

Campylobacter Türlerinin Fenotipik Yöntemler ve Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılıkları

Identification of *Campylobacter* spp. Isolates with Phenotypic Methods and Multiplex Polymerase Chain Reaction and Their Antibiotic Susceptibilities

Tuba KAYMAN¹, Seçil ABAY², Harun HIZLISOY²

¹ Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Kayseri.

¹ Kayseri Education and Research Hospital, Microbiology Laboratory, Kayseri, Turkey

² Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

² Erciyes University Faculty of Veterinary, Department of Microbiology, Kayseri, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 09.09.2012 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 30.11.2012

ÖZET

Bu çalışmada, termofilik *Campylobacter* türlerinin akut gastroenterit olgularından izolasyon sıklığının belirlenmesi, fenotipik ve moleküler yöntemlerle tanımlanması ve çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının saptanması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Mart 2010-Mart 2011 tarihleri arasında hastanemize başvuran ishali hastalardan alınarak laboratuvarımıza gönderilen 3287 dışkı örneği dahil edilmiştir. Örneklerden termofilik *Campylobacter* spp. izolasyonu amacıyla, sefoperazon, amfoterisin B ve teikoplanin eklenmiş *Campylobacter* Blood-free Selective Medium (modified CCDA-Preston, Oxoid CM739, İngiltere) kullanılmış; kültürler 42°C'de mikroaerofilik ortamda 72-96 saat süreyle inkübe edilmiştir. Fenotipik tanımlamada, koloni morfolojisi, Gram boyama, oksidaz testi, katalaz testi ve faz-kontrast mikroskopunda hareket incelemesi yapılmıştır. Fenotipik testlerle tanımlanan termofilik *Campylobacter* spp. izolatlarının cins ve tür düzeyinde tanımlamaları ayrıca multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (mPCR) ile gerçekleştirilmiştir. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle araştırılmış ve sonuçlar CLSI önerileri doğrultusunda değerlendirilmiştir. Gastroenteritli olguların %5.4 (179/3287)'ünün dışkı örneğinden termofilik *Campylobacter* spp. izole edilmiştir. *Campylobacter* pozitif olguların %71 (127/179)'inin çocuk ve %58 (104/179)'inin erkek olgular olduğu izlenmiştir. *Campylobacter* spp. prevalansı çocuklarda %7.5 (127/1683), yetişkinlerde ise %3.2 (52/1604) olarak saptanmıştır. Fenotipik testler ile 179 izolatın 146 (%82)'sı *C.jejuni*, 24 (%13)'ü *C.coli*, 6 (%3)'sü *C.lari* ve 3 (%2)'ü *C.upsaliensis* olarak saptanmıştır. Buna karşın mPCR ile izolatların %85 (152/179)'i *C.jejuni*, %15 (27/179)'i ise *C.coli* olarak tür düzeyinde tanımlan-

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Tuba Kayman, Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, 38010 Kocasinan, Kayseri, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 352 336 8884/1232, **E-posta (E-mail):** tubakayman@hotmail.com

miştir. Fenotipik yöntemlerle *C.lari* olarak tanımlanan altı izolatin, mPCR ile üçü *C.jejuni*, üçü *C.coli*; *C.upsaliensis* olarak tanımlanan üç izolatin ise ikisi *C.jejuni*, biri *C.coli* olarak belirlenmiş; fenotipik yöntemle *C.coli* olarak tanımlanan bir izolat mPCR'de *C.jejuni* olarak saptanmıştır. İzolatların trimetoprim-sülfametoksazol, nalidiksik asit, levofloksasin, siprofloksasin, ampisilin, sefotaksim, piperasilin-tazobaktam, tetrasiklin, klindamisin, amikasin ve eritromisine direnç oranları sırasıyla %92.6, %79.5, %75.6, %73.9, %40.3, %35, %33.4, %24, %14.6, %11.2 ve %6.3 olarak bulunmuştur. On üç aylık süreçte izole edilen suşların mevsimsel dağılımı incelendiğinde, en yüksek izolasyon oranlarının Mart-Haziran (ortalama %66) döneminde olduğu görülmüştür. Çalışmamızda, gerek prevalans gerekse antibiyotik direnç oranlarıyla ilgili elde edilen veriler, gastroenterit olgularında *Campylobacter* türlerinin önemini ortaya koymaktadır. Bu nedenle rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında gastroenterit etkenlerinin araştırılmasında *Campylobacter* spp. için de kültür yapılması ve izolatların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenerek klinisyenlerin yönlendirilmesi önerilmektedir. Ayrıca fenotipik testlerin, *Campylobacter*'lerin cins düzeyinde tanımlanmasında yeterli olduğu, ancak tür düzeyinde kesin tanı için moleküler testlerin kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Campylobacter* türleri; gastroenterit; fenotipik testler; multipleks polimeraz zincir reaksiyonu; antibiyotik duyarlılık.

