Campylobacter*lerin araştırılması. Kafkas Üniv Vet Fak Derg 1999; 5: 145-153
81. Dizgah DG. İstanbul piyasasında satışa sunulan kanatlı eti ve ürünlerinde *Campylobacter jejuni*'nin varlığı üzerine araştırmalar, Doktora Tezi, İ.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, İstanbul 1995.
82. Musgrove MT, Berrang ME, Byrd JA, Stern NJ, Cox NA. Detection of *Campylobacter* spp. in ceca and crops with or without enrichment. Poult Sci 2001; 80: 825-8
83. Saleha AA. Isolation and characterization of *Campylobacter jejuni* from broiler chickens in Malaysia. Int J Poult Sci 2002; 1: 94-7
84. Ono K, Yamamoto K. Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama, Japan. Int J Food Microbiol 1999; 47: 211-29
85. Sampers T. Thermotolerant *Campylobacters* in Poultry Meat. Food Technol Biotechnol 2002; 40: 177 – 184
86. Stern NJ, Cray PF, Bailey JS, Cox NA, Craven SE, Hiett KL, Musgrove MT, Ladely S, Cosby D, Mead GC. Distribution of *Campylobacter* spp. in selected U.S. poultry production and processing operations. J Food Prot 2001; 11: 1705-10

87. Shreeve JE, Toszegky M, Ridley A, Newell DG. The carry over of *Campylobacter* isolates between sequential poultry flocks. *Avi Dis* 2002; 46: 378-85
88. Herman L, Heyndrickx M, Grijspeerdt K, Vandekerchove D, Rollier I, Zutter LD. Routes for *Campylobacter* contamination of poultry meat: Epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiol Infect* 2003; 131: 1169-80
89. Berrang ME, Dickens JA. Presence and level of *Campylobacter* spp. on broiler carcasses throughout the processing plant. *J Appl Poultry Res* 2000; 9: 43-7
90. Ridsdale JA, Atabay HI, Corry JEL. Prevalence of *Campylobacters* and *Arcobacters* in Ducks at The Abottoir. *J Appl Microbiol* 1998; 85: 567-573
91. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiol* 2003; 11:30-36
92. Stewart SP, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; 358: 135-38
93. Web_1. (2003). Floyd JK, Gonpot P, Smith R, Richter A. Regulation of Alginate biosynthesis and biofilm formation. <http://www.erc.montana.edu> (erişim tarihi:03.06.2011)
94. Murphy C, Carroll C, Jordan KN. Environmental survival mechanism of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *J Appl Microbiol* 2006; 100: 623-632
95. Yıldırım M, Sümerkan B, Fazlı ŞA. Dışkı kültürlerinden izole edilen *Campylobacter* türlerinin antimikrobiyel ajanlara duyarlılıkları. *Ankem Derg* 1996; 10: 393- 398
96. Modolo JR, et al. Antimicrobial Susceptibility of *Campylobacter* Strains isolated from diarrheic and diarrhea free dogs. *Arq Inst Biol* 2003; 70:283-286
97. İça ve ark. Metronidazole Resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Different Animal Species. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2009; 15: 629-632
98. Olson ME, et al. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res* 2002; 66: 86–92
99. Kondoh K, Hashiba M, Baba S. Inhibitory activity of clarithromycin on biofilm synthesis with *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Otolaryngol Suppl* 1996;525: 56-60
100. Ichimiya T, Yamasaki T, Nasu M. In-vitro effects of antimicrobial agents on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *J Antimicrobiol Chemotherapy* 1994; 34: 331-341
101. Dykes GA, Sampathkumar B, Korber DR. Planktonic or biofilm growth effects of survival, hydrophobicity and protein expression patterns of a pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. *Int J Food Microbiol* 2003; 89: 1-10

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Özgün ÖZKAN

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 24 Nisan 1977, Kastamonu

Medeni Durumu: Bekâr

Tel: 0537 2891144

email: ozgunozkan10@gmail.com

Yazışma Adresi: Sivas cad. No:195/5 Kocasinan/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	S.Ü.Veteriner Fakültesi, Konya	2001
Lise	Demir Çelik Lisesi, Karabük	1994

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2005- Halen	Eksen Araştırma Şirketi	Uzman
2003–2005	Çizmeli Kedi Veteriner Kliniği	Veteriner Hekim

YABANCI DİL

İngilizce