

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ**



**TAVUK VE İNSAN ORJİNİLİ *CAMPYLOBACTER JEJUNİ*
İZOLATLARININ PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE)
VE REPETITIVE EXTRAGENIC PALINDROMIC-POLYMERASE
CHAIN REACTION (REP-PCR) İLE MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ
VE ÇEŞİTLİ ANTİBAKTERİYALLERE DUYARLILIKLARI**

Proje No: TSA-11-3414

NORMAL ARAŞTIRMA PROJESİ

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü

Yrd. Doç. Dr. Seçil ABAY

Birimi/Bölümü

Veteriner Fakültesi

Klinik Öncesi Bilimler Bölümü

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Araştırmacının Adı Soyadı

Birimi/Bölümü

Uzm. Dr. Tuba KAYMAN

Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji

Araş. Gör. Harun HIZLISOY

Veteriner Fakültesi, Klinik Öncesi Bilimler Bölümü

Yrd. Doç. Dr. Nurhan ERTAŞ

Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü

Doç. Dr. Barış OTLU

İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji

Prof. Dr. Fuat AYDIN

Veteriner Fakültesi, Klinik Öncesi Bilimler Bölümü

Ocak 2013

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

“Tavuk ve insan orijinli *Campylobacter jejuni* izolatlarının Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) ve Repetitive Extragenic Palindromic-Polymerase Chain Reaction (Rep-PCR) ile moleküler tiplendirilmesi ve çeşitli antibakteriyallere duyarlılıkları” başlıklı ve TSA-11-3414 no’lu bu proje Erciyes Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’nce desteklenmiştir. Bu birime şahsım ve projede yer alan yardımcı araştırmacılar adına teşekkürlerimi sunarım.

Yrd. Doç. Dr. Seçil ABAY
Proje Yürütücüsü
Veteriner Fakültesi
Klinik Öncesi Bilimler Bölümü
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR	3
İÇİNDEKİLER	4
ÖZET	5
ABSTRACT	7
1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM	9
2. GENEL BİLGİLER	10
2.1. <i>Campylobacter</i> spp.’nin genel özellikleri	10
2.2. <i>Campylobacter</i> spp.’nin tanımlanması ve tiplendirilmesi	11
2.3. <i>Campylobacter</i> spp.’nin antibiyotiklere direnç durumu	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1. Materyal	16
3.1.1. Araştırmada kullanılan <i>C. jejuni</i> izolatları	16
3.1.2. Standart Suş	16
3.2. Metot	16
3.2.1. Moleküler analiz	16
3.2.2 Antibiyotik duyarlılık testi	22
4. BULGULAR	24
4.1. Rep- PCR Sonuçları	24
4.1.1. İzolatların Rep-PCR’da elektroferogram analizi	24
4.1.2. İnsan ve tavuk orijinli <i>C. jejuni</i> izolatlarının Rep-PCR band paternleri ve oluşturduğu kümeler	27
4.1.3. <i>C. jejuni</i> izolatlarının dendrogram ve benzerlik matrisi	35
4.1.4. Rep-PCR’de tavuk ve insan orijinli <i>C. jejuni</i> izolatlarının dağılım grafiği	36
4.2. PFGE sonuçları	36
4.3. PFGE ve REP-PCR sonuçlarının karşılaştırılması	39
4.4. Antibakteriyel Duyarlılık Test Sonuçları	42
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	48
6. KAYNAKLAR	54

ÖZET
TAVUK VE İNSAN ORİJİNLİ CAMPYLOBACTER JEJUNİ İZOLATLARININ
PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE) VE REPETITIVE
EXTRAGENIC PALINDROMIC-POLYMERASE CHAIN REACTION (REP-PCR)
İLE MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ VE ÇEŞİTLİ ANTİBAKTERİYALLERE
DUYARLILIKLARI

Bu çalışmada, kanatlı ve insan orijinli *C. jejuni* izolatları arasındaki klonal ilişkinin araştırılması ve izolatların çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarının saptanması amaçlandı.

Bu amaçla, 2010 yılında Kayseri il merkezinde 100'ü tavuk karkas ve 100'ü de klinik olgulardan izole edilen insan orijinli olmak üzere toplam 200 adet *C. jejuni* izolatu çalışmaya dahil edildi. İzolatların genotiplendirilmesi için, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) ve otomatize repetitive extragenic palindromic PCR (Rep-PCR, DiversiLab sistemi) yöntemleri kullanıldı. PFGE'de restriksiyon için *SmaI* enziminden yararlanıldı. İzolatların antibakteriyel duyarlılık testi disk difüzyon yöntemi ile yapıldı. Testte, eritromisin, streptomisin, tetrasiklin, nalidiksik asit, amoksisilin klavulonik asit, siprofloksasin, enrofloksasin, gentamisin ve ampisilin antibiyotiklerine ait diskler kullanıldı. Bu test sonucunda eritromisin, enrofloksasin ve siprofloksasine dirençli izolatların MIC değerleri E test (Biomerieux) ile saptandı.

PFGE yöntemiyle izolatların 174'ü (%87) tiplendirilebilirken, Dice'ın benzerlik katsayısı kullanılarak yapılan UPGMA kümeleşme analizinde (pozisyon tolerans %1 ve %80 benzerlik katsayısı sınır olarak alındığında), 115 farklı genotip elde edildi. Tiplendirilebilen izolatların 93'ü klonal yönden (%53) ilişkili olarak bulundu ve bunlar 35 farklı küme içerisinde yer aldı. Rep-PCR ile izolatların tamamı tiplendirilebildi. Bu yöntem ile izolatlar arasındaki klonal ilişkinin analizi için DiversiLab Software (version 3.4) ile Pearson korelasyon katsayısı kullanıldı. Benzerlik matrisi %95 alındığında, 200 izolat 133 farklı genotipe ayrıldı. Klonal yönden ilişkili 114 izolat (%57), suş sayısı 2 ila 4 arasında değişen 47 küme içerisinde yer aldı. Disk difüzyon testinde insan ve tavuk orijinli izolatların tamamı gentamisine duyarlı bulundu. Amoksisilin klavulonik asit, eritromisin ve streptomisine duyarlılık oranları %84-%96, %82-%88 ve %96-%98 olarak saptandı. İnsan izolatlarında ampisilin, enrofloksasin nalidiksik asit, siprofloksasin ve tetrasikline %44, %85, %84, %81 ve %38 oranında direnç saptanırken tavuk izolatlarında bu antibiyotiklere direnç oranı %34, %88, %95, %93 ve %56 olarak belirlendi.

E test sonucunda insan izolatlarının 62'si enrofloksasin, 70'i de siprofloksasine, tavuk orijinli izolatların ise 70'i enrofloksasin, 78'i de siprofloksasine, dirençli olup MIC değerleri de ≥ 32 ($\mu\text{g ml}^{-1}$) olarak bulundu.

Çalışmamızda kullanılan her iki moleküler tiplendirme yönteminin sonuçlarının büyük oranda uyumlu olduğu belirlendi. Moleküler tiplendirme sonuçlarına göre, baskın bir salgın suşu tespit edilemedi. Ancak insan ve tavuk orijinli *C. jejuni* izolatları arasında saptanan klonal yakınlık oranları, bu etkenden ileri gelen infeksiyonlarda tavuk etinin önemli rolü olabileceğini göstermektedir. Tavuk ve insan orijinli *C. jejuni* izolatlarında yüksek kinolon direnci saptanmıştır. Yine insanlarda *C. jejuni*'den ileri gelen infeksiyonlarda tedavi amacıyla kullanılan eritromisin yanında amoksisilin klavulonik asit ve streptomisin de tedavi seçeneği içerisinde yer alabilir.

Anahtar Kelimeler: *Campylobacter jejuni*, Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), Repetitive Extragenic Palindromic-Polymerase Chain Reaction (Rep-PCR), Antibiyogram

ABSTRACT
**THE MOLECULAR TYPING OF *CAMPYLOBACTER JEJUNI* ISOLATES
 ORIGINATED FROM HUMAN AND POULTRY WITH PULSED-FIELD GEL
 ELECTROPHORESIS (PFGE) AND REPETITIVE EXTRAGENIC PALINDROMIC-
 POLYMERASE CHAIN REACTION (REP-PCR) AND SUSCEPTIBILITIES TO
 VARIOUS ANTIBIOTICS**

In this study, the investigation of clonal relations between human and poultry originated *C. jejuni* isolates and the determination of susceptibilities of isolates to various antibiotics were aimed. For this purpose, in the center of Kayseri, totally 200 *C. jejuni* obtained from 100 chicken carcass isolates and 100 human isolates originated from clinical cases were included to the study in 2010. For the genotyping of the isolates, PFGE and Rep-PCR (DiversiLab system) methods were used.

In the PFGE, *Sma*I enzyme was used for the restriction. The antibacterial susceptibility testing of isolates was performed by disk diffusion method. In the test, amoxicillin clavulanic acid, ampicillin, ciprofloxacin, enrofloxacin, erythromycin, gentamicin, nalidixic acid, streptomycin and tetracycline disks of antibiotics were used. As a result of this test, the MIC values of isolates resistant to ciprofloxacin, enrofloxacin and erythromycin were detected by the E test (Biomerieux).

While, 174 of the isolates (87%) were typed with PFGE method, the 115 different genotypes were obtained in UPGMA cluster analysis by using of Dice's similarity coefficient (position tolerance 1% and similarity coefficient 80 % were taken as limit). As, the 93 of typable isolates (53%) were found to be clonally related and they took part in 35 different clusters. All isolates could be typed by using Rep-PCR. For the analysis of clonal relations among the isolates with this method, DiversiLab Software (version 3.4) and Pearson correlation coefficient were used. When the similarity matrix was considered as 95%, the 200 isolates were divided into 133 different genotypes. Clonally related 114 isolates (57%) were included in 47 clusters that contained 2 to 4 number of strains.

In disk diffusion test, human and chicken originated isolates, were all susceptible to gentamicin. The susceptibility rates to amoxicillin clavulanic acid, erythromycin and streptomycin were detected 84%-96%, 82%-88% and 96%-98% as respectively. Whilst, in human isolates, the resistance to ampicillin, ciprofloxacin, enrofloxacin, nalidixic acid, tetracycline were detected as ratios of 44%, 81%, 85%, 84% and 38% and in chicken isolates, the resistance rates to these antibiotics were determined as 34%, 93%, 88%, 95% and 56%.

In E test result, 70 and 62 of human isolates were found to be resistant to ciprofloxacin and enrofloxacin as for 78 and 70 of chicken originated isolates were resistant to ciprofloxacin and enrofloxacin at MIC values of ≥ 32 ($\mu\text{g ml}^{-1}$), respectively.

It was concluded that the results of two molecular methods used in our study were largely compatible and a dominant outbreak strain has not been determined. However, the clonal proximity rates detected between human and poultry originated *C. jejuni* isolates demonstrated that chicken meat played important role in the infections caused by this agent.

High quinolone resistances were detected in *C. jejuni* isolates originated from chicken and human. In addition to erythromycin used for the treatment of infections caused by *C.jejuni* in humans, amoxicillin clavulanic acid, and streptomycin can take place in the choice of treatment.

Key Words: *Campylobacter jejuni*, Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), Repetitive Extragenic Palindromic-Polymerase Chain Reaction (Rep-PCR), Antibigram

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Campylobacter jejuni, insanlarda görülen gıda orijinli akut bakteriyel gastroenteritisin en yaygın etkeni olarak bilinmektedir. İnsanlardaki bu infeksiyon için en önemli kaynaklar kontamine et, süt ve sudur. Özellikle de kanatlılar kampilobakterleri sindirim sistemlerinde barındırmalarından dolayı, bunların dışkılarıyla kontamine olmuş gıdaların tüketilmesi insanlarda gözlenen kampilobakteriozis için en önemli kaynak olarak gösterilmektedir. Bunun yanında pet hayvanları (kedi, köpek), vahşi kanatlılar ve vahşi hayvanlar da infeksiyon kaynağıdır. Bulaşma, portör hayvanlarla direkt temas ve kontamine hayvansal ürünlerin (et, süt) ellenmesi ve tüketilmesi sonucu meydana gelmektedir.

Bu projede, Kayseri il merkezinde 100'ü tavuk karkas ve 100'ü de klinik olgulardan izole edilen insan orijinli olmak üzere toplam 200 adet *C. jejuni* izolatu arasındaki klonal ilişki araştırıldı ve izolatların çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları saptandı. İzolatların genotiplendirilmesi için, ayırım gücü yüksek olan pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) ve son zamanlarda kullanımı yaygınlaşan otomatize Rep-PCR tabanlı DiversiLab sistemi kullanıldı. İzolatların antibakteriyel duyarlılık testi disk difüzyon yöntemi ile yapıldı. Testte, eritromisin, streptomisin, tetrasiklin, nalidiksik asit, amoksisilin klavulonik asit, siprofloksasin, enrofloksasin, gentamisin ve ampisilin antibiyotiklerine ait diskler kullanıldı. Bu test sonucunda eritromisin, enrofloksasin ve siprofloksasine dirençli izolatların MIC değerleri E test (Biomerieux) ile saptandı.

Bu çalışma ile son yıllarda, bakterilerin moleküler tiplendirilmesinde yaygın olarak kullanılan iki önemli metodun (PFGE, REP-PCR) kanatlı ve insan orijinli *C. jejuni* izolatlarını tiplendirmedeki etkinliği de ortaya konuldu. Kayseri ilinde tavuk etlerinden (karkas) izole edilen ve insan infeksiyon olgularından ayrılan *C. jejuni* izolatlarının antibiyotiklere olan direnç profilleri hakkında bilgiler elde edildi. Bu bilgiler, hem infeksiyonun tedavisinde kullanılan antibakteriyallerin seçiminde hem de olası bulaşma kaynakları hakkında yorum yapılmasını sağladı.

Bu çalışma, yurdumuzda aynı lokalizasyondan ayrılan insan ve tavuk orijinli *C.jejuni* izolatlarının antibiyotik direnç profilleri ile genetik yakınlıklarının beraber araştırıldığı ilk proje olma özelliğini taşımaktadır. Özellikle insan kampilobakteriyosisi için atfedilen kaynakların kanatlı ve memeli hayvanlar olduğu göz önünde bulundurulduğunda karşılaştırmalı çalışmaların önemi daha da artmaktadır. Elde edilen bilgilerin, yurdumuzda yapılmış ilk çalışma olması nedeniyle literatüre önemli katkı sağlayacağı düşüncesindeyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Campylobacter* spp.'nin genel özellikleri

Campylobacter türleri Proteobacteria'nın Epsilon alt grubunda bulunmaktadır. Campylobacteraceae familyasında *Campylobacter*, *Arcobacter* ve *Sulfospirillum* olmak üzere birbiriyle yakından ilgili üç genus bulunmaktadır. Yapılan detaylı çalışmalar sonucunda *Campylobacter* genusuna *C. coli*, *C. concisus*, *C. curvus*, *C. fetus* subsp. *fetus*, *C. fetus* subsp. *venerealis*, *C. gracilis*, *C. helveticus*, *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii*, *C. hyoilei*, *C. jejuni* subsp. *doylei*, *C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. lari*, *C. mucosalis*, *C. rectus*, *C. showae*, *C. sputorum* bv. *Sputorum*, *C. sputorum* bv. *faecalis*, *C. upsaliensis*, *C. insulaenigrae*, *C. lanienae* ve *C. hominis* olmak üzere toplam 18 tür, 6 tane alt tür ve 2 tane de biovar dahil edilmiştir (On 2001; Foster ve ark., 2004; Humphrey ve ark., 2007).

Ancak son yıllarda *Campylobacter canadensis* sp. nov. (Inglis ve ark., 2007), *Campylobacter peloridis* sp. nov., *Campylobacter lari* subsp. *concheus* subsp. nov., *Campylobacter lari* subsp. *lari* subsp. nov. (Debruyne ve ark., 2009), *Campylobacter cuniculorum* sp. nov., (Zanoni ve ark., 2009), *Campylobacter subantarcticus* sp. nov. (Debruyne ve ark., 2010), ve *Campylobacter avium* sp. nov. (Rossi ve ark., 2009) gibi yeni türlerin de varlığı rapor edilmektedir.