ABSTRACT

The aims of this study were to detect the frequency of isolation of thermophilic *Campylobacter* spp. from acute gastroenteritis cases by phenotypic and molecular methods and to evaluate the antibiotic susceptibilities of the isolates. A total of 3287 stool samples obtained from diarrheal patients who were admitted to Kayseri Training and Research Hospital, Kayseri, Turkey, between March 2010 - March 2011 and sent to the microbiology laboratory, were included in the study. Cefoperazone, amphotericin B and teicoplanin (CAT) supplemented *Campylobacter* Blood-free Selective Medium (modified CCDA-Preston, Oxoid CM739, UK) was used for the isolation of *Campylobacter* spp. The media inoculated with stool samples were incubated at 42°C microaerobically for 72 to 96 hours. The genus and species level identifications of the thermophilic *Campylobacter* spp. isolates defined by phenotypic tests were carried out with multiplex polymerase chain reaction (mPCR). Antibiotic susceptibilities of the isolates were detected by disc diffusion method and the results were evaluated according to the CLSI guidelines. The thermophilic *Campylobacter* spp. were isolated from 5.4% (179/3287) of the patients' stool samples. Of *Campylobacter* positive cases 71% (127/179) were children and 58% (104/179) were male. The prevalence rate was estimated as 7.5% (127/1683) for children and 3.2% (52/1604) for adults. Of the isolates, 146 (82%) were identified as *C.jejuni*, 24 (13%) were *C.coli*, 6 (3%) were *C.lari* and 3 (2%) were *C.upsaliensis* with phenotypic tests. By using mPCR, 152 (85%) and 27 (15%) of 179 isolates were identified as *C.jejuni* and *C.coli*, respectively. Three of the six isolates identified as *C.lari* by the phenotypic methods were identified as *C.jejuni* and the remaining three as *C.coli* by mPCR. Phenotypically identified three *C.upsaliensis* isolates were shown to be *C.jejuni* (n= 2) and *C.coli* (n= 1). On the other hand one *C.coli* isolate was found to be *C.jejuni* by mPCR. The rates of resistance of the isolates were 92.6% for trimethoprim-sulfamethoxazole, 79.5% for nalidixic acid, 75.6% for levofloxacin, 73.9% for ciprofloxacin, 40.3% for ampicillin, 35% for cefotaxime, 33.4% for piperacillin-tazobactam, 24% for tetracycline, 14.6% for clindamycin, 11.2% for amikacin and 6.3% for erythromycin. During the 13 months study period, the highest isolation rates were detected between March-June (mean rate 66%). Our data concerning the prevalence and antibiotic resistance rates revealed the significance of campylobacters in gastroenteritis cases. Therefore, specific microbiological isolation and identification methods should be applied in routine microbiology laboratories to investigate the presence of campylobacters in gastroenteritis etiology. Besides, determination of the antibiotic susceptibilities of the isolates on routine basis should be encouraged to help to guide the antimicrobial treatment approaches in case of gastroenteritis. The results of this study also indicated that phenotypic tests were adequate for the identification of campylobacters at the genus-level, however, for accurate identification at the species level and for reliable epidemiological data molecular analysis might be added to the detailed identification procedures.

Key words: *Campylobacter* spp.; gastroenteritis; phenotypic tests; multiplex polymerase chain reaction; antibiotic susceptibility.

GİRİŞ

Epsilonproteobacteria sınıfında bulunan *Campylobacter* cinsi günümüzde altı alt tür ve üç biovar olmak üzere toplam 18 tür içermektedir¹. Bu cinste yer alan *Campylobacter jejuni*, *C.coli*, *C.lari* ve *C.upsaliensis* genel olarak termofilik kampilobakterler olarak adlandırılır ve başta endüstrileşmiş ülkeler olmak üzere tüm dünyada gastroenteritlerin önemli etkenleri arasındadır. Bu grupta baskın tür olan *C.jejuni* ishal, ateş ve karın ağrısı gibi semptomlarla karakterize akut enfeksiyona yol açar. Bununla birlikte *C.jejuni*, reaktif artrit ile Miller-Fisher ve Guillain-Barre sendromlarını içeren nörolojik komplikasyonlara da neden olmaktadır^{2,3}.

Gıda kaynaklı olan *Campylobacter* enfeksiyonları için en önemli bulaş yolu kontamine et, süt ve suyun tüketilmesidir. Bunun yanı sıra evcil hayvanlar, vahşi kanatlılar ve vahşi hayvanlar da enfeksiyon kaynağıdır ve taşıyıcı hayvanlarla direkt temasla da bulaş gerçekleşmektedir²⁻⁴. *Campylobacter* türleri, gastroenterit olgularından, ülkelere ve bölgele-re göre değişik oranlarda izole edilmektedir. Gelişmiş ülkelerde olgu sayısı 13/100.000 iken, gelişmekte olan ülkelere %5-20 oranında prevalans bildirilmektedir^{2,3}. Hastalığın laboratuvar tanısı direkt mikroskopi ve kültürle yapılmakta, izole edilen bakteriler fenotipik ve moleküler testlerle tür düzeyinde tanımlanmaktadır. Ancak fenotipik testler tür düzeyinde tanımlama için her zaman yeterli ve güvenilir sonuç vermemektedir. Bu çalışmada, akut gastroenterit olgularından izole edilen termofilik *Campylobacter* spp. izolatlarının fenotipik ve moleküler yöntemler kullanılarak tür düzeyinde tanımlanmaları ve in vitro antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Mart 2010-Mart 2011 tarihleri arasında mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen, ishali olan 1821 erkek, 1466 kadın olmak üzere toplam 3287 hastaya ait dışkı örneği dahil edildi. Örneklerden termofilik *Campylobacter* türlerinin izolasyonu ve tanımlanmasında fenotipik ve moleküler yöntemler kullanıldı.

