

Farklı Kesimhanelerden İzole Edilen *Campylobacter* Türlerinin Virülans Genleri, Antibiyotik Duyarlılık Profilleri ve Moleküler Karakterizasyonu

Virulence Genes, Antibiotic Susceptibility Profiles and Molecular Characterization of *Campylobacter* Species Isolated from Different Slaughterhouses

Harun HIZLISOY¹(ID), Serhat AL²(ID), Nurhan ERTAŞ ONMAZ²(ID), Yeliz YILDIRIM²(ID), Zafer GÖNÜLALAN²(ID), Mukaddes BAREL²(ID), Candan GÜNGÖR²(ID), Adalet DIŞHAN²(ID), Hüseyin Burak DİŞLİ³(ID)

¹ Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veteriner Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Kayseri.

¹ Erciyes University Faculty of Veterinary, Department of Veterinary Public Health, Kayseri, Turkey.

² Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Kayseri.

² Erciyes University Faculty of Veterinary, Department of Food Hygiene and Technology, Kayseri, Turkey.

³ Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Hatay.

³ Hatay Mustafa Kemal University Faculty of Veterinary, Department of Food Hygiene and Technology, Hatay, Turkey.

* Bu çalışma, VIII. Ulusal/II. Uluslararası Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi (24-27 Ekim 2019, Antalya)'nde sunulmuştur.

Makale Atfı: Hızlısoy H, Al S, Ertaş Onmaz N, Yıldırım Y, Gönülan Z, Barel M ve ark. Farklı kesimhanelerden izole edilen *Campylobacter* türlerinin virülans genleri, antibiyotik duyarlılık profilleri ve moleküler karakterizasyonu. Mikrobiyol Bul 2020;54(1):11-25.

ÖZ

Bu çalışmada, Kayseri bölgesinde üç farklı kesimhaneden kesim tahtası, kesimhane atık suyu, duvar, bıçak ve karkas örneklerinden; i) *Campylobacter* türlerinin araştırılması, ii) izolatların antibiyotik direnç durumları ile virülans genlerinin ortaya konması, iii) klonal yakınlıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, Kayseri'de 2018 yılında üç farklı kesimhaneden her bir örnek tipinden (bıçak, duvar, kesim tahtası, karkas sürüntü örneği ve kesimhane atık suyu) onar adet olmak üzere toplam 150 numune toplanmıştır. *Campylobacter* türlerinin izolasyonu amacıyla ön zenginleştirmeyi takiben süspansiyonlardan modifiye "charcoal cefoperazone desoxycholate (CCD)" agara ekim yapılmıştır. Besiyerinde gri-beyaz renkteki şüpheli koloniler seçilerek Gram boyama, oksidaz, katalaz ve hareket testi yapılmıştır. *Campylobacter* türlerinin moleküler tanımlanması amacıyla multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (mPCR) uygulanmıştır. Tür düzeyinde tanımlanan izolatların antimikrobiyal duyarlılıkları disk difüzyon testi ve antibiyotik gradient test yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. İzolatlarda virülans genleri (*iam*, *cadF*, *cdtA*, *flaA*, *ceuE*, *cdtC*, *cdtB* ve *virB11*) PCR ile incelenmiştir. Tür düzeyinde belirlenmiş izolatların moleküler tiplendirilmesi "Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR (ERIC-PCR)" ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, kesimhane ortamından alınan 150 örneğin 17 (%11.3)'si *Campylobacter* spp. şüpheli bulunmuş ve izolatlara yapılan fenotipik tanımlama testleri sonucunda izolatların hepsi *Campylobacter* spp. olarak doğrulanmıştır. mPCR incelemesi sonunda izolatların, sekizi *Campylobacter jejuni*, sekizi *Campylobacter fetus* ve biri de *Campylo-*