Kampilobakterler, Gram negatif, hareketli, mikraerofilik, kapsülsüz, sporsuz, aside dirençli olmayan, kıvrımlı çomakçıklar şeklinde mikroskopik görünüme sahip mikroorganizmalardır. Sahip oldukları kıvrımların sayısına göre mikroskopta “S”, “virgül” veya “martı kanadı” şeklinde görülürler. 42°C’de de üremelerinden dolayı, *C. coli*, *C. jejuni*, *C. lari* ve *C. upsaliensis* “termofilik kampilobakterler” olarak da anılırlar ve katı besiyerlerinde yaygın, basık, düzensiz kenarlı, sulu görünümlü şekilsiz koloniler oluştururlar. Ancak koloni yapısı besiyerindeki nem ile yakından ilişkilidir. Kanlı agardaki kolonileri genellikle nonhemolitikdir. Oksidaz ve katalaz aktiviteleri pozitif, indol aktiviteleri ise negatif olup, seleniti redükte etme yeteneğine sahip değildirler (Diker 1997; Quinn ve ark., 1998). Kapsül ve fimbria niteliğinde bir organele sahip değildirler. *C. jejuni* ve *C. coli* suşlarına spesifik litik fajların varlığı saptanmıştır. *C. jejuni* suşlarının önemli bir bölümü kloramfenikol, kanamisin ve tetrasiklinlere dirençliliği ile ilişkili plazmid taşımaktadırlar (Diker 1997). “Termofilik kampilobakterler”çeşitli türden evcil ve yabani hayvanların gastro-intestinal sistem floralarında bulunmaktadır (Yogasundram ve ark., 1989; Oyarzabal ve ark.,

1995; Atabay ve Corry 1997; Hudson ve ark., 1999; Aydın ve ark., 2001). Termofilik kampilobakterler içinde yer alan *C. jejuni*'nin dominant tür olduğu kabul edilmekte ve çalışmaların genellikle bu tür üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir. Ancak diğer 3 türün de gerek hayvan infeksiyonlarında ve gerekse insan infeksiyonlarındaki rolleri üzerinde detaylı çalışmalar mevcuttur. *C. jejuni* evcil hayvanlar için sindirim sistemi infeksiyonlarına neden olan önemli bir enterik patojendir (Diker 1997; Erganiş ve Yanarates 1995). Bunun yanında *C. jejuni*'nin evcil hayvan türlerinde mastitis ve abortuslara da neden olduğu ortaya konmuştur (Diker ve İstanbulluoğlu 1986; Quinn ve ark., 1998).

C. jejuni insanlarda akut gastroenteritisin önemli bir etkenidir. İnsanlardaki *C. jejuni* infeksiyonlarının akut semptomları ishal, ateş ve karın ağrısıdır. Bununla beraber kolitis, reaktif artiritis ile Miller-Fisher ve Guilliane-Barre sendromlarını içeren nörolojik komplikasyonlara da neden olmaktadır (Yıldırım ve ark., 1996; Alterkuse ve ark., 1999; Friedman ve ark., 2000; Butzler 2004).

İnsanlarda görülen Campylobacteriosis gıda orijinli bir infeksiyondur. İnsanlardaki bu infeksiyon için en önemli kaynaklar kontamine et, süt ve sudur. Özellikle de kanatlı etleri (Gormley ve ark., 2008) çok önemli bir kaynak olarak gösterilmektedir. Bunun yanında pet hayvanları (kedi, köpek), vahşi kanatlılar ve vahşi hayvanlar da infeksiyon kaynağıdır. Bulaşma, portör hayvanlarla direkt temas ve kontamine hayvansal ürünlerin (et, süt) ellenmesi ve tüketilmesi sonucu meydana gelmektedir (Gürkan ve Diker 1994; Alterkuse ve ark., 1994; Özer ve Ergün 1999; Wolfs ve ark., 2001; Broman ve ark., 2004; Peterson 2003; Butzler 2004; Gormley ve ark., 2008; Acke ve ark., 2009).

2.2. *Campylobacter* spp.'nin tanımlanması ve tiplendirilmesi

Çeşitli kaynaklardan izole edilen *C. jejuni*'nin diğer kampilobakter türlerinden ayırt edilmesinde değişik ısılarda (25, 37 ve 42°C) üreme, hippurat hidrolizi, nalidiksik asit ve sefalotine duyarlılık gibi testlerden yararlanılmaktadır (Aydın ve ark., 2001; Quinn ve ark., 1998). Ancak identifikasyonda kullanılan fenotipik testlerin, türlerin tanımlanmasında her zaman etkin olmadığı da rapor edilmektedir (Rautelin ve ark., 1999; On 2001). Yine insan infeksiyon olgularından ayrılan izolatlar çoğunlukla *Campylobacter* spp. olarak genus düzeyinde isimlendirilmektedirler.

Diğer gıda orijinli infeksiyonlarda olduğu gibi insanlardaki *Campylobacteriosis*'de de bulaşma yolu ve infeksiyon kaynağının belirlenmesi oldukça önemlidir. Çeşitli hayvan türlerinin sindirim sisteminde yaygın olarak bulunan ve aynı zamanda insan ve hayvanlarda enteritis, evcil türlerde mastitis ve abortusa neden olan *C. jejuni*'nin epidemiyolojisine ilişkin

detaylı araştırmalar yapılmıştır. Bu amaçla *C. jejuni* suşları içindeki çeşitlilik, fenotipik ve genotipik özellikler esas alınarak saptanmaya çalışılmıştır (**Wassenaar ve Newell 2000**).

Bunlardan yaygın olarak kullanılan fenotipik prosedür serotiplendirmedir. Kabul görmüş iki önemli serotiplendirme metodu vardır. Bunlar; Penner ve Lior tiplendirme metotlarıdır (**Lior 1984; Wassenaar ve Newell 2000**). Bu metotlar, çok sayıda suşun tiplendirilememesi, çok zaman almaları, teknik donanım a ihtiyaç duymaları, her laboratuvar da uygulanamaması, ulusal ve uluslararası nitelikteki epidemiyolojik çalışmaları sınırlandırmış olması, antiserum ve reagent'lerin hazırlanmasının pahalı olması gibi dezavantajlara sahiptir.

Bu yüzden son yıllarda alternatif alt tiplendirme metotlarına ihtiyaç duyulmuş ve bakterilerin genetik özelliklerinin esas alındığı moleküler alt tiplendirme metotları geliştirilmiştir (**Wassenaar ve Newell 2000**). Moleküler tekniklerden bazıları, ribotyping, pulsed field gel electrophoresis (PFGE), flagellin typing (fla typing), Random amplified polymorphic DNA (RAPD), Amplified fragment length polymorphism (AFLP) ve Repetitive Extragenic Palindromic PCR (Rep-PCR)'dır. Bu tekniklerin en önemli avantajı birçok laboratuvar da yaygın olarak kullanılması ve bu metotların kolaylıkla elde edilebilmesidir (**Kiuchi ve ark., 2000; Nielsen ve ark., 2000; Smith ve ark., 2000; Ribot ve ark., 2001; Wassenaar ve Newell 2000; Ertaş ve ark., 2004; Broman ve ark., 2004; Eyles ve ark., 2006, Behringer ve ark.,2011**).

Kiuchi ve ark. (2000) PCR-RFLP tekniğinde restriksiyon enzimi olarak *MboI* kullanmışlar ve kanatlı orijinli *C. jejuni* suşlarını 4 gruba ayırmışlardır. Araştırmacılar bu tekniğin epidemiyolojik tiplendirme için değerli bir teknik olduğunu bildirmişlerdir. **Nielsen ve ark. (2000)** insan, sığır ve kanatlı orijinli 90 *C. jejuni* suşunun, PCR-RFLP metodunun da içinde bulunduğu 6 metotla alt tiplendirmesini yapmışlardır. Araştırmacılar PCR-RFLP ile tüm suşların tiplendirilebildiğini ve ayrıca 2 sığır ve insan izolatının benzer olduğunu bildirmişlerdir. Yine **Aydın ve ark., (2007)** Türkiye'de, değişik kaynaklardan izole edilen *C.jejuni* izolatlarını bu yöntemle tiplendirme çalışmalarında insan izolatlarına benzer bant veren izolata rastlanmadığını rapor etmişlerdir.

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), kampilobakterlerin ve diğer birçok bakterinin tiplendirilmesinde kullanılan ayırt edici gücü yüksek bir metottur (**Lehner ve ark., 2000**). PFGE, CDC (Center of Disease Control and Prevention) tarafından *C.jejuni* dahil olmak üzere birçok bakteri için standardize edilmiştir. Kampilobakterler, diğer enterik bakterilerden farklı olarak intra ve inter-genomik değişikliklere daha fazla maruz kalırlar. Bu nedenle

kampilobakterler veya diğer bakterilerden kaynaklanan salgınlarda PFGE veya bir başka moleküler yöntemin kombinasyonu sonucunda enfeksiyonun ortak kaynağı tespit edilebilmektedir (**Serichantalergs ve ark., 2010**). İlk defa 1980'lerde mikroorganizmaların kromozomal DNA'larının moleküler ağırlıklarına göre elektroforetik ayrımı ile genotiplendirilmesinde kullanılmıştır (**Wu ve Della-Latta 2006**).

PFGE, belirli restriksiyon enzimleri kullanılarak kromozomal DNA'nın parçalanmasından sonra akım yönünü değiştiren özel bir elektroforez sistemi yardımıyla ortaya çıkan az sayıda (yaklaşık 10 ile 30) büyük DNA parçalarının (400 ile 2000 kb'lık) dağıtılması esasına dayanan DNA parmak izlerini oluşturmaktadır (**Wu ve Della-Latta 2006; Jannes ve DeVos 2006; Robinson 2006**).

PFGE, temelde restriction fragment length polymorphism tekniğine dayanan, ayırım gücü ve tekrarlanabilirliği yüksek etkili bir moleküler tiplendirme metodudur. Moleküler tiplendirme yöntemlerinin altın standardı olarak kabul edilmektedir.

Bu yöntemde, sıvı veya katı besiyerinde üretilen bakteriler, düşük erime ısıları agaroz karıştırılıp küçük kalıplar içine dökülmektedir. Agaroz içine karıştırılan bakteri hücreleri, deterjan ve enzim yardımıyla parçalanarak DNA izolasyonu yapılmaktadır. PFGE'de bozulmamış DNA gerekli olduğundan, yüksek kalitede DNA'nın elde edilmesi önem arz etmektedir. Bu nedenle tekniğin uygulanması sırasında gerekli sıcak ve soğuk ortamlara dikkat edilmesi gerekmektedir.

Lizis işlemi takiben DNA, seçilen restriksiyon enzimleri ile kesime uğratılmaktadır. Oluşan DNA parçaları nispeten az sayıda ve büyüktür. PFGE'de restriksiyon enzimi ile genelde 8 ila 25 arasında 40-600 kb DNA parçaları elde edilebilir. Daha sonra içinde kesime uğratılmış DNA parçaları bulunan kalıplar, agaroz jel'e yüklenerek 30-50 saat aralıklarında elektroforeze tabi tutulur. DNA büyüklükleri farklılık arzettiği için küçük boyuttaki DNA'lar jelde büyüklere oranla daha hızlı göç etmekte ve farklı bant profilleri elde edilmektedir. Bu bant profilleri bilgisayar programları yardımı ile değerlendirilerek suşların birbirleriyle olan ilişkileri ortaya konulmaktadır. PFGE; agaroz jel içerisindeki büyük DNA moleküllerinin (>10Mb) uygun bir alanda değişik şekillerde hareket etmesini sağlayan bir avantaja sahip olup otomatize bir sistem değildir. Ancak tekniğin uzun zaman alması (30-50 saat), yoğun iş gücü gerektirmesi ve özel ekipmanlara ihtiyaç duyulması gibi dezavantajları da vardır (**Liu D, 2006; Basım E ve Basım H, 2001**). PFGE sonucu elde edilen veriler, Pulsenet (www.cdc.gov/pulseNet) adındaki sisteme girilir. Pulsenet, gıda kaynaklı hastalıklara neden

olan kaynakları tespit etmek ve gıda kaynaklı salgınlara hızlı bir şekilde cevap vermek amacıyla halk sağlığı ile gıda laboratuvarları arasında kurulan bir ağıdır **(Barbuddhe ve ark., 2006)**. PFGE'in ise daha duyarlı olduğu kabul edilmekte ve çeşitli kaynaklardan izole edilen kampilobakterlerin genetik yakınlıklarının belirlenmesi ve insan infeksiyonlarından izole edilen kampilobakterler ile ilgili olası risk faktörleri hakkında yorum yapılabilecek bilgilere ulaşılmasında oldukça faydalı olduğu ve özellikle iki restriksiyon enzimi (*SmaI* ve *SacII/KpnI*, *XbaI*) birlikte kullanıldığında izolatlar arasında oldukça yüksek ayırım gücüne sahip olduğu bildirilmektedir **(Cornelius ve ark., 2005; Eyles ve ark., 2006; Behringer ve ark., 2011)**.

Moleküler tiplendirme için kullanılan Rep-PCR tabanlı DiversiLab sistemi, çeşitli hastalık etkenlerinin (*Staphylococcus aureus* **(Shutt ve ark., 2005)**, *Pseudomonas aeruginosa* **(Ratkai ve ark., 2010)**, *Listeria monocytogenes* **(Roussel ve ark., 2010)**, *Campylobacter jejuni* ve *C.coli* **(Behringer ve ark., 2011)**, v.s.) genetik tiplendirilmesi açısından duyarlı olduğu bildirilmekte ve çeşitli kaynaklardan izole edilen kampilobakterlerin genetik yakınlıklarının belirlenmesi ve insan infeksiyonlarından izole edilen kampilobakterler ile ilgili olası risk faktörleri hakkında yorum yapılabilecek bilgilere ulaşılmasında oldukça faydalı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca, diğer yöntemlere nazaran daha kolay olması, kullanılan solüsyonların standart olması, zaman kaybını önlemesi, kısa sürede sonuca ulaşılması ve en önemlisi analiz rapor sonuçlarının standart programlarla uygun şekilde verilmesi açısından faydalı bir yöntemdir. Suşlarla ilgili izole edildiği kaynak, tür, serotip vs. verilerin bilgisayar programına girildikten sonra istenilen karşılaştırmaların yapılabilmesi ve raporlara kısa sürede ulaşılabilmesi bir diğer önemli özelliğidir **(Healy ve ark., 2005, Fluit ve ark., 2010)**. Özellikle hastane infeksiyonlarında, epidemik salgınlarda kaynak izolata kısa sürede ulaşabilmeyi sağlayabilmektedir **(Fluit ve ark., 2010)**.

2.3. *Campylobacter* spp'nin Antibiyotiklere Direnç Durumu

Kampilobakterler ile ilgili olarak yürütülen ve üstünde önemli durulan bir diğer konu da antibiyotiklere olan direnç durumudur. Şöyle ki bu mikroorganizmalar zoonotik karakterde etkenler olduğundan çeşitli antibiyotiklere özellikle de florokinolonlara karşı dirençli suşlar ile oluşan infeksiyonlar oldukça önem arz etmektedir. Çeşitli kaynaklardan ve insan infeksiyon olgularından ayrılan kampilobakter izolatlarının antibiyotiklere olan duyarlılıkları ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır **(Yıldırım ve ark., 1996; Ishiara ve ark., 2006; Joonbae ve ark., 2007; Öngen ve ark., 2007; Bostan ve ark., 2009)**. Tüm bu çalışmalarda

insan infeksiyon olgularından ayrılan izolatlardaki direnç durumunun, çevresel ve gıda orijinli dirençli kampilobakterler ile ilişkisi vurgulanmaktadır (**Unicomb ve ark., 2006; Nelson ve ark., 2007; Praakle-Amin ve ark., 2007; Tadesse ve ark., 2010; Kim ve ark., 2010**). Eritromisin genellikle insan kampilobakteriosis olgularının tedavisinde kullanılan antibakteriyel bir ajandır. Ancak hayvansal üretimde kullanılan özellikle de florokinolonlar, makrolidler ve tetrasiklinlere karşı Kampilobakterler arasında antimikrobiyal direnç gelişimi ortaya çıkmıştır. Bu yüzden özellikle Avrupa Birliği ülkelerinde bu direnç durumu gözlem altına alınmış halk sağlığını tehdit eden zoonotik hastalık etkenlerinin antimikrobiyal dirençliliğinin takibi zorunlu kılınmıştır (**The EFSA 2008**).

Türkiyede, antibiyotiklere dirençlilik ile ilgili olarak yakın zamanda **Bostan ve ark., (2009)** 1 yıllık periyot boyunca tavuk sığır ve koyun etlerinden Termofilik kampilobakter türlerinin izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıkları ile yürüttükleri çalışmada anılan kaynaklarda termofilik kampilobakterlerin prevalansında bu periyot içinde önemli bir değişiklik olmadığını ve izolatların çoğunlukla tetrasiklinlere dirençli olduğunu vurgulamışlardır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırmada kullanılan *C. jejuni* izolatları

Araştırma için 2010 yılı içinde izole edilen 100 insan ve 100 tavuk orijinli olmak üzere toplam 200 adet *Campylobacter jejuni* izolatı materyal olarak kullanıldı. İzolatlarla ilişkin bilgiler aşağıdaki Tablo 1. de verilmiştir. İzolatlar, fenotipik yöntemler (Aydın ark. 2001, Quinn ve ark., 1998) ve ardında da moleküler analiz (Wang ve ark., 2002) ile identifiye edilmişlerdir.

<i>Campylobacter jejuni</i> İzolatları	
Kaynağı	Sayısı
İnsan orijinli izolatlar Sağlık Bakanlığı, Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarına getirilen ishali hastalara ait dışkı swap örneklerinden izole edilmişlerdir.	100
Tavuk orijinli izolatlar Marketlerden toplanan, çeşitli firmalara ait kanatlı karkaslarından, izole edilmişlerdir.	100
Toplam	200

Tablo 1. *Campylobacter jejuni* İzolatlarının Sayısı ve Kaynağı

3.1.2. Standart Suş

Çalışmada gerek antibiyogram testinde ve gerekse moleküler analizlerin yürütülmesinde Anabilim dalımızda mevcut olan *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 standart suşu kullanıldı.

3.2. METOT

3.2.1. Moleküler Analiz

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analizi Malatya İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yapıldı. *C. jejuni* için literatürlere göre hazırlanan PFGE protokolü uygulandı (Behringer ve ark. 2011; Karagiannis ve ark., 2010; Ribot ve ark., 2001; Cornelius ve ark., 2005; Eyles ve ark., 2006).