Fenotipik Testler

Dışkı örneklerinden *Campylobacter* spp. izolasyonu amacıyla, sefoperazon, amfoterisin B ve teikoplanin (CAT supplement, Oxoid SR174, İngiltere) ilave edilmiş seçici besiyeri (*Campylobacter* Blood-free Selective Medium; modified CCD Agar-Preston, Oxoid CM739, İngiltere) kullanıldı. Örneklerin besiyerine ekilmesinden sonra, kültürler 42°C'de mikroaerofilik ortamda (Anaerocult C, Merck, Almanya) 72-96 saat inkübe edildi. Modifiye CCD agarda gri-beyaz renkte, metalik röfle veren koloniler seçilerek, Gram boyama, oksidaz testi, katalaz testi ve faz-kontrast mikroskopunda hareket testi uygulandı. Gram boyamada gram-negatif, martı kanadı, spiral şekilli, S ve virgül görünümünde olan, faz-kontrast mikroskopunda hareketli görünen ve katalaz ve oksidaz testleri pozitif olan bakterilerin tümü termofilik *Campylobacter* spp. olarak tanımlandı. Bu izolatlardan hippurat

hidroliz testi pozitif olanlar *C.jejuni* olarak kabul edildi; diğer izolatların tür düzeyinde tanınması H₂S testi, üreaz testi, nalidiksik asit ve sefalotine duyarlılık, nitrat redüksiyonu ve indoksil asetat hidrolizi testleriyle yapıldı^{5,6}.

Moleküler Analiz

Örneklerden DNA ekstraksiyonu amacıyla kaynatma yöntemi kullanıldı. Kısaca; izolatlar Mueller Hinton agarda 37°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra 200 µl steril distile su içerisinde süspansiyon hazırlandı. Elde edilen bakteri süspansiyonu 100°C'de 10 dakika kaynatıldıktan sonra soğutulup 10.000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant, DNaz ve RNaz içermeyen steril ependorf tüplerine alınarak kalıp DNA olarak kullanıldı⁷.

Multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (mPCR), Wang ve arkadaşları⁷ tarafından bildirilen yöntemine göre yapıldı. Ancak termofilik kampilobakterlerin ilk izolasyon ısısı olarak 42°C kullanıldığı için *C.fetus* primer çifti teste dahil edilmedi. Reaksiyon karışımı her bir örnek için; 2.5 µl DNA örneği, 2.5 µl 10x PCR tamponu (Vivantis), 20 mM MgCl₂ (Vivantis), 0.2 mM dNTP karışımı (Vivantis), 0.5 µM *C.jejuni* ve *C.lari*; 1 µM *C.coli*, 2 µM *C.upsaliensis* ve 0.2 µM *Campylobacter* 23S rRNA primerleri (Tablo I) ve 1.25 U Taq polimeraz (Vivantis) içerecek şekilde final konsantrasyonu steril distile su ile 25 µl'ye ayarlanarak hazırlandı. PCR protokolünde inkübasyon, sıcaklık ve süreleri sırasıyla, 95°C'de 6 dakika ön denatürasyonu takiben 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 59°C'de 30 saniye primer bağlanması ve 72°C'de 30 saniye uzama olmak üzere toplam 30 döngü ve 72°C'de 7 dakika son uzamadan oluştu (Touchgene Gradient, Techne, İngiltere). Amplifikasyon sonucunda elde edilen PCR ürünleri %1.5'lik agaroz jelde 90 V gerilimde 70 dakika elektroforez (Thermo EC 330, ABD) işlemine tabi tutulduktan sonra, UVP jel dokümantasyon sistemi (Vilber Lourmat, Fransa) kullanılarak görüntüledi. Bu test sonunda elde edilen bant büyüklüklerine göre tür tanımı yapıldı (Tablo I).

Tablo I. Multipleks PCR'de Kullanılan Primer Dizileri ve Beklenen Bant Büyüklükleri⁷

Hedef gen	Primer	Dizin (5'→3')	Bant büyüklüğü (bp)
<i>C.jejuni</i> hipO	CJF	ACTTCTTTATTGCTTGCTGC	323
	CJR	GCCACAACAAGTAAAGAAGC	
<i>C.coli</i> glyA	CCF	GTAAAACCAAAGCTTATCGTG	126
	CCR	TCCAGCAATGTGTGCAATG	
<i>C.lari</i> glyA	CLF	TAGAGAGATAGCAAAGAGA	251
	CLR	TACACATAATAATCCCACCC	
<i>C.upsaliensis</i> glyA	CUF	AATTGAAACTCTTGCTATCC	204
	CUR	TCATACATTTTACCCGAGCT	
<i>C.jejuni</i> 23S rRNA	23SF	TATACCGGTAAGGAGTGCTGGAG	650
	23SR	ATCAATTAACCTTCGAGCACCG	

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu.

Antibiyotik Duyarlılık Testi

Tür düzeyinde *C.jejuni* ve *C.coli* olarak tanımlanan izolatların çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları, "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)"^{8,9} önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemiyle %5 koyun kanı ilave edilmiş Mueller Hinton agar (Oxoid, İngiltere) kullanılarak saptandı. Duyarlılık testinde, ampisilin (10 µg), amikasin (30 µg), sefotaksim (30 µg), tetrasiklin (30 µg), piperasilin-tazobaktam (100/10 µg), trimetoprim-sülfametoksazol (1.25/23.75 µg), eritromisin (15 µg), klindamisin (2 µg), nalidiksik asit (30 µg), siprofloksasin (5 µg) ve levofloksasin (5 µg) (Oxoid, İngiltere) antibiyotik diskleri kullanıldı. Antibiyogram için bazı izolatların yeniden üretilememesi nedeniyle test edilen suş sayısı farklılık gösterdi.

Araştırmada, hem fenotipik hem de moleküler testlerin uygulanması sırasında *C.jejuni* NCTC 11168 suşu kontrol olarak kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmaya alınan toplam 3287 adet dışkı örneğinin 179 (%5.4)'ü termofilik *Campylobacter* spp. yönünden pozitif bulunmuştur. *Campylobacter* pozitif olguların 127'sinin çocuk, 52'sinin yetişkin ve 104'ünün erkek, 75'inin de kadın olduğu belirlenmiştir. Çocuk olgulardan izole edilen suşların 115'i *C.jejuni*, 12'si *C.coli*; yetişkinlerden izole edilen suşların 37'si *C.jejuni*, 15'i *C.coli* olarak tanımlanmıştır.

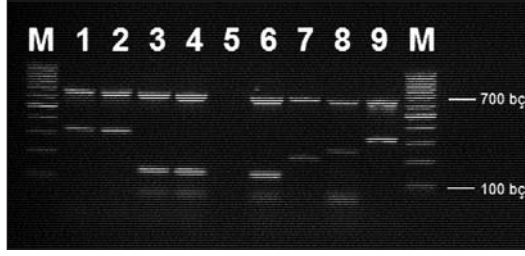
Çalışmamızda fenotipik ve moleküler yöntemlerle tanımlanan *Campylobacter* suşlarının tür dağılımı Tablo II'de gösterilmiştir. Fenotipik testlerle *Campylobacter* spp. olarak tanımlanan izolatların tümünde, mPCR ile *Campylobacter* cinsi ile uyumlu olarak 650 baz çifti (bç) büyüklüğünde bant belirlenmiştir. İzolatların 152'si 323 bç, 27'si ise 126 bç büyüklüğünde bant oluşturarak sırasıyla *C.jejuni* ve *C.coli* olarak tanımlanmıştır (Şekil 1).

Fenotipik yöntemlerle *C.lari* olarak tanımlanan altı izolatın, mPCR'de üçü *C.jejuni* ve üçü *C.coli* olarak saptanırken, *C.upsaliensis* olarak tanımlanan üç izolatın ikisi *C.jejuni*, biri de *C.coli* olarak belirlenmiştir. Yine fenotipik yöntemle *C.coli* olarak tanımlanan bir izolat mPCR'de *C.jejuni* olarak saptanmıştır.

Campylobacter spp. izolatlarının antibiyotik duyarlılık test sonuçları değerlendirildiğinde; trimetoprim-sülfametoksazol, nalidiksik asit, siprofloksasin, levofloksasin, ampisilin, tetrasiklin, amikasin ve eritromisine direnç oranları sırasıyla %92.6, %79.5, %73.9, %75.6, %40.3, %24, %11.2 ve %6.3 olarak bulunmuştur (Tablo III).

Tablo II. *Campylobacter* spp. İzolatlarının Fenotipik ve Moleküler Yöntemlerle Tür Düzeyinde Tanımlama Sonuçları (n= 179)

Yöntem	<i>C.jejuni</i> n (%)	<i>C.coli</i> n (%)	<i>C.lari</i> n (%)	<i>C.upsaliensis</i> n (%)
Fenotipik testler	146 (82)	24 (13)	6 (3)	3 (2)
Moleküler analiz (mPCR)	152 (85)	27 (15)	0	0



Şekil 1. *Campylobacter* türlerine ait mPCR ürünlerinin görüntüsü. M: Moleküler belirteç (Gene RulerTM 100 bç DNA ladder); Hat 1 ve 2: *C.jejuni* klinik izolatları; Hat 3 ve 4: *C.coli* klinik izolatları; Hat 5: Negatif kontrol (steril distile su); Hat 6: *C.coli* pozitif kontrol (126 bç); Hat 7: *C.upsaliensis* pozitif kontrol (204 bç); Hat 8: *C.lari* pozitif kontrol (251 bç); Hat 9: *C.jejuni* pozitif kontrol (323 bç). (650 bç büyüklüğündeki bantlar *Campylobacter* cinsine özgül 23S rRNA'ya aittir).