Yöntemin basamakları;

İzolatların hazırlanması

- Saf kültür halinde üreyen *C. jejuni* kolonileri, plastik öze ile toplanarak, 1 ml hücre süspansiyon tamponu (HST) (10 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 20 mM NaCl, pH 7.2) içinde süspanse edildi.
- Hücre süspansiyonu, 2500 x g'de, 4°C'de, 15 dakika (alternatif olarak 13 000 x g 4°C'de 2 dakika) santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında üstteki HST atıldı.
- Pelletin üzerine tekrar 1 ml soğuk HST eklenerek, kısa süreli vorteks yapıldı.
- Bakteri yoğunluğu, spektrofotometre (UV/Vis. Spectrophotometer, Boeco, Germany) yardımıyla 590 nm'de 1 absorbans olacak şekilde ayarlandı.

İzolatların agaroz gömülmesi

1. HST içerisinde %2'lik düşük erime ısıları agaroz hazırlandı.
 - 0.50 g agaroz, 100 ml'lik balon içerisine konuldu.
 - Üzerine 23,5 ml HST eklenir, yavaşça karıştırılarak agarın erimesi sağlandı.
 - Balonun ağzına alüminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 10 saniye tutularak, çıkarılıp hafifçe karıştırıldı. Tekrar 2-3 saniye mikrodalga fırınında tutuldu.
 - Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45-50°C'lik su banyosuna konuldu.
 - Ependorf tüplere, 150 µl dağıtıldı ve 45-50°C'deki su banyosunda bekletildi.
2. Her suş için bir agaroz kalıbı işaretlenip buz kabına yerleştirildi.
3. HST içinde hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 150 µl alınarak, 50°C'de tutulan ve içerisinde 150 µl düşük erime ısıları agaroz bulunan tüpe eklendi.
4. Bekletilmeden, hücre-agaroz karışımından 100 µl hava kabarcığı olmayacak şekilde agaroz kalıbına dağıtıldı.
5. Kalıplar, agaroz katılaşmaya kadar +4°C'de, 10 dakika bekletildi.

Agaroz içindeki hücrelerin parçalanması

1. 5 ml'lik steril kapaklı tüplere, 0.5 ml hücre lizis solüsyonu [10 mM Tris-HCl (pH 7.2)-50 mM NaCl-50 mM EDTA-0.2% sodyum deoksikolat-0.5% sarkozil] konuldu.
2. İçerisinde bakteri bulunan agaroz, kalıptan çıkarılarak lizis solüsyonuna yerleştirildi.
3. 37°C'de 1 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi.
4. Lizis solüsyon dökülerek, yerine 0.5 ml proteinaz K solüsyonu [250 mM EDTA

(pH 9.0)–1% sarkozin- 50 µg/ml proteinaz K) konuldu.

5. 50°C’de yarım saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi.

Hücre lizizinden sonra agaroz kalıpların yıkanması

1. Lizis aşamasından sonra agaroz kalıbının katılaşması için tüpler buz içerisinde en az 15 dakika bekletildikten sonra PK solusyonu aspire edildi.
2. Daha sonra agaroz kalıpları üç defa (her biri 50°C’de 30 dakika olmak üzere), 4 ml TE [10 mM Tris-HCl (pH 7.6)-0.1 mM EDTA] tamponuyla yıkandı.
3. Böylece içinde saflaştırılmış DNA bulunan agaroz, restriksiyon enzimi (RE) ile kesime hazır hale getirilmiş oldu.

Agaroz kalıpları içindeki DNA’nın RE ile kesilmesi

1. DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistürü yardımıyla ¼ oranında kesildi. Parçalardan biri, 100 µl 1x *SmaI/XbaI* tamponu içine konularak çalkalamalı su banyosunda 30°C’de 10 dakika bekletildi. Sonra sıvı aspire edildi.
2. Her agaroz kalıbı için aşağıdaki karışım hazırlandı.
 1. 1µl 10x *SmaI/XbaI* tamponu,
 2. 2,5µl *SmaI* enzimi (10 U / µl)
 3. 1 µl BSA (10 mg/ ml)
 4. 86.5µl steril ultra saf su (Reagent Grade Type 1)
3. Toplam hacim 100 µl
4. Bu karışımın içerisine, enzimin tamponu ile yıkanmış agaroz kalıbı konulup, çalkalamalı su banyosunda 30°C’de 2 saat inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletildi.
6. Kalıplar elektroforez için hazır hale geldi.

Elektroforez jelinin hazırlaması ve kalıpların jele yüklenmesi

- 1.0.5x TBE (44.5 mM Trisma base, 44.5 mM Borik asit, 1 mM EDTA, pH 8.4) içinde 100 ml olacak şekilde %1’lik agaroz (pulsed-field certified agarose, Bio-Rad Laboratories) hazırlandı.
- i. 1 g “pulsed-field certified agarose” 200 ml’lik balon içerisine konuldu.
- ii. Üzerine 100 ml 0.5 x TBE eklenir, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlandı.
- iii. Balonun ağzına aliminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 60 saniye tutuldu, çıkarılarak hafifçe karıştırılıp, tekrar 15 saniye mikrodalga fırınında tutuldu.
- iv. Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45-50°C’lik su banyosuna konuldu.

2. Agaroz dökülecek kaset hazırlandı, sızdırmaması için etrafı bantlandı. Su terazisi ile tamamen düzgün olduğu kontrol edilmiş bir zemine konuldu.
3. RE ile kesilmiş olan agaroz kalıplarının her biri, 15 dişli tarağın dişlerinin uç kısmına (tarağın uç çizgisine tam paralel olacak şekilde) yerleştirildi. Tarağın iki kenar ve ortasındaki dişlerine kontrol suşuna ait kalıplar yüklendi.
4. Kurutma kâğıdı veya havlu ile agaroz kalıplarının etrafındaki sıvının fazlası alındı. Maksimum 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, örnek konulan kısım DNA'nın yürüyeceği yöne gelmek kaydıyla, tarak agaroz dökülecek kaset içine yerleştirildi.
5. Su banyosundan çıkarılmış ve sıcaklığı yaklaşık 45-50°C (çok önemli) olan agaroz dikkatli bir şekilde hava kabarcığı oluşturulmadan kaset içine döküldü.
6. Oda ısısında 20–30 dakika katılaşmaya bırakıldı. Tarak dikkatlice çıkarıldı. İstenirse çukurlar %1'lik agarozla dolduruldu.
7. Sonra, agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarılıp, tabla üzerindeki agaroz, içerisinde 1900–2000 mililitre 0.5x TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirildi.

Elektroforez

CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belçika) uygulanan elektroforez koşulları: Başlangıç vuruş süresi 5,3 sn, bitiş vuruş süresi 34,9 sn, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm², sıcaklık 14°C, süre 20 saat.

Sonucun gözlenmesi ve analizi

1. Elektroforezden sonra jel, 5 µg/ml etidyum bromür içeren 400 ml ultra saf su içine alınır. 20 dakika boyandı.
2. UV ışığa altında görüntülendi.
3. *Gel logic 2200 imaging system* (ayrım gücü: 1708x1280 pixel, Kodak Company, NY, ABD.) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekilir. Resimler TIFF formatında kayıt edildi.
4. GelCompar II yazılım sistemi (version 3.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edildi. İstatiksel analiz olarak; “Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA)” kullanılarak PFGE profillerinin, denrogramı oluşturularak, kümeleşme analizi yapıldı. Bantlara bağlı “Dice” benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlendi.

Repetitive Extragenic Palindromic-PCR (REP-PCR)

Bu moleküler analiz, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan DiversiLab Rep-PCR cihazı kullanılarak yapıldı.

DNA Ekstraksiyonu: Tavuk ve insan orijinli *C. jejuni* izolatlarından DNA ekstraksiyonu, ticari UltraClean™ Microbial DNA İzolasyon Kiti ile yapıldı (Mo Bio Laboratories, Solana Beach, California, USA).

Bu amaçla;

- Bakterinin kanlı agarda 37°C'de 48 saatlik saf kültürü elde edildi.
- Kitde yer alan Microbead tüpleri içerisine 300 µl Microbead* solüsyonundan konuldu.
- Saf kültürden bir öze dolusu bakteri sıyrılarak Microbead tüpleri içerisindeki solüsyonla homojenize edildi.
- Bu tüplerin üzerine 50 µl MD1** solüsyonundan ilave edildi ve tüplerin vida kapakları sıkıca kapatılarak MO BIO Vorteks adaptörü takılmış olan vorteks yardımıyla 10 dk vortekslendi. Bu aşamada mikrobial hücrelerden nükleik asitlerin ayrımı için; boncuklar yardımıyla mekanik ve MD1 solüsyonu yardımıyla da kimyasal lizis ortamı sağlandı.
- Vorteksten alınan microbead tüpler 30 sn 10000xg'de santrifüj edildi.
- 2 ml'lik temiz ependorflara MD2*** solüsyonundan 100 µl konuldu.
- Tüplerin üstünde kalan süpernatant MD2 solüsyonu içeren ependorflara transfer edildi ve 5 sn vortekslendi. Daha sonra tüpler + 4 °C'de 15 dk inkube edildi.
- Buzdolabından çıkarılan tüpler oda ısısında 1 dk 10000xg'de santrifüj edildi.

*: Microbead solüsyonu, tuzlardan ve bakteri hücrelerini, lizisten önce homojen hale getirip stabilize eden bir buffer solüsyonundan oluşur.

**: MD1 solüsyonu, hücre lizisi için gerekli olan SDS ve diğer parçalanma ajanlarını içermektedir. SDS bir anyonik deterjan olup çeşitli organizmaların hücre membranları ile ilgili yağları ve yağ asitlerini yıkımlar. Bu olay soğukta gerçekleşirse çökelmeye neden olur. MD1 solüsyonu oda ısısında kullanılmalıdır.

***: MD2 solüsyonu, DNA'ya ait olmayan hücre döküntülerini ve proteinlerini içeren organik ve inorganik materyalleri çöktüren bir içeriğe sahiptir.

- 2 ml'lik temiz ependorflara 450 µl MD3**** solüsyonundan konuldu.
- Buzdolabından çıkarılan ependorflardan dipteki pelete dokunmadan alınan

yaklaşık 200 µl hacmindeki süpernatant MD3 solusyonunu içeren tüplere aktarıldı ve 5 sn vortekslendi.

- Spin filtre bulunan ependorflar içerisine 650 µl en son karışımdan konuldu ve oda ısısında 30 sn santrifüj edildi. Santrifüj sonunda dibe inen sıvı atıldı. Bu aşamada filtre membranına sadece DNA'nın bağlanması ve diğer kontaminantların filtreyi geçmesi sağlandı.
- Spin filtreye tekrar 300 µl MD4***** solüsyonundan ilave edildi ve 30 sn 10000xg'de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonunda dibe inen sıvı tekrar atıldı. Daha sonra spin filtre oda ısısında 10000xg'de 1 dk santrifüj edildi. Bu basamakta santrifüjle MD4 solüsyonunun kalıntıları uzaklaştırıldı.
- Son olarak spin filtre temiz 2 ml'lik tüplere aktarılarak 35 µl MD5***** solüsyonundan ilave edildi ve 30 sn 10000xg'de santrifüj edildi. Tüplerden spin filtreler uzaklaştırılarak DNA moleküler çalışmalar için hazır hale gelmiş oldu ve -20 °C'de saklandı.

Rep-PCR protokolü için DNA konsantrasyonlarının 25-50 ng/µl olması sağlandı. Bu amaçla; ekstrakte edilen DNA'larla, kit içerisinde hazır standart yoğunlukta DNA'lar (10 ng-40 ng/µl) % 1.5'luk jel elektroforeze tabi tutularak, elde edilen DNA yoğunlukları gözle saptandı.

****: MD3 solüsyonu, yüksek konsantrasyonda tuz içermektedir. Bu yüksek tuz konsantrasyonu ilerleyen basamakta DNA'nın spin filtre membranına bağlanması için gereklidir.

*****: MD4 solüsyonu, spin filtrenin silika filtre membranına bağlanan daha temiz bir DNA elde etmek amacıyla kullanılan etanol bazlı bir yıkama solüsyonudur. Bu yıkama solüsyonu silika membranına tutunan DNA'nın yerinde kalmasını sağlarken tuz kalıntılarını ve diğer kontaminantları da uzaklaştırmaktadır.

*****: MD5 solüsyonu, 10 mM Tris (pH 8) olup tuz içermemektedir. DNA, MD5 solüsyonu yardımıyla serbest kalarak silika membranı bırakır ve tüpün dibine iner. DNA sadece tuz varlığında silika membrana tutunmaktadır.

Diversilab *Campylobacter* DNA Fingerprinting Protokolü

Rep-PCR protokolünde; toplamda 25 µl hacimde hazırlanan PCR karışımı, 18 µl Rep-PCR MM1, 2.5 µl GeneAmp10x PCR Buffer, 2 µl Primer mix L, 0.5 µl AmpliTaq DNA Polymerase enzimi ve 2µl (25-50 ng/µl konsantrasyonda) hedef DNA örneğinden oluştu.

DNA Amplifikasyon Aşaması Thermal Cycler'da 94°C'de 2 dk ilk denatürasyon ve sonra 35 siklus olarak 94°C'de 30 sn denatürasyon, 50°C'de 30 sn primer bağlanması, 70°C'de 90 sn primer uzaması olarak gerçekleştirildi. Son olarak da 70°C'de 3 dk final uzama ve 4°C'de bekleme aşamasından oluştu.

Rep-PCR Ürün Analizi

Amplikonları mikrofluidik çipe (LabChip Caliper Technologies, Inc.) yükleme işlemi ve Agilent B 2100 Bioanalyzer'da (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, California) elektroforez aşaması aşağıdaki basamaklar izlenerek yapıldı:

1. Mikrofluidik çipe öncelikle jel boya karışımı yüklenerek çip yükleme istasyonu yardımıyla jel boya karışımının çipin bütün kanallarına yayılması sağlandı.
2. Çipin her bir kuyucuğuna otomatik pipet yardımıyla 5 µl DNA marker konuldu.
3. Çipin birinci kuyucuğundan başlayarak amplikonlar tek tek kuyucuklara 1µl olarak otomatik pipetle sırası göz önünde bulundurularak yüklendi.
4. Daha sonra çip adaptörlü vortekste 1 dk süreyle vortekslendi.
5. Son olarak çip Agilent B 2100 Bioanalyzer'a yüklendi.

Yaklaşık olarak çipte elektroforez işlemi 1 saatte tamamlandı. İnternet bağlantılı bilgisayarda Diversilab Software'in kullanımı ile analiz sonucu dendogramları, elektroferogramları, bandların jel fotoğrafları, dağılım planları ve verilerin değerlendirilmesi amacıyla seçilebilen demografik alanları içeren raporlar otomatik olarak elde edildi. Diversilab software ile suşların karşılaştırılmasında Pearson correlation coefficient unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) yöntemi kullanıldı.

3.2.2 Antibiyotik Duyarlılık Testi

Disk Diffüzyon Testi

2010 yılında izole edilen *Campylobacter jejuni* izolatlarının çeşitli antibiyotiklere olan duyarlılıkları antibiyogram testi ile belirlendi. Bu amaçla disk difüzyon yöntemi kullanıldı (**Bauer ve ark., 1966**). Çalışmada Ciprofloxacin, nalidixic acid, tetracycline, erythromycin, enrofloxacin, gentamycin, streptomycin, amoksisilin+klavulanik asit ve ampicillin antiyotik diskleri kullanıldı (**NCCLS 2002; NCCLS 2003; Ishihara ve ark. 2006**).

Campylobacter izolatları Mc Farland 0.5 yoğunlukta süspanse edildikten sonra %5 koyun kanı ilave edilmiş Mueller-Hinton agara baget yardımı ile 0.1 ml yayıldı. Antibiyotik diskleri belirli aralıklarla dizildikten sonra petriler mikroaerobik ortamda 37.5° C de 48 saat inkübe edildi. İnkubasyon sonrası diskler etrafında oluşan zonlar ölçülerek duyarlı, dirençli veya orta duyarlı izolatlar belirlendi.

E-Test

E Test, disk difüzyon testi sonucunda enrofloksasin, eritromisin ve siprofloksasin disklerine dirençli saptanan izolatlara uygulandı. İzolatların bu antibakteriyeller için MIC değeri saptandı. *Campylobacter* suşları 0,5 McFarland yoğunluğuna getirilerek Mueller Hinton agar yüzeyine eküvyonla yayıldı. Agar yüzeyine E-test şeritleri yerleştirildi. 37.5° C de 48 saat mikroaerofilik ortamda inkübe edildi. Şerit etrafında oluşan inhibisyon elipsinin şerit üzerindeki ölçekle kesiştiği nokta MIC değeri olarak değerlendirildi. Duyarlılık ve dirençlilik sınırları (CLSI 2008; CLSI 2010) kriterlerine göre değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Rep- PCR Sonuçları

Rep-PCR ile insan ve tavuk orijinli toplam 200 *C. jejuni* izolatının tamamı tiplendirilebilmiştir. 200 izolat, 133 farklı genotipe ayrıldı. 114 (%57) izolat ise klonal yönden ilişkili saptanmıştır.

100 tavuk izolatının 44'ü unique band paterni verirken 100 insan izolatının 42'si unique band paterni vermiştir. 56 tavuk izolatı ve 58 insan izolatı, suş sayısı 2 ila 4 arasında değişen 47 küme içerisinde yer almış olup bu kümelerden 22'si benzer band paternine sahip her iki orijinden izolatları içermiştir.

4.1.1 İzolatların Rep-PCR'da elektroferogram analizi

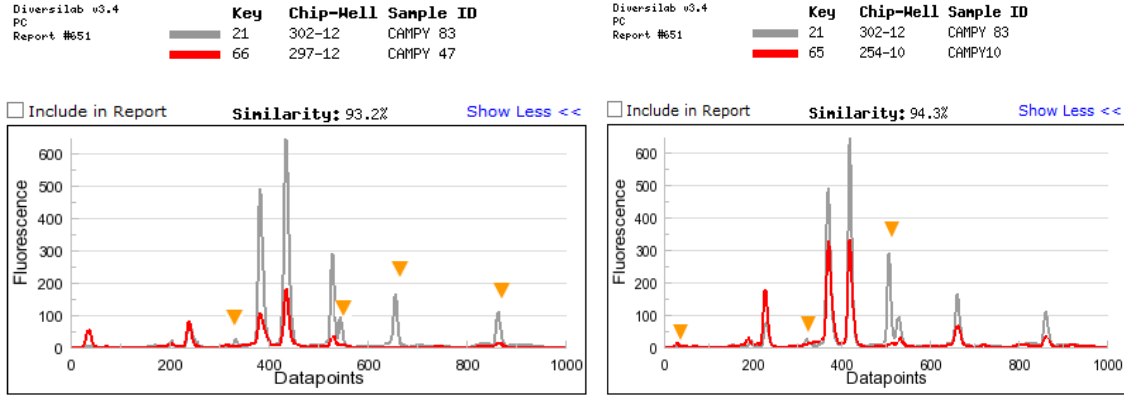
Otomatize Rep-PCR sistemine, izolatlara ilişkin veri girişinde; tavuk orijinli izolatlar için CAMPY, insan orijinli izolatlar için ise CAMPYHB kodları kullanılmıştır.

Tavuk orijinli izolatlar: CAMPY 1 → CAMPY 100

İnsan orijinli izolatlar: CAMPYHB 1 → CAMPYHB 100

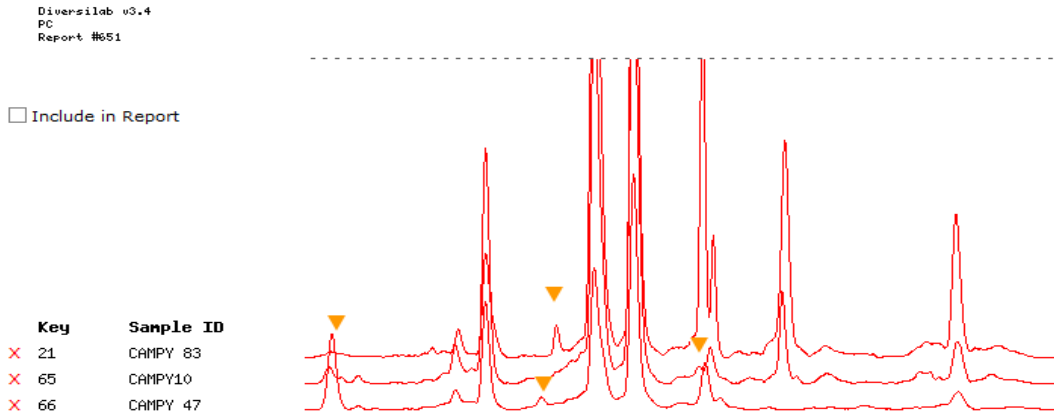
Elektroferogram analizi, Rep-PCR analizinin yorumlanması, izolatların genotipik olarak bulundukları bant paternlerinin tespiti ve analizin tamamlanabilmesi için izolatların elektroferogramlarının üst üste getirilerek genotipik olarak farklı noktalarda ya da aynı noktalarda göstermiş oldukları bant sayılarının tespit edilmesine dayalı bir yöntemdir. İzolatlar arasında 2 ve daha fazla sayıda farklı noktalarda bant saptanması izolatların birbirinden genotipik olarak farklı band paternlerine sahip olduklarını göstermektedir. Şekil 1, Şekil 2, Şekil 3 ve Şekil 4'de bu durum (sarı ok işareti ile) belirtilmiştir. Bu amaçla 200 izolatın benzerlik durumuna göre 2'şerli yada üçerli elektroferogramları üst üste getirilerek izolatların genetik grupları ve bant paternleri saptanmıştır. Tavuk ve İnsan orijinli *C. jejuni* izolatlarının elektroferogram analiz sonuçlarına ilişkin grafikler aşağıda görülmektedir.

Tavuk İzolatlarının Elektroferogramları



Şekil 1. Tavuk orijinli *C. jejuni* izolatlarının Elektroferogramları

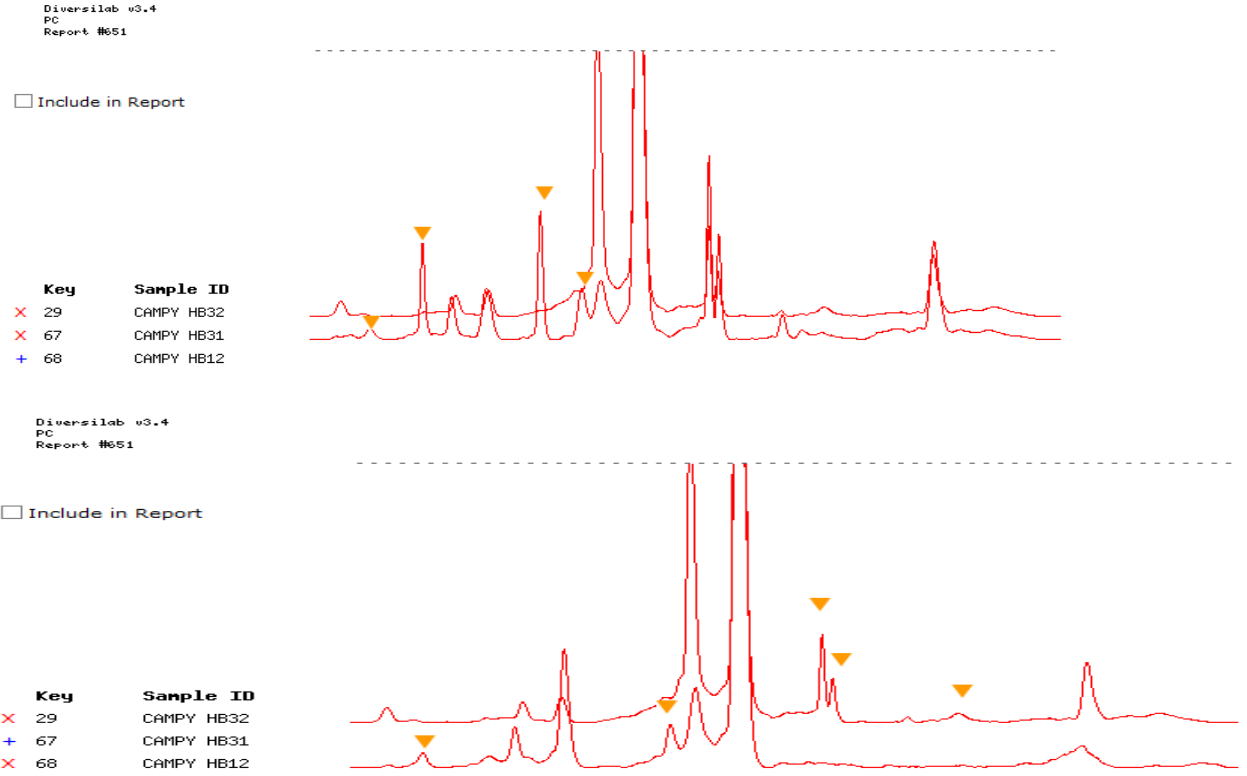
Şekil 1’de üç adet tavuk izolatının 2’şerli olarak elektroferogram analiz sonucu görülmektedir. Daha önce CAMPY 83 ve CAMPY 47 benzerlik CAMPY83 ve CAMPY10 ise %94.2 oranında benzer bulunmuştur. Ancak elektroferogram analizinde sarı oklarla gösterildiği üzere CAMPY 83 ve CAMPY 47 arasında 4 farklı bant, CAMPY 83 ve CAMPY 10 arasında ise üç farklı bant saptanmıştır. Bu sebeble bu üç tavuk orijinli izolat genotipik olarak farklı bulunmuş, unique bant paterni verdikleri saptanmıştır.



Şekil 2. Tavuk orijinli *C. jejuni* izolatlarının Elektroferogramları

Yukarıda belirtilen üç izolatın bir arada elektroferogram analizi ve bant farklılıkları Şekil 2’de görüldüğü üzere üçlü olarak üst üste getirildiğinde de izolatların birbirinden farklı genotipe oldukları belirlenmiştir.

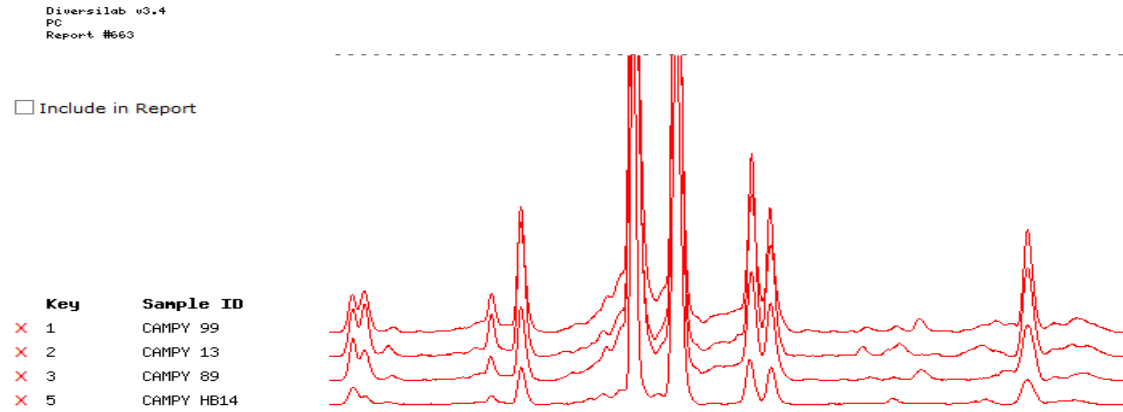
İnsan İzolatlarının Elektroferogramları



Şekil 3. İnsan orijinli *C. jejuni* izolatlarının Elektroferogramları

Şekil 3 de ise üç adet insan orijinli *C. jejuni* izolatının 2 şerli gruplar halinde elektroferogram analizi görülmekte olup CAMPY HB31 ve CAMPY HB 32 arasında 4 , CAMPY HB 32 ve CAMPY HB 12 arasında 5 farklı bant bulunduğu sarı oklarla gösterilmiş olup bu üç insan izolatı da unique bant paterni göstermişlerdir.

Tavuk ve İnsan İzolatlarının Elektroferogramları



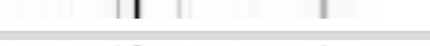
Şekil 4. Tavuk ve insan orijinli *C. jejuni* izolatlarının Elektroferogramları

Elektroferogram analizi sonrası aynı küme içinde yer alan ve genotipik olarak benzerlik gösteren üç tavuk (CAMPY 99, CAMPY13, CAMPY89) ve bir insan (CAMPY HB 14) izolatının elektroferogram analiz sonucu ise Şekil 4’de görülmektedir.

4.1.2. İnsan ve tavuk orijinli *C. jejuni* izolatlarının Rep-PCR band paternleri ve oluşturduğu kümeler

200 *C. jejuni* izolatının genotipik olarak elektroferogram analizi sonrası yer aldığı genotipik gruplar ve elde edilen bantlar aşağıda yer alan Rep-PCR analiz sonucu görüntülerinde ayrıntılı olarak şekilde verilmiştir.

Samples			
	Key	Sample ID	Normalized Curve (Show Graphs)
	P1	1	CAMPY HB78
		2	CAMPY HB77
	P2	3	CAMPY71
		4	CAMPY 76
		5	CAMPY 70
		6	CAMPY 69
	P3	7	CAMPY 74
	P4	8	CAMPY 81
G10	P6	12	CAMPY5
	P5	9	CAMPY 99
		10	CAMPY 13
		11	CAMPY 89
		13	CAMPY HB14
	P7	14	CAMPY 83
	P8	15	CAMPY10
	P9	16	CAMPY 47
	P10	17	CAMPY HB31
	P11	18	CAMPY HB12
	P12	19	CAMPY HB32
		20	CAMPY 42
		21	CAMPY HB28
G2	P13	22	CAMPY HB20
		23	CAMPY 29
		24	CAMPY HB 85
		25	CAMPY HB57
	P14	26	CAMPY HB49
	P15	27	CAMPY 91
		28	CAMPY HB2
		29	CAMPY36
		30	CAMPY 43
	P16	31	CAMPY HB 90
		32	CAMPY 92

P17	33	CAMPY HB 89	
	34	CAMPY HB73	
	35	CAMPY HB 86	
P18	36	CAMPY HB 82	
	37	CAMPY 94	
	38	CAMPY HB61	
P19	39	CAMPY HB96	
	40	CAMPY HB9	
	41	CAMPY 59	
P20	42	CAMPY HB15	
P21	43	CAMPY HB 83	
P22	44	CAMPY HB42	
	45	CAMPY 17	
	46	CAMPY 40	
	47	CAMPY 18	
P23	48	CAMPY 73	
P24	49	CAMPY 68	
P25	50	CAMPY 22	
	51	CAMPY8	
P26	52	CAMPY HB54	
	53	CAMPY 41	
P27	54	CAMPY 46	
P28	55	CAMPY 98	
	56	CAMPY HB63	
P29	57	CAMPY HB62	
	58	CAMPY HB39	
P30	59	CAMPY HB18	
	60	CAMPY6	
P31	61	CAMPY HB37	
P32	62	CAMPY HB36	
	63	CAMPY 15	
P33	64	CAMPY HB60	
P34	65	CAMPY HB44	
	66	CAMPY 27	

P35	67	CAMPY HB94	
	68	CAMPY 45	
	69	CAMPY HB72	
P36	70	CAMPY 35	
P37	71	CAMPY HB45	
	72	CAMPY HB10	
P38	73	CAMPY 37	
P39	74	CAMPY HB55	
P40	75	CAMPY HB97	
P41	76	CAMPY HB50	
	77	CAMPY HB33	
P42	78	CAMPY60	
P43	79	CAMPY HB22	
	80	CAMPY4	
P44	81	CAMPY 51	
	82	CAMPY 49	
P45	83	CAMPY HB19	
	84	CAMPY 12	
P46	85	CAMPY 53	
	86	CAMPY 95	
P47	87	CAMPY 86	
	88	CAMPY 54	
	89	CAMPY 97	
P48	90	CAMPY HB99	
	91	CAMPY 78	
P49	92	CAMPY HB76	
P50	93	CAMPY 48	
P51	94	CAMPY 44	
P52	95	CAMPY 16	
P53	96	CAMPY 31	
P54	97	CAMPY61	

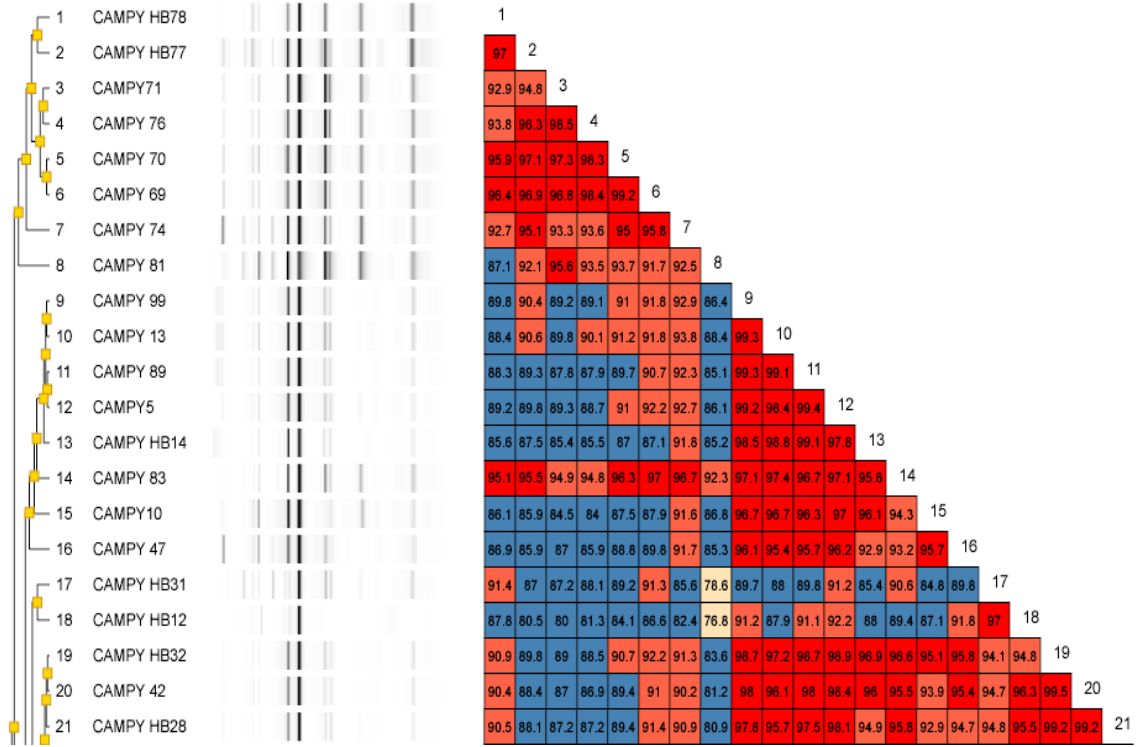
	P55	98	CAMPY HB98	
		99	CAMPY 32	
	P56	100	CAMPY HB95	
		101	CAMPY 50	
	P57	102	CAMPY HB 81	
	P58	103	CAMPY 28	
G3	P60	106	CAMPY 23	
	P59	104	CAMPY 88	
		105	CAMPY 20	
		107	CAMPY 80	
	P61	108	CAMPY65	
	P62	109	CAMPY72	
	P63	110	CAMPY64	
		111	CAMPY63	
	P64	112	CAMPY 82	
	P65	113	CAMPY HB66	
	P66	114	CAMPY HB16	
	P67	116	CAMPY 33	
	P69	117	CAMPY HB 79	
	P70	118	CAMPY HB47	
		119	CAMPY HB25	
		120	CAMPY HB 87	
	P71	121	CAMPY HB40	
		122	CAMPY HB38	
		123	CAMPY HB52	
	P72	124	CAMPY HB75	
	P73	125	CAMPY HB43	
	P74	126	CAMPY55	! 
	P75	127	CAMPY62	
		128	CAMPY 14	
	P76	129	CAMPY 66	
	P77	130	CAMPY HB70	
	P78	131	CAMPY 21	