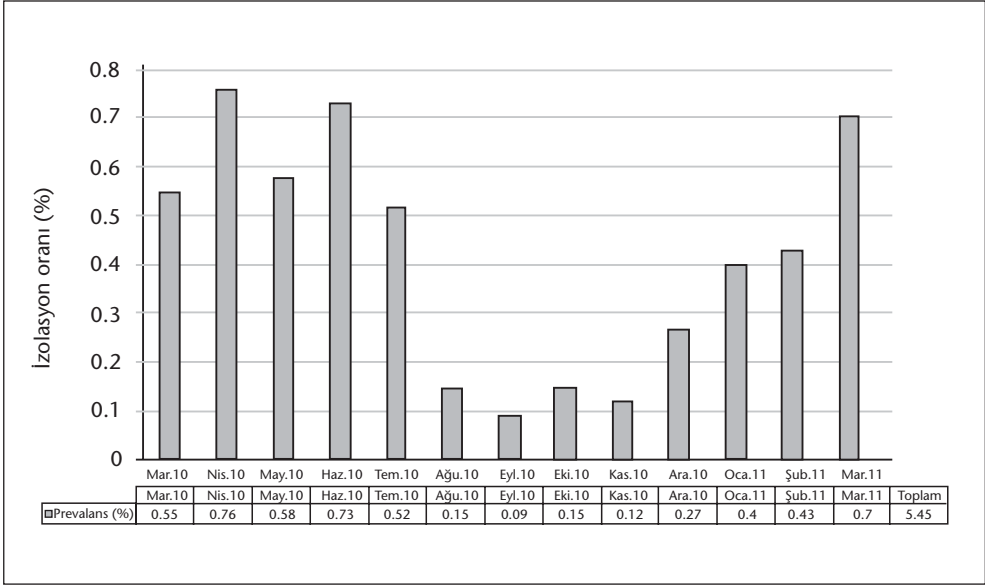
Tablo III. *Campylobacter* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

Antibiyotik	Test edilen izolat sayısı	Duyarlı n (%)	Orta duyarlı n (%)	Dirençli n (%)
Ampisilin	176	92 (52.3)	13 (7.4)	71 (40.3)
Sefotaksim	171	82 (48)	29 (17)	60 (35)
Amikasin	170	151 (88.8)	-	19 (11.2)
Eritromisin	175	164 (93.7)	-	11 (6.3)
Klindamisin	171	133 (77.8)	13 (7.6)	25 (14.6)
Tetrasiklin	175	111 (63.4)	22 (12.6)	42 (24)
Nalidiksik asit	176	30 (17.1)	6 (3.4)	140 (79.5)
Siprofloksasin	176	46 (26.1)	-	130 (73.9)
Levofloksasin	176	38 (21.6)	5 (2.8)	133 (75.6)
Trimetoprim-sülfametoksazol	176	6 (3.4)	7 (4)	163 (92.6)
Piperasilin-tazobaktam	171	78 (45.6)	36 (21)	57 (33.4)

Çalışmamızda 13 aylık dönemde izole edilen *Campylobacter* suşlarının aylara göre dağılımı incelendiğinde, en yüksek izolasyon oranlarının Mart-Haziran döneminde olduğu izlenmiştir (Şekil 2).

TARTIŞMA

Bu çalışmada, gastroenteritli çocuk ve yetişkinlerin dışkı örnekleri termofilik *Campylobacter* spp. varlığı yönünden incelenmiş, izole edilen suşlar fenotipik ve moleküler yöntem kullanılarak tür düzeyinde tanımlanmış ve antibiyotik duyarlılık testleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar, *Campylobacter* türlerinin özellikle gelişmiş batı ülkelerinde bakteriyel gastroenteritler arasında birinci sırada yer aldığını göstermektedir^{2,3}. Yurdumuzda *Campylobacter* enteriti ile ilgili ilk çalışma 1984 yılında Tezcan ve arkadaşları¹⁰ tarafından yapılmış olup, günümüze kadar bu konuda çeşitli araştırmalar yürütülmüştür. Aktaş ve Tuncel'in¹¹ Erzurum'da yaptıkları çalışmada, 63'ü çocuk, 62'si yetişkin olan 125 ishali hasta-



Şekil 2. Termofilik *Campylobacter* spp. izolasyon oranlarının aylara göre dağılımı.

nın 11 (%8.8)'inde *C.jejuni* saptanmış ve prevalans çocuklarda %14, yetişkinlerde ise %6.4 olarak bulunmuştur. Haşçelik ve arkadaşları⁵ Ankara'da çocuk hastalarda *Campylobacter* spp. prevalansını %10.6 (36/340) olarak bildirmişler; Öztürk ve arkadaşları¹² da bu oranı İstanbul'da çocuklarda %6.9, yetişkinlerde %6.1 oranında rapor etmişlerdir. Yıldırım ve arkadaşları¹³, Kayseri'de dışkı örneklerinin %2.3 (48/2127)'ünden; Zarakolu ve arkadaşları¹⁴ Ankara'da ishali çocuk hastaların %6'sından *C.jejuni* izole etmişlerdir. Ülkemizdeki diğer çalışmalarda, Gençler ve arkadaşları¹⁵ Ankara'da 450 gastroenteritli çocuk hastada %7.5; Taş ve Ardıç¹⁶ Ankara'da çocuk hastalarda %4, yetişkinlerde %3; Ateş-Yılmaz ve Tuğrul¹⁷ Edirne'de çocuk hastalarda %9.7, yetişkinlerde %3.3; Öngen ve arkadaşları⁶ İstanbul'da yaş dağılımı bilgisi verilmeyen 6835 hastada %1.2; Güney ve Başustaoğlu¹⁸ ise Ankara'da çocuklarda %3.4 oranında prevalans bildirmişlerdir.