	P79	132	CAMPY HB1	
	P80	133	CAMPY 19	
	P81	134	CAMPY HB59	
	P82	135	CAMPY HB48	
	P83	136	CAMPY HB6	
	P84	137	CAMPY 96	
	P85	138	CAMPY 90	
	P86	139	CAMPY HB41	
		140	CAMPY 39	
	P87	141	CAMPY HB 80	
		142	CAMPY HB27	
	P88	143	CAMPY HB92	
	P89	144	CAMPY HB69	
G4	P91	146	CAMPY HB74	
	P90	145	CAMPY HB93	
		147	CAMPY 75	
	P92	148	CAMPY HB 88	
	P93	149	CAMPY HB7	
	P94	150	CAMPY HB3	
	P95	151	CAMPY HB51	
G5	P96	152	CAMPY HB5	
		153	CAMPY HB8	
	P97	154	CAMPY HB71	
	P98	155	CAMPY HB23	
		156	CAMPY HB4	
	P99	157	CAMPY HB58	
		158	CAMPY HB30	

	P100	159	CAMPYHB53	
	P101	160	CAMPY 85	
	P102	161	CAMPY 56	
	P103	162	CAMPY 11	
	P104	163	CAMPY 87	
		164	CAMPY 30	
	P106	165	CAMPY3	
	P105	166	CAMPY 57	
	P107	167	CAMPY9	
	P108	168	CAMPY7	
		169	CAMPY1	
	P109	170	CAMPY HB100	
G6	P110	171	CAMPY 26	
		172	CAMPY 25	
	P111	173	CAMPY 34	
	P112	174	CAMPY67	
G7	P114	176	CAMPY 24	
	P113	175	CAMPY HB35	
		177	CAMPYHB91	
		178	CAMPY HB 84	
G8	P116	180	CAMPY 52	
	P115	179	CAMPY HB46	
		181	CAMPY 100	

4.1.3. *C. jejuni* izolatlarının dendrogram ve benzerlik matrisi

İzolatların tamamını içeren dendrogram ve benzerlik matrisi şeması ayrıntılı halde aşağıda görüldüğü şekliyle kesitler halinde incelenmiştir.

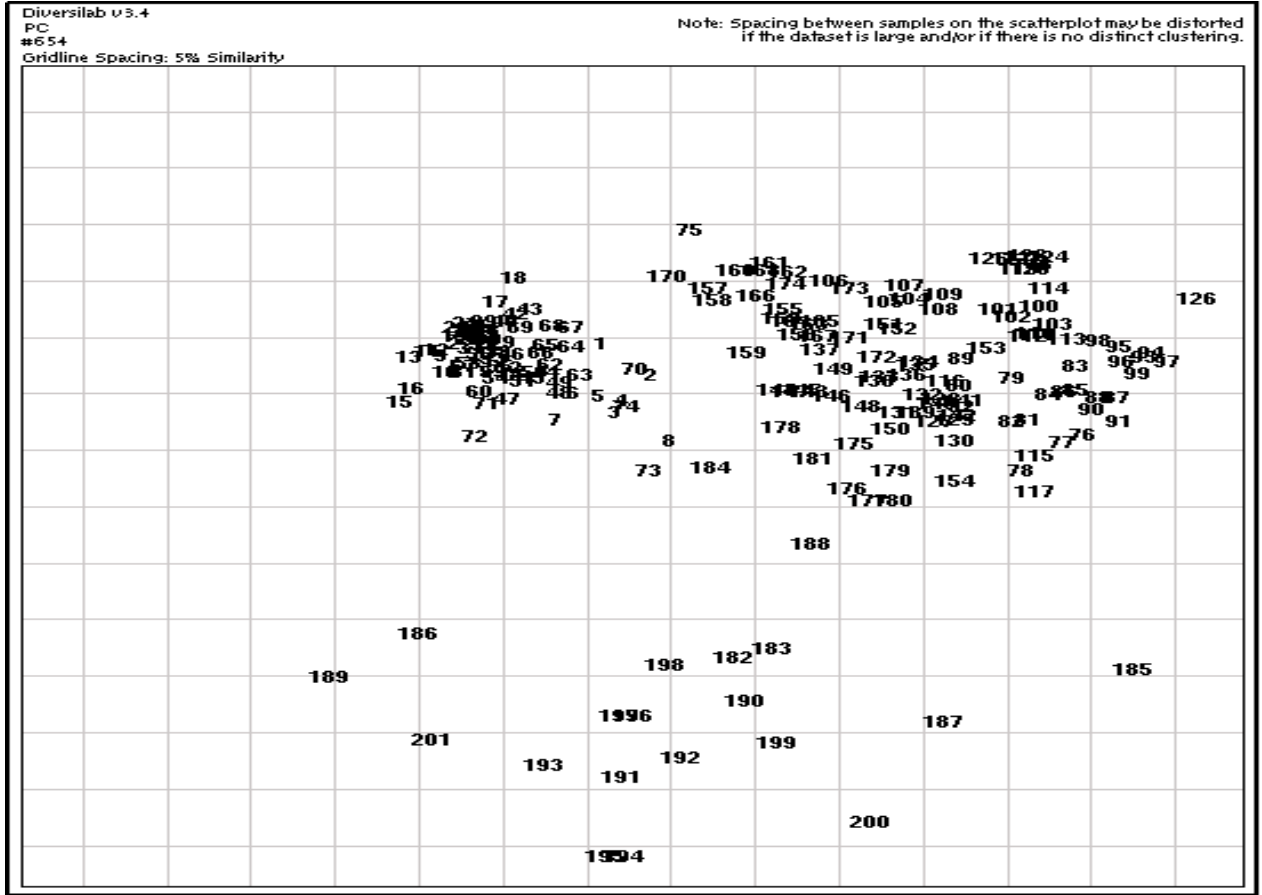


Şekil 5. 17 tavuk ve 7 insan *C. jejuni* izolatının dendrogramı ve benzerlik matrisi



Şekil 6. 5 insan ve 4 tavuk orijinli *C. jejuni* izolatının dendrogramı ve benzerlik matrisi

4.1.4. Rep-PCR’de tavuk ve insan orijinli *C. jejuni* izolatlarının dağılım grafiği



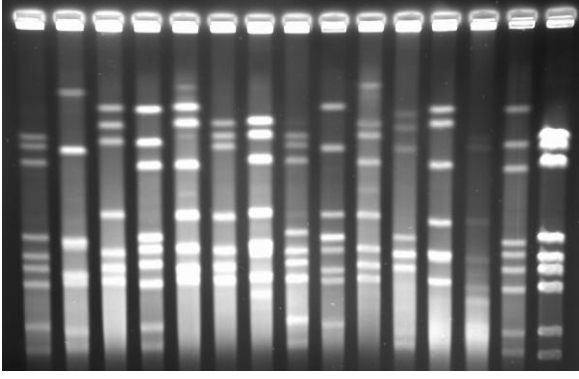
*: 1-100 arası tavuk orijinli izolatlar, 101-201 arası ise insan orijinli izolatları göstermektedir.

Şekil 7. Tavuk ve insan orijinli *C. jejuni* izolatlarının harita dağılımı

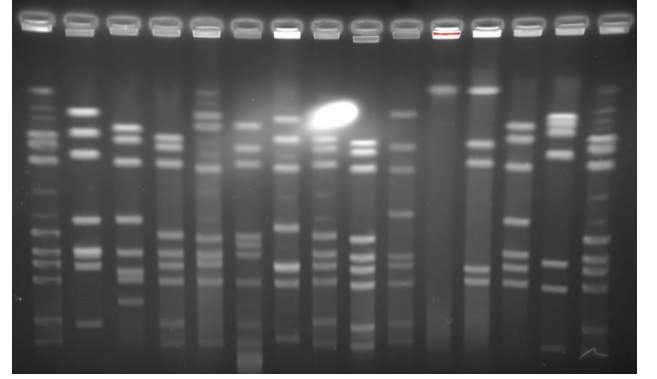
4.2. PFGE Sonuçları

Çalışmaya alınan 200 *C. jejuni* izolatının ancak 174’ü (%87) tiplendirilebildi. İnsan izolatlarının 78’i (78/100), tavuk izolatlarının ise 96’sı (96/100) tiplendirildi. İnsan orijinli *C. jejuni* izolatlarının %22’si (22/100), tavuk izolatlarının ise %4’ü (4/100) PFGE protokolü 3’er defa tekrarlanmasına rağmen tiplendirilememiştir.

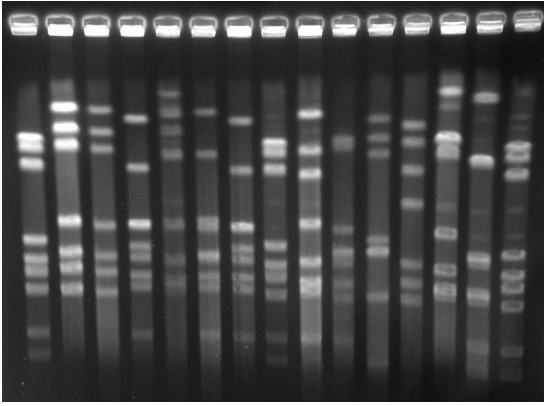
- ✓ Tiplendirilen 174 izolat 115 farklı PFGE profili gösterdi.
- ✓ İzolatların 93’ü (%53) klonal yönden ilişkili bulundu.
- ✓ Klonal yönden ilişkili suşlar;
- ✓ 35 farklı küme içerisinde yer aldı.



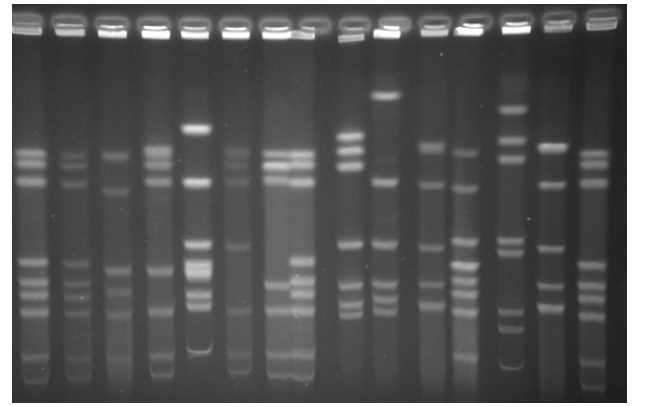
Resim 1.



Resim 3.



Resim 2.



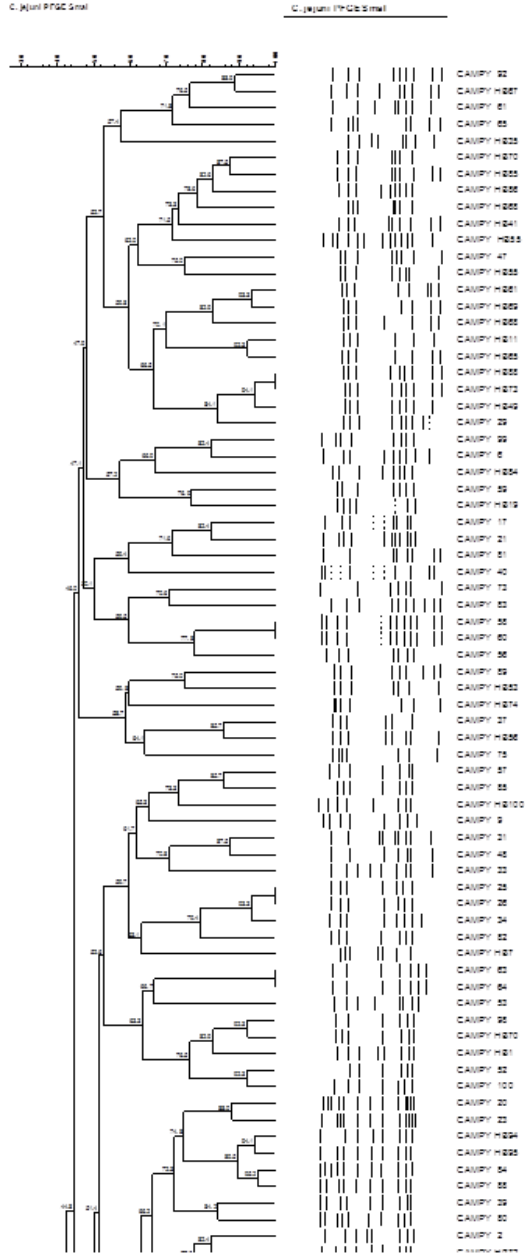
Resim 4.

Resim 1 ve Resim 2: İnsan orijinli *C. jejuni* izolatlarının SmaI PFGE Paternleri. 1. ve sonuncu kuyucuklar Marker'dır.

Resim 3 ve Resim 4: Tavuk orijinli *C. jejuni* izolatlarının SmaI PFGE Paternleri. 1. ve sonuncu kuyucuklar Marker'dır



C. jejuni izolatlarının PFGE’de elde edilen dendrogram analizine ilişkin bir kesit

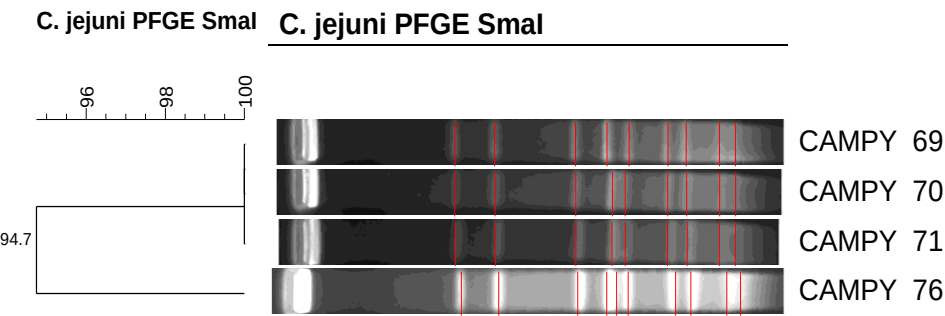


Şekil 8. *C. jejuni* izolatlarının PFGE’de elde edilen dendrogramına ilişkin bir kesit

4.3. PFGE ve REP-PCR sonuçlarının karşılaştırılması

PFGE ile küme içerisinde yer almayan *unique* izolatların tamamı REP-PCR ile de *unique* olarak bulundu. Her iki yöntemle de %100 *identical* olarak bulunan izolatlar aynıydı. Her iki tiplendirme yönteminde de aynı bant paterni veren izolatlara ilişkin resimler aşağıda gösterilmiştir. Çalışmada insan ve tavuk orijinli *C. jejuni* izolatlarının moleküler tiplendirmesinde Rep-PCR ve PFGE yöntemlerinin karşılaştırılmasına ilişkin veriler **Tablo 2.** de verilmiştir.

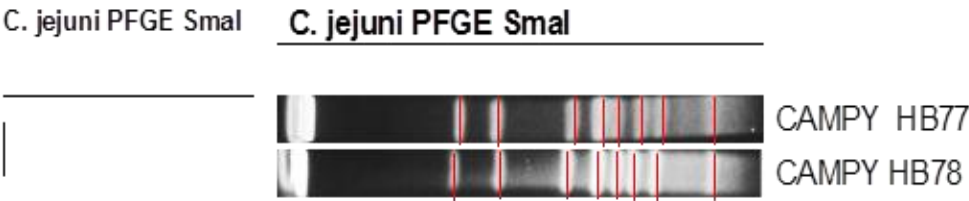
PFGE



REP-PCR

P2	3	CAMPY71	
	4	CAMPY 76	
	5	CAMPY 70	
	6	CAMPY 69	

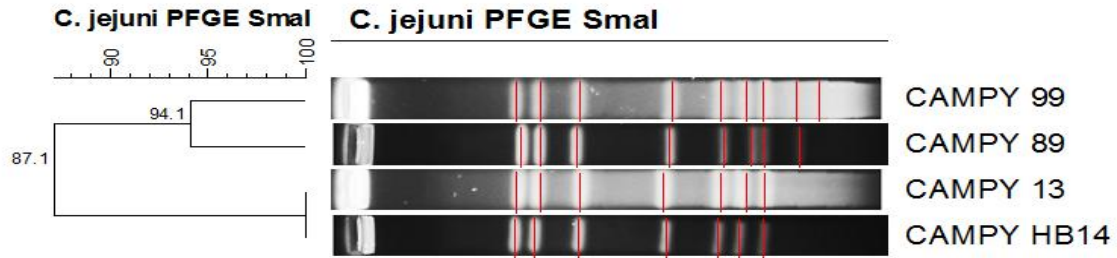
PFGE



REP-PCR

	Key	Sample ID	Normalized Curve	(Show Graphs)
P1	1	CAMPY HB78		
	2	CAMPY HB77		

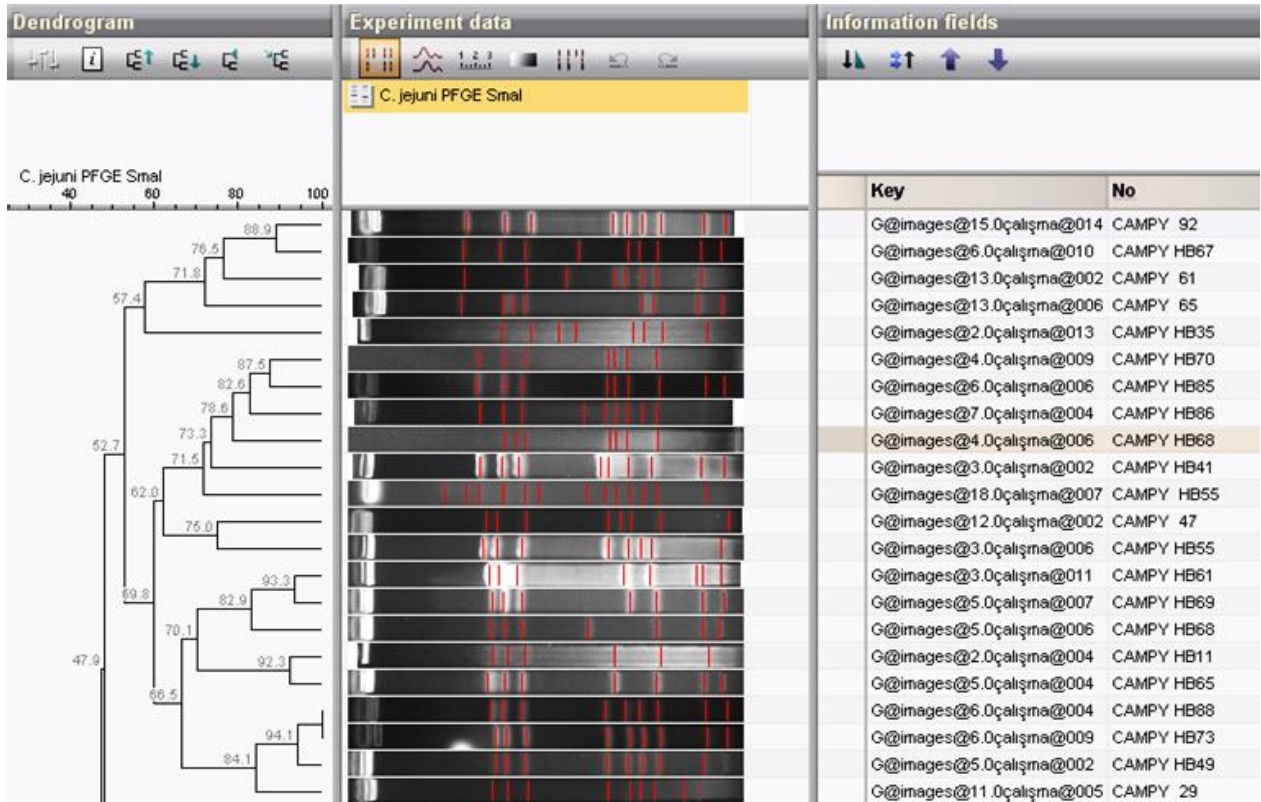
PFGE



REP-PCR

P5	9	CAMPY 99	
	10	CAMPY 13	
	11	CAMPY 89	
	13	CAMPY HB14	

Her iki yöntemde de hangi istatistiksel benzerlik derecesinin klonal ilişkiyi daha iyi gösterdiği net değildir.



Çalışmada kullanılan <i>C. jejuni</i> İzolatları	Rep-PCR	PFGE
	Tiplendirilebilirlik	Tiplendirilebilirlik
Tavuk orijinli (n=100)	% 100	%96
İnsan orijinli (n=100)	% 100	%78

Tablo 2. Çalışmada insan ve tavuk orijinli *C. jejuni* izolatlarının moleküler tiplendirmesinde Rep-PCR ve PFGE yöntemlerinin karşılaştırılması

Antibakteriyel Duyarlılık Test Sonuçları

Çalışmada insan ve tavuk orijinli toplam 200 adet *C. jejuni* izolatının 9 farklı antibakteriyel ajana (AMC: Amoksisilin Klavulonik asit, AMP: Ampisillin, CN: Gentamisin, CIP: Siprofloksasin, ENR: Enrofloksasin, E: Eritromisin, SE: Streptomisin, TE: Tetrasiklin. NA: Nalidiksik Asit) karşı duyarlılıkları disk difüzyon testi ile saptanmış olup orijinlerine göre duyarlı, dirençli ve orta derece duyarlı izolat sayısı Tablo 3. ve Tablo 4.'de verilmiştir.

Disk difüzyon testinde insan ve tavuk orijinli izolatların tamamı gentamisine duyarlı bulundu. Amoksisilin klavulonik asit, eritromisin ve streptomisine duyarlılık oranları %84-%96, %82-%88 ve %96-%98 olarak saptandı. İnsan izolatlarında ampisilin, enrofloksasin nalidiksik asit, siprofloksasin ve tetrasikline %44, %85, %84, %81 ve %38 oranında direnç saptanırken tavuk izolatlarında bu antibiyotiklere direnç oranı %34, %88, %95, %93 ve %56 olarak belirlendi.

Çalışmada kullanılan <i>C. jejuni</i> İzolatları	Test edilen antibiyotikler														
	AMC			AMP			CN			CIP			ENR		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Tavuk orijinli (n=100)	96	-	4	55	11	34	100	-	-	7	-	93	7	5	88
İnsan orijinli (n=100)	84	4	12	51	5	44	100	-	-	16	3	81	8	7	85

Tablo 3. Tavuk ve insan orijinli *C. jejuni* izolatlarının Antibakteriyel Duyarlılık Test Sonuçları (AMC, AMP, CN, CIP, ENR)

AMC: Amoksisilin Klavulonik asit, AMP: Ampisillin, CN: Gentamisin, CIP: Siprofloksasin, ENR: Enrofloksasin

S: Sensitif (duyarlı), I: Intermedier (orta derece duyarlı), R, Rezistant (dirençli)

Çalışmada kullanılan <i>C. jejuni</i> İzolatları	Test edilen antibiyotikler											
	E			NA			SE			TE		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Tavuk orijinli (n=100)	88	5	7	1	4	95	98	-	2	40	4	56
İnsan orijinli (n=100)	82	12	6	15	1	84	96	1	3	62	-	38

Tablo 4. Tavuk ve insan orijinli *C. jejuni* izolatlarının Antibakteriyel Duyarlılık Test Sonuçları (E, SE, TE, NA)

E: Eritromisin, SE: Streptomisin, TE: Tetrasiklin. NA: Nalidiksik Asit, S: Sensitif (duyarlı), I: Intermedier (orta derece duyarlı), R, Rezistant (dirençli)

Tablo 5. Disk diffüzyon testi sonucunda enrofloksasin, siprofloksasin ve eritromisin antibiyotiklerine dirençli saptanan insan ve tavuk orijinli *C. jejuni* sayısı

Antibiyotik	<i>C. jejuni</i>	
	Tavuk	İnsan
Enrofloksasin	88	85
Siprofloksasin	93	81
Eritromisin	7	6

Disk difüzyon testi sonucunda eritromisin, enrofloksasin ve siprofloksasine dirençli saptanan Tablo 5.'de sayıları verilen dirençli *C. jejuni* izolatları için belirtilen üç antibakteriyel ajanın MIC değerini saptamak amacıyla E test yapılmıştır. E test sonucunda insan izolatlarının 62'si enrofloksasin, 70'i de siprofloksasine, tavuk orijinli izolatların ise 70'i enrofloksasin, 78'i de siprofloksasine, dirençli olup MIC değerleri de ≥ 32 ($\mu\text{g ml}^{-1}$) olarak bulundu. Saptanan MIC değerleri Tablo 6. ve Tablo7. de verilmiştir.

İnsan ve tavuk orijinli *C. jejuni* izolatlarının sırasıyla %92'si (92/100), %96'sı (96/100) en az bir, %85'i (85/100), %93'ü (93/100)'ü ise en az iki antibakteriyel ajana karşı dirençli saptandı. İnsan ve tavuk orijinli *C. jejuni* izolatlarında belirlenen çoklu antibiyotik direncine ilişkin veriler Tablo 8. de verilmiştir.

Antimikrobiyal	MİK Aralığı			MİK'e göre <i>C. jejuni</i> izolatlarının sayısı														
	S	I	R	0.002	0.094	0.125	0.25	0.5	1	1.5	2	4	6	8	12	16	32	256
Enrofloksasin (n=88)	<0.25	0.5-1	≥2				3						9	3	3		70	
Siprofloksasin (n=93)	<1	2	≥4				3							6		6	78	
Eritromisin (n=7)	≤8	16	≥32							1	2							4

MİK: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu S: Duyarlı, I: Orta Duyarlı, R: Dirençli

Tablo 6. Tavuk orijinli *C. jejuni* izolatlarının MİK değerlerine göre dağılımı.

Antimikrobiyal	MİK Aralığı			MİK'e göre <i>C. jejuni</i> izolatlarının sayısı															
	S	I	R	0.002	0.094	0.125	0.19	0.25	0.5	0.64	0.94	1	1.5	2	4	8	12	16	32
Enrofloksasin (n=85)	<0.25	0.5-1	≥2		2		3			3	3					6		6	62
Siprofloksasin (n=81)	<1	2	≥4				3	3		3	2								70
Eritromisin (n=6)	≤8	16	≥32									2		2					1

MİK: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu S: Duyarlı, I: Orta Duyarlı, R: Dirençli

Tablo 7. İnsan orijinli *C. jejuni* izolatlarının MİK değerlerine göre dağılımı.

Direnç gözlenen antibiyotik sayısı	Çoklu Direnç Gözlenen Antibiyotikler	C. jejuni İzolatları	
		Tavuk Orijinli	İnsan Orijinli
2	AMP, ENR		1
2	AMP, NA	1	1
2	CIP, NA	2	-
3	CIP, ENR, NA	26	24
3	CIP, NA, TE	1	-
3	ENR, E, NA	-	1
4	AMC, AMP, ENR, TE	-	1
4	AMP, CIP, NA, TE.	1	-
4	AMP, CIP, ENR, NA	6	16
4	CIP, ENR, NA, TE	30	17
5	AMC, AMP, CIP, ENR, NA	1	4
5	AMP, CIP, ENR, E, NA	1	-
5	AMP, CIP, ENR, NA, TE	15	9
5	CIP, ENR, E, NA, TE	1	-
5	CIP, ENR, NA, SE, TE	-	2
6	AMC, AMP, CIP, ENR, E, NA	-	1
6	AMC, AMP, CIP, ENR, NA, TE	1	3
6	AMP, CIP, ENR, E, NA, TE	5	3
7	AMC, AMP, CIP, ENR, E, NA, TE	-	1
7	AMC, AMP, CIP, ENR, NA, SE, TE	2	1



İnsan orijinli *C. jejuni*

izolatlarında direnç



Tavuk orijinli *C. jejuni*

izolatlarında direnç



Tavuk ve insan orijinli
C. jejuni izolatlarında direnç

Tablo 8. İnsan ve tavuk orijinli *C. jejuni* izolatlarında saptanan çoklu antibiyotik direnci

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

PFGE, *Campylobacter* spp'nin genotiplendirilmesi amacıyla kullanılan metotların içerisinde ayrım gücü oldukça yüksek bir tekniktir. Bununla birlikte PFGE'nin ayrım gücünün tiplendirilecek mikroorganizmaya ve kullanılan restriksiyon enzimlerine (*SalI*, *KpnI*, *SacII*, *SmaI*, ve *BamHI*) de bağlı olduğu bildirilmektedir (On ve ark 1998; Ge ve ark.. 2006). PFGE, insan (Ono ve ark. 2003, Magnusson ve ark. 2011; Eyles ve ark. 2006) ve hayvan klinik örnekleri (Acke ve ark. 2010; Sahin ve ark. 2012), taşıyıcılık (Acke ve ark. 2010; Damborg ve ark. 2004; Saito ve ark 2005), kontaminasyon (Saito ve ark 2005, Ono ve ark. 2003) ve çevresel örneklerden (Eyles ve ark. 2006, Denis ve ark 2011) ayrılan *C. jejuni*'nin moleküler karakterizasyonunu içeren epidemiyolojik çalışmalar amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Nitekim, İrlanda'da yapılan bir çalışmada 60 köpek, 17 kedi ve 2 hamsterden izole edilen toplam 79 *C. jejuni* izolatının kendi içlerindeki genetik homolojilerini incelemek amacıyla PFGE kullanılmış ve toplamda 52 band paterni elde edilmiş, bu paternler %53.8 oranında birbirine benzer bulunmuştur (Acke ve ark. 2010). Damborg ve ark. (2004) insan ve köpek orijinli *C. jejuni* izolatlarının PFGE profillerinin >% 95 oranında benzer olduğunu bildirmişlerdir. Eyles ve ark. (2006) insan ve akarsu orijinli toplam 187 *C. jejuni* izolatının PFGE ile genotiplendirilmesinde su ve insan izolatları arasında yakınlık bulamamışlardır. Denis ve ark. (2011) Fransa'da akarsulardan izole edilen *C. jejuni* izolatları ile insan, domuz ve kanatlı izolatlarının genetik yakınlıklarına ilişkin yaptıkları çalışmada PFGE metodunu kullanmışlardır. Araştırmacılar çalışmada toplam 297 *C. jejuni* izolatı kullanmışlar ve 42'si unique olmak üzere 46 farklı PFGE profili elde etmişlerdir. Sahin ve ark. (2012) koyun abortlarından izole edilen tetrasikline dirençli *C. jejuni* izolatları ile insan klinik orijinli *C. jejuni* izolatlarının moleküler benzerliğine ilişkin olarak PFGE metodunu kullandıklarında bu kaynaklara ait klonların yakın benzerliğe sahip olduklarını rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda, 200 *C. jejuni* izolatının ancak 174'ü (%87) tiplendirilebildi. insan izolatlarının 78'i (78/100), tavuk izolatlarının ise 96'sı (96/100) tiplendirildi. Tiplendirilen 174 izolat 115 farklı PFGE profili gösterdi. İzolatların 93'ü (%53) klonal yönden ilişkili bulundu. Klonal yönden ilişkili suşlar; 35 farklı küme içerisinde yer aldı.

Ragimbeau ve ark. (2008), Lüksemburgda yaptıkları çalışmada 48 sığır, 36 kanatlı ve 124 insan orijinli toplam 208 *C. jejuni* izolatının *SmaI* enzimi ile PFGE analizinde 200 izolatda 121 farklı genotip elde etmişler, izolatların 65 PFGE kümesinde bulunduğunu ve 29 kümenin sadece birer izolat içerdiğini bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar insan ve tavuk orijinli izolatlarda

sığır izolatlarına göre daha fazla genotipik patern elde etmişler ancak klonal olarak üç kaynağında ilişkili olduğunu, tavuk etinin insan *Campylobacter* infeksiyonları için kaynak olduğunu ve sığır orijinli campylobacterlerin de insan infeksiyonları açısından önemli rol oynadığını bildirmişlerdir. **Melero ve ark. (2012)** iki broiler kümesinin birinden 122 diğerinden 106 *C. jejuni* izole etmişler ve SmaI enzimi ile sırasıyla 17 ve 13 PFGE paterni elde ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, kanatlı etlerinde kesim aşamasından tüketime kadar olan prosesde son ürünün çapraz bulaşmasında birden fazla kaynağın rol oynadığını rapor etmişlerdir. **Denis ve ark. (2009)** Fransa’da 151 insan ve 182 kanatlı orijinli *C. jejuni* izolatının PFGE analizinde kanatlı ve insan izolatlarını da içeren 47 küme elde etmişlerdir. Kanatlı ve insan *C. jejuni* izolatlarındaki bu identik durum ile insan *Campylobacteriosis* olgularında kanatlıların rolünü vurgulamışlardır. Çalışmamızda da insan ve tavuk orijinli *C. jejuni* izolatlarında saptanan klonal ilişki tavuk etinin insanlarda bu etkenden ileri gelen infeksiyonlarda önemli rolü olduğunu desteklemektedir.