Birçok ülkede yapılan çalışmalarda gastroenterit etiyolojisinde *C.jejuni* başta olmak üzere kampilobakterlerin en sık rastlanan etken olduğu vurgulanmaktadır^{4,19-23}. Hamidian ve arkadaşlarının¹⁹ İran'da yaptıkları çalışmada, ishali hastaların %8.7 (49/562)'sinden *Campylobacter* spp. izole edilmiş; bunların %69.5'i *C.jejuni*, %24.5'i de *C.coli* olarak tanımlanmıştır. İspanya'da yapılan bir çalışmada²⁰, gastroenteritli olgularda %7.4 (641/8636) oranında *Campylobacter* spp. saptanmış; İsviçre'de yapılan bir çalışmada²³ ise gastroenteritli olgularda *Campylobacter* izolasyon sıklığı %8.2 (467/5695) olarak bildirilmiş ve izolatların yaklaşık %90'ının *C.jejuni* olduğu vurgulanmıştır. *Campylobacter* enfeksiyonlarının insidansı İskoçya'da 90.2/100.000, ABD'de ise 12.7/100.000 olgu olarak rapor edilmektedir^{2,21}.

Bizim çalışmamızda, 13 aylık süre boyunca incelenen 3287 dışkı örneğinin 179 (%5.4)'u termofilik *Campylobacter* spp. yönünden pozitif bulunmuş; çocuklarda %7.5

(127/1683), yetişkinlerde ise %3.2 (52/1604) oranında prevalans saptanmıştır. Elde ettiğimiz sonuçların, gerek yurdumuzda gerekse yurt dışında yapılan çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmektedir.

Campylobacter enfeksiyonları için genellikle yaz aylarında prevalansın pik yaptığı ifade edilmektedir^{2,3,5}. Bu çalışmada enfeksiyonların mevsimsel dağılımı incelendiğinde (Şekil 2), ülkemizdeki çalışmalar^{4,10} ile uyumlu olarak yaz aylarında arttığı, bununla birlikte sonbahar ve kış aylarında da görülmeye devam ettiği belirlenmiştir. *Campylobacter* enfeksiyonlarının genellikle çocuk ve genç yetişkinler ile erkeklerde daha sık görüldüğü bildirilmektedir^{2,3,23}. Çalışmamızda bu bilgilerle uyumlu olarak, çocuklardan (127/179; %71) ve erkek cinsiyetteki hastalardan (104/179; %58) daha yüksek oranda izolasyon yapılmıştır.

Campylobacter türleri genellikle fenotipik testlerle tanımlanmakta, ancak biyokimyasal aktivitesinin zayıf olmasından dolayı tür düzeyinde doğru tanımlama için fenotipik testler her zaman yeterli olmamakta ve moleküler analize ihtiyaç duyulmaktadır^{24,25}. Çalışmamızda gastroenteritli olgulardan izole edilen suşlar ilk olarak fenotipik testlerle tür düzeyinde tanımlanmış ve 179 izolatin 146'sı *C.jejuni*, 24'ü *C.coli*, 6'sı *C.lari* ve 3'ü de *C.upsaliensis* olarak belirlenmiştir. Ancak fenotipik testlerle *C.lari* ve *C.upsaliensis* olarak tanımlanan izolatlara mPCR ile *C.jejuni* ve *C.coli* olarak saptanmıştır (Tablo II). Benzer olarak Rautelin ve arkadaşları²⁴ da, hippurat hidroliz testi negatif olan 18 termofilik *Campylobacter* izolatinin beşini PCR yöntemiyle *C.jejuni* olarak tanımlamışlardır.

Antibiyogram sonuçları incelendiğinde, trimetoprim-sülfametoksazole %92.6, nalidiksik aside %79.5, siprofloksasine %73.9 ve levofloksasine %75.6 oranında olmak üzere, genel olarak izolatların yüksek düzeyde bir dirence sahip oldukları görülmektedir (Tablo III). *Campylobacter* enfeksiyonlarının tedavisinde ilk tercih edilen antibiyotik grubu kinolon ve makrolidlerdir. Gastroenterit olgularından izole edilen suşların antibakteriyel duyarlılık çalışmalarında, zaman içerisinde artan bir direnç gelişimi gözlenmektedir. Gür ve arkadaşları²⁶ 1989 yılında yayınlanan çalışmalarında *Campylobacter* izolatlarının tümünü kinolonlara duyarlı bulurken, Akan ve arkadaşları²⁷ 1994 yılında, 119 *Campylobacter* izolatinin sadece birinde kinolon direnci saptamışlardır. Kinolon direncini Yıldırım ve arkadaşları¹³ %26, Öncül ve arkadaşları²⁸ %14, Öngen ve arkadaşları⁶ %59, Güney ve Başustaoğlu¹⁸ ise %64.3 olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda kinolon grubu antibiyotiklere direnç oranı %76.3 olarak bulunmuştur. Cody ve arkadaşlarının²⁹ çalışmasında belirtildiği gibi, ülkemizde de direnç gelişiminin arttığı görülmektedir. Kinolon türevi olan enrofloksasin ve sarafloksasinin veterinerlik alanında enfeksiyondan korunma, hızlı büyüme ve et verimini artırma amacıyla kullanılıyor olmasının, bu direnç gelişimine katkı sağladığı ileri sürülmektedir^{13,18,29,30}.