Japonya’da **Ono ve ark. (2003)**; tarafından yürütülen bir çalışmada ise insan ve tavuk orijinli 154 *C. jejuni* ve 14 *C. coli* izolatının genotiplendirilmesinde PFGE kullanılmıştır. Araştırmacılar, çalışmada kullanılan izolatların birbirlerinden oldukça farklı olduklarını ayrıca bir insan ve bir tavuk izolatının benzer olduğunu bildirmişlerdir. **Wardak ve Jagielski (2009)** tarafından Polonya’da yapılan bir çalışmada PFGE, ERIC-PCR, PCR-flaA-RFLP ve MLST olmak üzere 4 moleküler tiplendirme yöntemini kullanmışlar, 128 insan klinik *C. jejuni* izolatında 117 PFGE profili elde etmişlerdir. Araştırmacılar, ülkenin farklı bölgelerindeki klinik vakalardan izole edilen ayırtedilemez oranda benzer *C. jejuni* izolatlarının yanı sıra, *Campylobacter* spp.’lerde yüksek oranda genotipik farklılık saptamışlardır. **Hanninen ve ark. (1998)** Finlandiya’da hasta insanlardan izole edilen 176 *C. jejuni* izolatının PFGE analizinde 69 PFGE paterni ve izolatların üçte birinde unique band paterni elde etmişlerdir. Araştırmacılar küçük çaplı salgınlarda identik PFGE paternleri saptamışlar ve salgının genel bir infeksiyon kaynağı nedeniyle oluştuğunu vurgulamışlardır.

O’Reilly ve ark. (2006), Avustralya’da insan klinik orijinli 84 *C. jejuni* izolatının alttiplendirilmesi için PFGE’nin de bulunduğu 6 genotiplendirme metodu kullanmışlar ve PFGE’nin ayırım gücü en yüksek metot olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda PFGE analizinde enzim olarak SmaI enzimi kullanılmış ve insan orijinli *C. jejuni* izolatlarının %22’si tavuk izolatlarının ise %4’ü PFGE protokolü 3’er defa tekrarlanmasına rağmen tiplendirilememiştir. Bu durumun sebebinin makrorestriksiyon için SmaI enziminin kullanılması olabileceği kanaatindeyiz. Nitekim, **Praakle-amin ve ark (2007)**, tavuk

karkaslarından izole etmiş oldukları 64 *C. jejuni*, 4 *C.coli* ve 2 *Campylobacter* spp. olmak üzere toplam 70 *Campylobacter* spp. izolatının PFGE analizinde *SmaI* ve *KpnI* enzimi kullanarak sırasıyla 29 ve 34 PFGE paterni elde etmişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarında 5 adet *Campylobacter* spp. izolatını *SmaI* enzimi ile kesemediklerini *KpnI* enziminin daha ayırıcı özellikte olduğunu da bildirmişlerdir. Yine **Magnusson ve ark. (2011)** insan, gıda, çevre ve hayvan orijinli 584 *C. jejuni* izolatının genetik analizinde *SmaI* enzimi ile PFGE'yi kullanmışlar ve insan izolatlarının tavuk ve sığır izolatları ile identik olduğunu, 45 izolatın tiplendirilemediğini ve 144 PFGE paterni elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Testte kullanılan enzimin PFGE sonuçlarını etkilediği göz önünde bulundurulduğunda (**On ve ark 1998; Ge ve ark., 2006**). Çalışmamızda tiplendirilemeyen izolatların farklı bir enzim kullanılarak PFGE analizine tabi tutulması gerektiği düşüncesindeyiz.

Yurdumuzda ise *Campylobacter* spp.'nin PFGE ile moleküler tiplendirilmesine ilişkin 1 adet makale (**Çokal 2011**) ve bu makalenin verilerini kapsayan 1 adet kongre sunumu dışında herhangi bir çalışma veya rapor bulunmamaktadır.

Çalışmada insan ve tavuk orijinli toplam 200 adet *C. jejuni* izolatının 9 farklı antibakteriyel ajana karşı duyarlılıkları da disk diffüzyon testi ile analiz edilmiştir. İnsan ve tavuk orijinli izolatların tamamı gentamisine duyarlı bulunmuştur. Amoksisilin klavulonik asit, eritromisin ve streptomisine duyarlılık oranları %84-%96, %82-%88 ve %96-%98 olarak saptanmıştır. İnsan izolatlarında ampisilin, enrofloksasin nalidiksik asit, siprofloksasin ve tetrasikline %44, %85, %84, %81 ve %38 oranında direnç saptanırken tavuk izolatlarında bu antibiyotiklere direnç oranı %34, %88, %95, %93 ve %56 olarak belirlenmiştir. İnsan ve tavuk orijinli *C. jejuni* izolatlarının sırasıyla %92'si (92/100), %96'sı (96/100) en az bir, %85'i (85/100), %93'ü (93/100)'ü ise en az iki antibakteriyel ajana karşı dirençli saptanmıştır. Çalışmada yüksek oranda görülen çoklu antibiyotik direncine bağlı olarak genotiplendirme sonuçları ve antibiyotik direnci arasında düşük seviyede bir uyum saptanmıştır. Aynı şekilde **Han ve ark. (2007)** kanatlı etlerinden izole ettikleri 170 *C. jejuni* izolatının *SmaI* enzimi ile PFGE analizinde 73 pulsotype saptadıklarını bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar 116 *C. jejuni* izolatının 7 antibakteriyel ajana karşı duyarlılığını incelemişler ve bütün izolatların en az bir antibakteriyeye dirençli olduğunu, izolatların çoğunluğunun tetrasiklin, nalidiksik asit ve siprofloksasine karşı dirençli iken eritromisin, kloramfenikol ve gentamisine duyarlı olduğunu genotipik tiplendirme ve antibiyotik rezistans durumu arasındaki ilişkinin düşük olduğunu bunun sebebinin ise birden çok antibiyotiğe direnç bulunmasından kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Yine çalışmamızın bulguları ile uyumlu olarak **Zhang ve ark. (2010)** 30 kanatlı, 63 insan klinik *C.jejuni* izolatının *SmaI* enzimi kullanarak PFGE analizinde 53 pulsotype elde etmişler ve her iki orijinden izolatların klonal olarak ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar 44 *C. jejuni* izolatının antibakteriyel duyarlılık testi sonucunda tamamının eritromisin, gentamisin ve streptomisine duyarlı iken nalidiksik asit, levofloksasin ve siprofloksasine dirençli olduğunu bildirmişlerdir. **Rönner ve ark. (2005)** 49'u İsveç, 32'si Tailand'dan alınan toplam 81 insan klinik izolatı ile İsveç'te 51 sağlıklı tavuktan izole edilen *C.jejuni* izolatının PFGE analizinde 8 PFGE grubu elde etmişler, İsveç orijinli insan izolatları ile tavuk izolatlarını klonal olarak ilişkili bulurken 2 PFGE grubunda Tailand ve İsveç insan izolatlarının benzer olduğunu saptamışlardır. Ayrıca araştırmacılar izolatların antibiyotik direnç profilleri ile PFGE profilleri arasında korrelasyon olmadığını bildirmişlerdir. **Cardinale ve ark. (2006)**, 10 insan ve 99 tavuk orijinli *C. jejuni* izolatının PFGE analizinde benzer patternler elde etmişlerdir. İzolatların antibakteriyel duyarlılık test sonucunda ise kanatlı izolatlarında yüksek oranda kinolon direnci belirlemişlerdir. Ayrıca araştırmacılar antimikrobiyal direnç profilleri ile PFGE profilleri arasında bir ilişki saptayamamışlardır.

Pekçok araştırmacının *C. jejuni*'nin antibiyotik direnci ile ilgili olarak bildirdikleri ile uyumlu olarak çalışmamızda da *C. jejuni* izolatlarında enrofloksasin, nalidiksik asit ve siprofloksasin gibi kinolon grubu antibiyotiklere, tetrasiklin ve ampisiline yüksek oranda direnç saptanmıştır. Yine çalışmamızda izolatların tamamı gentamisine ve büyük çoğunluğu da streptomisin, amoksisilin klavulonik asit ve eritromisine duyarlı bulunmuştur. **(Steinhauserova ve Mikulicova 2005; Rahimi ve ark., 2010; Senok ve ark., 2007; Salihu ve ark., 2012; Kos ve ark., 2006; Miflin ve ark., 2007; Wieczorek ve ark., 2012).** **Steinhauserova ve Mikulicova (2005)**, tarafından Çek Cumhuriyeti'nde yapılan bir çalışmada 121 kanatlı, 85 insan orijinli *C. jejuni* izolatının antibakteriyel duyarlılık testi sonucunda sırasıyla %59 ve %69 oranında siprofloksasine dirençli, her iki grup izolatın nalidiksik asite ise %30 dirençli olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar antibakteriyel direnç durumunun insan ve kanatlılarda diğer ülkelere benzer şekilde artış gösterdiğini bildirmişlerdir. **Rahimi ve ark. (2010)** kanatlı karkaslarından izole ettikleri 177 *C. jejuni* izolatında tetrasiklin, siprofloksasin, nalidiksik asit ve enrofloksasine sırasıyla %79.7, %67.2, %59.3 ve %48 oranında direnç saptamışlardır. **Salihu ve ark. (2012)** Nijerya'da yaptıkları bir çalışmada broiler orijinli 70 *C. jejuni* izolatının ampisilin, siprofloksasin ve tetrasikline sırasıyla %38.6, %21.4 ve %18.6 oranında dirençli olduğunu ayrıca izolatların %14.3'ünün tek bir antibiyotiğe, % 24.3'ünün iki antibiyotiğe, % 40'ının ise ikiden fazla antibiyotiğe karşı

dirençli olduğunu bildirmişlerdir. **Senok ve ark. (2007)** tarafından Sudan’da 117 insan ve 33 tavuk *C. jejuni* izolatında %80’in üzerinde siprofloksasine direnç, tavuk izolatlarında önemli derecede insan izolatlarına göre tetrasikline direnç belirlemişler, sadece iki insan izolatı haricinde bütün izolatların eritromisine duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. **Kos ve ark. (2006)** kanatlı orijinli 104 *C. jejuni* izolatını tetrasiklin, nalidiksik asit ve siprofloksasine sırasıyla %69, %11 ve %8 oranında dirençli saptamışlar, bütün izolatların ise gentamisin ve eritromisine duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. **Miflin ve ark. (2007)** broiler orijinli 125 *C. jejuni* izolatının disk difüzyon testi ile % 18.4’ünün tetrasikline, %17.6’sının ampisiline dirençli olduğunu, tüm izolatların eritromisine duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. **Wieczorek ve ark. (2012)** Polonya’da tavuk karkaslarından izole ettikleri 122 *C. jejuni* izolatının % 91’inin siprofloksasine, %89.3’ünün nalidiksik asite, % 49.1’inin de tetrasikline dirençli olduğunu, aynı zamanda izolatların tümünün eritromisin ve gentamisine duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

Otomatize Rep-PCR ile ilgili olarak literatür taramalarımızda yalnızca **Behringer ve ark. 2011** tarafından yapılan bir çalışma bulunmuştur. **Behringer ve ark. 2011** *flaA*-RFLP, otomatize Rep-PCR, PFGE ve MLST olmak üzere 4 moleküler tiplendirme metodunu kullanarak broyler orijinli 100 adet *Campylobacter* spp. izolatını moleküler analize tabi tutmuşlar ve tüm metodların tiplendirmede benzer sonuç verdiğini ayrıca DNA ekstraksiyon metodunun önemli olduğunu vurgulamışlardır. Bilgilerimize göre bu çalışma otomatize Rep-PCR ve PFGE’nin bir arada yapıldığı ve kıyaslandığı tek çalışmadır. Araştırmacılar bu çalışmada izolatların *SmaI* enzimi kullanılarak PFGE ile 32 farklı alt tip, %96 oranında tiplendirilebilirlik, otomatize Rep-PCR ile de 29 farklı profil ve %100 oranında tiplendirilebilirlik saptadıklarını bildirmişlerdir. Çalışmamızda tavuk orijinli *C. jejuni* izolatlarının tiplendirilebilirliği PFGE ile %96, Rep-PCR ile de %100 bulunmuştur. Bu sonuçların, Behringer ve ark.’nın sonuçları ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda kullanılan her iki moleküler tiplendirme yönteminin sonuçlarının büyük oranda uyumlu olduğu belirlenmiştir. Moleküler tiplendirme sonuçlarına göre, baskın bir salgın suşu tespit edilememiştir. Ancak insan ve tavuk orijinli *C. jejuni* izolatları arasında saptanan klonal yakınlık oranları, bu etkenden ileri gelen infeksiyonlarda tavuk etinin önemli rolü olduğunu desteklemektedir. Yine çalışmamızda PFGE ve Rep-PCR yöntemlerinin insan ve tavuk orijinli *C. jejuni* izolatlarını genotiplendirmede kullanılabilir, uygun iki metod olduğu ancak Rep-PCR’ın elde edilen band patern sayısı, izolatların tiplendirilebilirliği ve oluşturduğu

küme sayısı açısından değerlendirildiğinde PFGE'ye göre genotiplendirmede daha etkili bir metot olduğu düşünülmektedir.

Çalışmada elde edilen bir diğer önemli sonuç ise izolatlarda yüksek oranda görülen çoklu antibiyotik direncine bağlı olarak genotiplendirme ve antibiyotik direnç profilleri arasında düşük seviyede bir uyum saptanmasıdır. Tavuk ve insan orijinli *C. jejuni* izolatlarında kinolon grubu antibiyotiklere yüksek oranda direnç saptanmıştır. Bu direnç göz önünde bulundurularak insanlarda *C. jejuni*'den ileri gelen infeksiyonların tedavisinde kullanılan eritromisinin yanında amoksisilin klavulonik asit ve streptomisinin de tedavi seçeneği içerisinde yer alabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Acke E, McGill K, Golden O, Jones BR, Fanning S, Whyte P.** Prevalence of thermophilic *Campylobacter* species in household cats and dogs in Ireland. *Vet Rec.* 2009;164: 44-47.
- Acke E, McGill K, Lawlor A, Jones BR, Fanning S, Whyte P.** Genetic diversity among *Campylobacter jejuni* isolates from pets in Ireland. *Vet Rec.* 2010; 166(4):102-6.
- Alterkuse SF, Hunt JM, Tollefson LK, Madden JM.** Food and animal sources of human *Campylobacter jejuni* infection. *J Am Vet Med Assoc.* 1994; 204:57-61.
- Alterkuse SF, Stern NJ, Fields PI, Swardlow DL.** *Campylobacter jejuni* – an emerging foodborne pathogen. *Emerg Infect Dis.* 1999;5: 28-35.
- Atabay HI, Corry JEL.** The prevalence of campylobacters and arcobacters in broiler chickens. *J Appl Microbiol.* 1997; 83:619-626.
- Aydın F, Atabay HI, Akan M.** The isolation and characterization of *Campylobacter jejuni* subsp.jejuni from domestic geese (*Anser anser*). *J Appl Microbiol.* 2001; 90: 637-642.
- Aydın F, Gümüşsoy S, Iça T, Sümerkan B, Eşel D, Akan M, Özdemir A.** The prevalence of *Campylobacter jejuni* in various sources in Kayseri, Turkey, and molecular analysis of isolated strains by PCR-RFLP. *Türk J Vet Anim Sci.* 2007;31:13-19.
- Barbuddhe S, Hain T, Chakraborty T.** The Genus *Listeria* p:549, In: *Practical Handbook of Microbiology*, Ed. Goldman E, Green LH. Second Edition, CRC Press, 2006, Ed: Goldman E, Green LH, USA.
- Basım E, Basım H.** Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) technique and its use in Molecular Biology. *Turk J Biol* 2001; 25: 405-418.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turek M.** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J Clin Pathol.* 1966; 45:493-496.
- Behringer M, Miller WG, Oyarbazal OA.** Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from live broilers and retail broiler meat by *flaA*-RFLP, MLST, PFGE and REP-PCR. *J Microbiol Meth.* 2011; 84:194-201.
- Bostan K, Aydın A, Ang MK.** Prevalence and antibiotic susceptibility of thermophilic *Campylobacter* species on beef, mutton, and chicken carcasses in Istanbul, Turkey. *Microb Drug Resist.* 2009; 15(2):143-149.
- Broman T, Waldenstrom J, Dahlgren D, Carlsson I, Eliasson I, Olsen B.** Diversities and similarities in PFGE profiles of *Campylobacter jejuni* isolated from migrating birds and humans. *J Appl Microbiol.* 2004;96:834–843.

Butzler PJ. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. Clin Microbiol Infect Dis. 2004;10:868-876.

Cardinale E, Rose V, Perrier Gros-Claude JD, Tall F, Rivoal K, Mead G, Salvat G. Genetic characterization and antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. isolated from poultry and humans in Senegal. J Appl Microbiol. 2006;100(1):209-17.

CLSI 2008, Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard-third edition m31-a3 vol. 28 no. 8 replaces m31-a2 vol. 22 no. 6.

CLSI 2010, Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline-second edition m45-a2 vol.30 no.18 replaces m45-a vol.26 no.19.

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

Çokal Y, Caner V, Şen A, Çetin C, Telli M. The presence of *Campylobacter jejuni* in broiler houses: Results of a longitudinal study. African Journal of Microbiology Research. 2011; 5(4):389-393.

Damborg P, Olsen KEP, Nielsen EM, Guardabassi L. Occurrence of *Campylobacter jejuni* in pets living with human patients infected with *C. jejuni*. J. Clin. Microbiol.,2004; 42:1363-1364.

De Bruyne L, On SL, De Brandt E, Vandamme P. Novel *Campylobacter lari*-like bacteria from humans and molluscs: description of *Campylobacter peloridis* sp. nov., *Campylobacter lari* subsp. *concheus* subsp. nov. and *Campylobacter lari* subsp. *lari* subsp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2009;59:1126-1132.

De Bruyne, L Broman, T Bergström S, Olsen B, On SL, Vandamme P. *Campylobacter subantarcticus* sp. nov., isolated from birds in the sub-Antarctic region. Int J Syst Evol Microbiol.2010;60:815-819.

Denis M, Chidaine B, Laisney MJ, Kempf I, Rivoal K, Mégraud F, Fravallo P. Comparison of genetic profiles of *Campylobacter* strains isolated from poultry, pig and *Campylobacter* human infections in Brittany, France. Pathol Biol (Paris). 2009;57(1):23-9. doi: 10.1016/j.patbio.2008.04.007.

Denis M, M Tanguy, Chidaine B, Laisney MJ, Mégraud F, Fravallo P. Description and sources of contamination by *Campylobacter* spp. of river water destined for human

consumption in Brittany, France. *Pathol Biol.* 2011; 59(5):256-63. doi: 10.1016/j.patbio.2009.10.007.

Diker KS, Istanbuluoglu E. Ovine abortion associated with *Campylobacter jejuni*. *Vet Rec.* 1986;118: 307.

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

Erganiş O, Yanarates A. İshalli buzağı ve çocuklardan izole edilen *Campylobacter*lerin identifikasyonları ile antibiyotiklere duyarlılıkları üzerine çalışmalar. *Bülten Dif.* 1995;5:8-10.

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

Eyles RF, Brooks HJL, Townsend CR, Burtenshaw GA, Heng NCK, Jack RW, Weinstein P. Comparison of *Campylobacter jejuni* PFGE and Penner subtypes in human infections and in water samples from the Taieri River catchment of New Zealand. *J Appl Microbiol.* 2006;101: 18–25.

Fluit AA, Terlingen AM, Andriessen L, Ikawaty R, VanMansfeld R, Top J, Cohen Stuart, JM, Leverstein-van Hall, MA, Boel CHE. Evaluation of the DiversiLab System for Detection of Hospital Outbreaks of Infections by Different Bacterial Species. *Journal of Clinical Microbiology.* 2010;48 (11):3979-3989.

Foster G, Holmes B, Steigerwalt AG, Lawson PA, Thorne P, Byrer DE, Ross H, Xerry J, Thompson PM, Collins MD. *Campylobacter insulaenigrae* sp. nov., isolated from marine mammals. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004;54: 2369-2373.

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

Ge B, Girard W, Zhao S, Friedman S, Gaines SA, Meng J. Genotyping of *Campylobacter* spp. from retail meats by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. *J Appl Microbiol.* 2006;100(1):175-84.

- Gormley FJ, MacRae M, Forbes KJ, Ogden ID., Dallas JF, Strachan NJC.** Has Retail Chicken Played a Role in the Decline of Human *Campylobacteriosis*?. Appl Environ Microbiol. 2008; 74(2): 383–390.
- Gurgan T, Diker KS.** Abortion associated with *Campylobacter upsaliensis*. J Clin Microbiol. 1994; 32(12):3093-3094.
- Han K, Jang SS, Choo E, Heu S, Ryu S.** Prevalence, genetic diversity, and antibiotic resistance patterns of *Campylobacter jejuni* from retail raw chickens in Korea. Int J Food Microbiol. 2007 114(1):50-9.
- Hänninen ML, Pajarre S, Klossner ML, Rautelin H.** Typing of human *Campylobacter jejuni* isolates in Finland by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol. 1998; 36(6):1787-9.
- Healy M, Huang J, Bittner T, Lising M, Frye S, Raza S, Schrock R, Manry J, Renwick A, Nieto R, Woods C, Versalovic J, James R. and Lupski JR.** Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. J Clin Microbiol 2005; 43,199-207.
- Hudson AJ, Nicol C, Wright J, Whyte R, Hasell KS.** Seasonal variation of *Campylobacter* types from human cases, veterinary cases, raw chicken, milk and water. J Appl Microbiol. 1999;87,115-124.
- Humphrey T, O'Brien S, Madsen M.** Campylobacters as zoonotic pathogens: A food production perspective. Int J Food Prot. 2007; 117; 237-257.
- Inglis GD, Hoar BM, Whiteside DP, Morck DW.** *Campylobacter canadensis* sp. nov., from captive whooping cranes in Canada. Int J Syst Evol Microbiol. 2007; 57:2636-2644.
- Ishihara K, Yamamoto T, Satake S, Takayama S, Kubota S, Negishi H, Kojima A, Asai T, Sawada T, Takahashi T, Tamura Y.** Comparison of *Campylobacter* isolated from humans and food-producing animals in Japan. J Appl Microbiol. 2006; 100:153-160.
- Jannes G, De Vos D.** A Review of Current and Future Molecular Diagnostic Tests for Use in the Microbiology Laboratory p:12, In: Methods in Molecular Biology, vol. 345: Diagnostic Bacteriology Protocols, Second Edition Edited by: L. O'Connor, Humana Press Inc., Totowa, N, 2006, USA.
- Joonbae H, Man KJ, Woo Kyung J. et al.** Prevalence and Antibiotic Resistance of *Campylobacter* spp. Isolated from Chicken Meat, Pork, and Beef in Korea, from 2001 to 2006. J. Food Protect. 2007; 70(4):860-866.

- Karagiannis I, Sideroglou T, Gkolfinopoulou K, Tsouri A, Lampousaki D, Velonakis EN, Scoulica EV, Mellou K, Panagiotopoulos T, Bonovas S.** A waterborne *Campylobacter jejuni* outbreak on a Greek island. *Epidemiol Infect.* 2010;138(12):1726-34. doi: 10.1017/S0950268810002116.
- Kim JM, Hong J, Bae W, Koo HC, Kim SH, Park YH.** Prevalence, antibiograms, and transferable tet(O) plasmid of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from raw chicken, pork, and human clinical cases in Korea. *J Food Prot.* 2010;73(8):1430-7.
- Kiuchi A, Hara M, Pham HS, Takikawa K, Itoh R, Tabuchi K.** Detection and investigation of *Campylobacter jejuni* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. *Microbios.* 2000;102, 159-164.
- Kos VN, Keelan M, Taylor DE.** Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* isolates from poultry from Alberta, Canada. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(2):778-80.
- Lehner A, Schneck C, Feierl G, Pless P, Deutz A, Brandl E, Wagner M.** Epidemiologic application of pulsed-field gel electrophoresis to an outbreak of *Campylobacter jejuni* in an Austrian youth centre. *Epidemiol Infect.* 2000; 125(1):13-6.
- Lior H.** New extended biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, ‘*Campylobacter laridis*’. *J Clin Microbiol.* 1984; 20: 636-640.
- Liu D.** Identification, subtyping and virulence determinant of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J Med Microbiol* 2006; 55: 645-659.
- Magnússon SH, Guðmundsdóttir S, Reynisson E, Rúnarsson AR, Harðardóttir H, Gunnarson E, Georgsson F, Reiersen J, Marteinson VT.** Comparison of *Campylobacter jejuni* isolates from human, food, veterinary and environmental sources in Iceland using PFGE, MLST and fla-SVR sequencing. *J Appl Microbiol.* 2011;111(4):971-81.
- Melero B, Juntunen P, Hänninen ML, Jaime I, Rovira J.** Tracing *Campylobacter jejuni* strains along the poultry meat production chain from farm to retail by pulsed-field gel electrophoresis, and the antimicrobial resistance of isolates. *Food Microbiol.* 2012; 32(1):124-8. doi: 10.1016/j.fm.2012.04.020.
- Miflin JK, Templeton JM, Blackall PJ.** Antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from poultry in the South-East Queensland region. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59(4):775-8.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 8th ed. Approved standard NCCLS document M2-A8. NCCLS, Wayne, PA. (2003).

National Committee for Clinical Laboratory Standards NCCLS. Performance standards for antimicrobials disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard-second edition. M31-A2 vol. 22 No. 6,(2002).

Nelson JM, Chiller TM, Powers JH, Angulo FJ. Fluoroquinolone-Resistant *Campylobacter* Species and the Withdrawal of Fluoroquinolones from Use in Poultry: A Public Health Success Story. Clin Infect Dis. 2007; 44:977–80.

Nielsen EM, Engberg J, Fussing V, Petersen L, Brogren CH, On SLW. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry and cattle. J Clin Microbiol. 2000; 38 (10):3800-3810.

On SL, Nielsen EM, Engberg J, Madsen M. Validity of *Sma*I-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *Sal*I, *Kpn*I, and *Bam*HI polymorphisms: evidence of identical clones infecting humans, poultry and cattle. Epidemiol Infect. 1998; 120(3):231-7.

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

Ono K, Kurazono T, Niwa H, Itoh K. Comparison of three methods for epidemiological typing of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. Curr Microbiol. 2003; 47(5):364-71.

O'Reilly LC, Inglis TJ, Unicomb L. Australian *Campylobacter* Subtyping Study Group. Australian multicentre comparison of subtyping methods for the investigation of *Campylobacter* infection. Epidemiol Infect. 2006;134(4):768-79.

Oyarzabal OA, Conner DE, Hoerr FJ. Incidence of campylobacters in the intestine of avian species in Alabama. Avian Dis. 1995; 39:147-151.

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

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

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

- Praakle-Amin K, Roasto M, Korkeala H, Hannien ML.** PFGE genotyping and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* in retail poultry meat in Estonia. *Int J Food Microbiol.* 2007; 114:105-112.
- Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR.** *Campylobacter* species. In *Clinical Veterinary Microbiology* ed. Quinn PJ., Carter ME, Markey B. and Carter GR. pp. 268-272, (1998).
- Ragimbeau C, Schneider F, Losch S, Even J, Mossong J.** Multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and fla short variable region typing of clonal complexes of *Campylobacter jejuni* strains of human, bovine, and poultry origins in Luxembourg. *Appl Environ Microbiol.* 2008 74(24):7715-22. doi: 10.1128/AEM.00865-08.
- Rahimi E, Momtaz H, Ameri M, Ghasemian-Safaei H, Ali-Kasemi M.** Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolated from chicken carcasses during processing in Iran. *Poult Sci.* 2010;89(5):1015-20. doi: 10.3382/ps.2009-00090.
- Ratkai C, Peixe LV, Grosso F, Freitas AR, Antunes P, Fodor L, Hajdú E, Nagy E.** Successful application of the DiversiLab repetitive-sequence-based PCR typing system for confirmation of the circulation of a multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospital wards. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010; 67: 202-206.
- Rautelin H, Jusufović J, Hanninen ML.** Identification of hippurat-negative thermophilic campylobacters. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1999; 35: 9-12.
- Ribot EM, Fitzgerald C, Kubota K, Swaminathan B, Baret TJ.** Rapid pulsed field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol.* 2001; 39 (5):1889-1894.
- Robinson DA.** Epidemiological Methods in Microbiology, p:206, In: *Practical Handbook of Microbiology*, Second Edition, CRC Press, 2006, Ed: Goldman E, Green LH, USA.
- Rossi M, Debruyne L, Zannoni RG, Manfreda G, Revez J, Vandamme P.** *Campylobacter avium* sp. nov., a hippurate-positive species isolated from poultry. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009; 59:2364-2369.
- Roussel S, Félix B, Colanéri C, Vignaud M, Dao TT, Marault M. and Brisabois A.** Semi-Automated Repetitive-Sequence-Based Polymerase Chain Reaction Compared to Pulsed-Field Gel Electrophoresis for *Listeria monocytogenes* subtyping. *Foodborne Pathog Dis.* 2010; 7:1005-1012.

Rönner AC, Borch E, Kaijser B. Genetic profiling of *Campylobacter jejuni* strains from humans infected in Sweden or in Thailand, and from healthy Swedish chickens, studied by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Scand J Infect Dis. 2005;37(8):579-584.

Sahin O, Fitzgerald C, Stroika S, Zhao S, Sippy RJ, Kwan P, Plummer PJ, Han J, Yaeger MJ, Zhang Q. Molecular Evidence for Zoonotic Transmission of an Emergent, Highly Pathogenic *Campylobacter jejuni* Clone in the United States. J Clin Microbiol. 2012; 50(3): 680-687.

Salihu MD, Junaidu AU, Magaji AA, Yakubu Y. Prevalence and Antimicrobial Resistance of Thermophilic *Campylobacter* Isolates from Commercial Broiler Flocks in Sokoto, Nigeria. Research Journal of Veterinary Sciences 2012; 5(2): 51-58.

Saito S, Yatsuyanagi J, Harata S, Ito Y, Shinagawa K, Suzuki N, Amano K, Enomoto K. *Campylobacter jejuni* isolated from retail poultry meat, bovine feces and bile and human diarrheal samples in Japan: comparison of serotypes and genotypes. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005; 45(2):311-9.

Senok A, Yousif A, Mazi W, Sharaf E, Bindayna K, Elnima el-A, Botta G. Pattern of antibiotic susceptibility in *Campylobacter jejuni* isolates of human and poultry origin. Jpn J Infect Dis. 2007; 60(1):1-4.

Serichantalergs O, Pootong P, Dalsgaard A, Bodhidatta L, Guerry P, Tribble DR, Anuras S, Mason CJ. PFGE, Lior serotype, and antimicrobial resistance patterns among *Campylobacter jejuni* isolated from travelers and US military personnel with acute diarrhea in Thailand, 1998-2003. Gut Pathogens. 2010; 2;15: 1-11.

Shutt CK, Pounder JI, Page SR, Schaecher BJ, Woods GL. Clinical evaluation of the DiversiLab microbial typing system using repetitive-sequence-based PCR for characterization of *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol. 2005; 43: 1187-92.

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

Smith SI, Olukoya DK, Fox AJ, Coker AO. Genotyping of clinical and chicken isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Cytobios. 2000; 103: 91-101.

Steinhauserová I, Mikulicova M. The evaluation of antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* strains of poultry and human origin. Proceedings of the XVII European Symposium on the Quality of Poultry Meat and XI European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products, Golden Tulip Parkhotel Doorwerth, Doorwerth, Netherlands, 23-26 May 2005 2005 pp. 200-204

Tadesse DA, Bahnson PB, Funk JA, Thakur S, Morrow WE, Wittum T, DeGraves F, Rajala-Schultz P, Gebreyes WA. Prevalence and antimicrobial resistance profile of *Campylobacter* spp. isolated from conventional and antimicrobial-free swine production systems from different U.S. regions. *Foodborne Pathog Dis.* 2011;8(3):367-74.

The EFSA Journal <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/732.pdf> Technical Guidance Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *The EFSA journal.* 2008; 732:1-15.

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

Wang G, Clark CG, Taylor TM, Pucknell C, Barton C, Price L, Woodward DL, Rodgers FG. Colony Multiplex PCR Assay for Identification and Differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *Fetus*. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 4744–4747.

Wardak S, Jagielski M. Evaluation of genotypic and phenotypic methods for the differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* clinical isolates from Poland. II. PFGE, ERIC-PCR, PCR-flaA-RFLP and MLST. *Med Dosw Mikrobiol.* 2009;61(1):63-77.

Wassenaar TM, Newell DG. Genotyping of *Campylobacter* spp.. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66 (1):1-9.

Wieczorek K, Szewczyk R, Osek J. Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolated from retail raw meat in Poland *Veterinarni Medicina*, 57, 2012 (6): 293–299.

Wolfs TFW, Duim B, Geelen SPM, Rigter A, Thomson-Carter F, Fleer A, Wagenaar JA. Neonatal Sepsis by *Campylobacter jejuni*: Genetically Proven Transmission from a Household Puppy. *Clin Infect Dis.* 2001; 32 (5):97–99.

Wu F, Della-Latta P. Pulsed Field Gel Electrophoresis Part 9 pp 143-157, In:Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology, Ed: Tang YW, Stratton CW, Springer 2006, USA

Yıldırım MS, Sümerkan B, Fazlı ŞA. Dışkı kültürlerinden izole edilen *Campylobacter* türlerinin antimikrobiyal ajanlara duyarlılıkları. *ANKEM Derg.* 1996; 10(4): 393-398.

Yogasundram K, Shane SM, Harrington KS. Prevalence of *Campylobacter jejuni* in selected domestic and wild birds in Louisiana. *Avian Dis.* 1989; 33: 664-667.

Zanoni RG, Debruyne L, Rossi M, Revez J, Vandamme P. *Campylobacter cuniculorum* sp. nov., from rabbits. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59; 2009:1666-1671.

Zhang M, Gu Y, He L, Ran L, Xia S, Han X, Li H, Zhou H, Cui Z, Zhang J. Molecular typing and antimicrobial susceptibility profiles of *Campylobacter jejuni* isolates from north China. J Med Microbiol. 2010;1171-7.