Eritromisin direncine ilişkin olarak, Öztürk ve arkadaşları¹² %5.2, Yılmaz ve Tuğrul¹⁷ ise *C.jejuni* izolatları (n= 25) için %8, *C.coli* izolatları (n= 6) için %33 oranında sonuç bildirmişlerdir. Güney ve Başustaoğlu¹⁸ yalnızca bir izolatta eritromisin direnci saptarken, ülkemizden yapılan diğer çalışmalarda^{6,13,28} eritromisin direnci tespit edilmemiştir. Bizim çalışmamızda *Campylobacter* izolatlarının eritromisin direnci %6.3 olarak bulunmuştur. Eritromisine karşı saptanan düşük direnç oranı, *Campylobacter* enfeksiyonlarının tedavisinde bu antibiyotiğin ilk seçenek olarak tercih edilebileceğini göstermektedir.

Bazı araştırmacılar^{13,17} *Campylobacter* suşlarında tetrasiklin direnci saptamazken, Öngen ve arkadaşları⁶ yalnız bir izolatta direnç bildirmişler; Güney ve Başustaoğlu¹⁸ ise tetrasikline karşı %35.7 oranında direnç rapor etmişlerdir. Çalışmamızda saptanmış olan %24'lük direnç oranı, ülkemizde bu antibiyotiğe karşı direncin giderek arttığını göstermektedir. Tetrasiklin direnç oranı kinolon direncine göre düşük olmasına rağmen çocuk hastalarda bu antibiyotiğin kontrendike olması, tedavi seçenekleri arasında yer almasını engellemektedir.

Bu çalışmada, gastroenteritli olgulardan izole edilen termofilik *Campylobacter* spp. suşlarının tanımlanmasında fenotipik ve moleküler yöntemler birarada kullanılmıştır. Çalışmamızda, izolatların cins düzeyinde tanımlanmasında fenotipik testlerin yeterli olduğu görülmüş, ancak tür düzeyinde tanımlamada yetersiz kaldığı izlenmiştir. *Campylobacter* izolatlarının tür düzeyinde tanımlanması, enfeksiyon kaynağının belirlenmesi açısından önem taşıdığından, bu amaçla moleküler testlerin uygulanması gereklidir. Sonuç olarak verilerimiz, gastroenterit olgularında *Campylobacter* türlerinin göz ardı edilemeyecek düzeyde olduğunu göstermiş; bu nedenle rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında dışkı kültürlerinin *Campylobacter* türlerini de kapsayacak şekilde yapılması ve izolatların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenerek klinisyenlerin yönlendirilmesi gerektiği düşünülmüştür.

TEŞEKKÜR

Çalışmamızda *Campylobacter* suşlarının izolasyon ve tanımlama aşamalarında desteklerini esirgemeyen Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Fuat Aydın'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Debruyne L, Gevers D, Vandamme P. Taxonomy of the family *Campylobacteriaceae*, pp: 3-26. In: Nachamkin I, Szymansky CM, Blaser MJ (eds), *Campylobacter*. 2008, 3rd ed. ASM Press, Washington, DC.
2. Centers for Disease Control and Prevention. *Campylobacter*, General Information. How common is *Campylobacter*? <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/Campylobacter/>
3. Coker AO, Isokpehi RD, Thomas BN, Amisu KO, Obi CL. Human *Campylobacteriosis* in developing countries. *Emerg Infect Dis* 2002; 8(3): 237-44.
4. Doorduyn Y, Van Den Brandhof WE, Van Duynhoven YT, Breukink BJ, Wagenaar JA, Van Pelt W. Risk factors for indigenous *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections in The Netherlands: a case-control study. *Epidemiol Infect* 2010;138(10): 1391-404.
5. Hascelik G, Akyon Y, Diker S, Berkman E. *Campylobacter enteritis* among Turkish children. *J Islamic Acad Sci* 1989; 2(3): 201-3.
6. Öngen B, Nazik H, Kaya I. Rutin dışkı kültürlerinde üretilen *Campylobacter* türleri ve antibiyotik duyarlılıkları: 5 yıllık sonuçların değerlendirilmesi. *ANKEM* 2007; 21(1): 37-41.
7. Wang G, Clark CG, Taylor TM, et al. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C.coli*, *C.lari*, *C.upsaliensis*, and *C.fetus* subsp. *fetus*. *J Clin Microbiol* 2002; 40(12): 4744-7.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility test of infrequently isolated or fastidious bacteria. Approved Guideline. CLSI Document M45-A, Vol. 26 No.19 Replaces M-45-P Vol. 25 No. 26, 2006. CLSI, Wayne, PA.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 20th Informational Supplement. CLSI Document M100-S20, 2010. CLSI, Wayne, PA.

10. Tezcan İ, Ceyhan M, Diker S, Tuncer AM, Dağlı E, Kinik E. *Campylobacter jejuni* enteriti. Mikrobiyol Bul 1984; 18(1): 23-8.
11. Aktaş O, Tuncel E. Diyareli hastalarda *Campylobacter jejuni* yönünden bir araştırma. Mikrobiyol Bul 1987; 21(2): 79-85.
12. Öztürk R, Midilli K, Okyay K ve ark. Çocuk ve erişkin yaş grubu sürgün olgularında *Campylobacter jejuni* ve *Campylobacter coli* sıklığının araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 1994; 24(1): 42-5.
13. Yıldırım MS, Sümerkan B, Fazlı ŞA. Dışkı kültürlerinden izole edilen *Campylobacter* türlerinin antimikrobiyal ajanlara duyarlılıkları. ANKEM 1996; 10(4): 393-8.
14. Zarakolu P, Aktepe OC, Güvener E. Çocukluk çağı ishallerinde etken olarak *Campylobacter jejuni* sıklığının araştırılması. Mikrobiyol Bul 1999; 33(3): 157-61.
15. Gençler B, Zarakolu P, Kılıç S, Yurdakök K, Güvener E. *Campylobacter jejuni* izolasyonunda kullanılan üç selektif besiyerinin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul 2001; 35(1): 45-52.
16. Taş E, Ardıç N. Akut gastroenteritli olgularda termofilik *Campylobacter*, *Escherichia coli* O157:H7 ve rotavirus sıklığı. Klimik Dergisi 2004; 17(3): 186-90.
17. Yılmaz AT, Tuğrul HM. Edirne'de ishal etkenleri arasında *Campylobacter* türlerinin yerinin ve antimikrobikle duyarlılıklarının araştırılması. İnfeksiyon Derg 2005; 19(1): 53-9.
18. Güney M, Başustaoğlu AC. Gülhane Askeri Tıp Akademisi Eğitim Hastanesi'nde akut bakteriyel gastroenterit etkenleri arasında *Campylobacter jejuni* ve *Campylobacter coli*'nin yeri ve bunların antimikrobiklere duyarlılıklarının araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2010; 40(3): 183-92.
19. Hamidian M, Sanaei M, Azimi-Rad M, Tajbakhsh M, Dabiri H, Zali MR. Fla-typing, RAPD analysis, isolation rate and antimicrobial resistance profile of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* of human origin collected from hospitals in Tehran, Iran. Ann Microbiol 2011; 61(2): 315-21.
20. Sáenz Y, Zarazaga M, Lantero M, Gastanares MJ, Baquero F, Torres C. Antibiotic resistance in *Campylobacter* strains isolated from animals, foods, and humans in Spain in 1997-1998. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44(2): 267-71.
21. Gormley FJ, MacRae M, Forbes KJ, Ogden ID, Dallas JF, Strachan NJ. Has retail chicken played a role in the decline of human *Campylobacteriosis*? Appl Environ Microbiol 2008; 74(2): 383-90.
22. Schönberg-Norio D, Hänninen ML, Katila ML, et al. Activities of telithromycin, erythromycin, fluoroquinolones, and doxycycline against *Campylobacter* strains isolated from Finnish subjects. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(3): 1086-8.
23. Niederer L, Kuhnert P, Egger R, Büttner S, Hachler H, Korczak BM. Genotypes and antibiotic resistances of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from domestic and travel-associated human cases. Appl Environ Microbiol 2012; 78(1): 288-91.
24. Rautelin H, Jusufovic J, Hanninen ML. Identification of hippurat-negative thermophilic *Campylobacters*. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 35(1): 9-12.
25. Nakari UM, Puhakka A, Siitonen A. Correct identification and discrimination between *Campylobacter jejuni* and *C. coli* by a standardized hippurate test and species-specific polymerase chain reaction. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008; 27(7):513-8.
26. Gür D, Haşçelik G, Akyön Y, Akalın HE, Diker S. *Campylobacter jejuni* ve *Campylobacter coli*'nin quinolone grubu antibiyotiklere in vitro duyarlılıkları. Mikrobiyol Bul 1989; 23(3): 185-9.
27. Arkan Akan Ö, Haşçelik G, Akyön Y, Yurdakök K. *Campylobacter* türlerinin çeşitli antibiyotiklere in vitro duyarlılığı. Mikrobiyol Bul 1994; 28(2): 122-6.
28. Oncul O, Zarakolu P, Oncul O, Gur D. Antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter jejuni*: a comparison between Etest and agar dilution method. Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 45(1): 69-71.
29. Cody AJ, Clarke L, Bowler IC, Dingle KE. Ciprofloxacin-resistant *Campylobacteriosis* in the UK. Lancet 2010; 376(9757): 1987.
30. Kittl S, Kuhnert P, Hachler H, Korczak BM. Comparison of genotypes and antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from humans and slaughtered chickens in Switzerland. J Appl Microbiol 2011; 110(2): 513-20.