bacter coli olarak belirlenmiştir. *Campylobacter* türlerinin farklı kaynaklardan izolasyonunda, kesimhane atık suyundaki oranın, diğerlerinden daha yüksek olduğu ($p < 0.001$) ve farklı kaynaklardan elde edilen *Campylobacter* türlerinin oransal dağılımındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Disk difüzyon testi sonucu, *C.jejuni* izolatlarının tamamı siprofloksasine dirençli bulunurken, enrofloksasine direnç %87.5, neomisine direnç %25, amoksisilin-klavulanik asite direnç %25 ve eritromisine direnç %12.5 olarak saptanmıştır. Ayrıca, *C.fetus* izolatlarının amoksisilin-klavulanik asit, neomisin ve gentamisine direnci sırasıyla %25, %25 ve %12.5 olarak tespit edilmiştir. *C.coli* izolatında ise test edilen antibiyotiklere karşı direnç saptanmamıştır. Antibiyotik gradiyent test sonuçları ile disk difüzyon testi bulguları uyumlu bulunmuştur. İncelenen virülans genlerinden *virB11*, izolatların hiçbirinde tespit edilemezken, *iam* geni *C.fetus* ve *C.coli* izolatlarında bulunmamış, *C.jejuni*'de ise yalnız bir izolatta belirlenmiştir. *C.jejuni* izolatlarının altısında *flaA* geni tespit edilmiştir. *C.coli* izolatı ile yedişer *C.jejuni* ve *C.fetus* izolatı *cdtC* geni yönünden pozitif bulunmuştur. *cdtA*, *cdtB*, *ceuE* ve *cadF* genleri, *C.jejuni* izolatlarının tamamında pozitif saptanmıştır. Çalışmada analiz edilen izolatların hepsi birbirinden farklı ERIC-PCR profili göstermiştir. Sonuç olarak, kesimhanelerden izole edilen *Campylobacter* izolatlarının güncel antibiyotiklerin birçoğuna dirençli olduğu ortaya konmuştur. Kesimhane ortamında yüksek virülans özelliklere sahip *Campylobacter* türlerinin bulunması, karkaslar ve dolayısıyla gıdalar vasıtasıyla insanlara etkenin bulaşma riskinden dolayı halk sağlığını tehdit etmektedir. Bu nedenle, kesimhanelerde *Campylobacter* türleri ile kontaminasyonun azaltılması için hijyen kurallarına tam olarak uyulması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik direnci; *Campylobacter* spp.; ERIC-PCR; kesimhane; virülans.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the frequency of *Campylobacter* species, to detect the antibiotic resistance profiles and the virulence genes and to determine the clonal proximity of the isolates in the samples of cutting board, slaughterhouse waste water, wall, knife and carcass from three different slaughterhouses in Kayseri region. For this purpose, a total of 150 samples, 10 of each from knife, wall, cutting board, carcass smear sample and slaughterhouse wastewater were collected from each of the three types of slaughterhouses in 2018 in Kayseri. For the isolation of the *Campylobacter* species, following pre-enrichment, the suspensions were inoculated onto modified charcoal cefoperazone desoxycholate (CCD) agar and were incubated at 37°C under microaerophilic condition for 48-72 hours. Suspicious colonies with gray-white color were recovered and subjected to phenotypical (Gram staining, oxidase, catalase test, and motion test) tests. Multiplex polymerase chain reaction (mPCR) was used for the molecular identification of the *Campylobacter* species. Antimicrobial susceptibilities of the isolates identified at the species level were detected by using the disk diffusion test and antibiotic gradient test. Virulence genes (*iam*, *cadF*, *cdtA*, *flaA*, *ceuE*, *cdtC*, *cdtB* and *virB11*) among the isolates were evaluated by PCR. The molecular typing of the isolates determined at species level was performed by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR (ERIC-PCR). In the study, 17 (11.3%) of the 150 samples taken from the slaughterhouse were found to be suspicious in terms of *Campylobacter* spp. and as a result of phenotypic identification tests, all of the isolates were verified as *Campylobacter* spp.. As a result of mPCR; eight of the isolates were identified as *Campylobacter jejuni*, eight as *Campylobacter fetus* and one as *Campylobacter coli*. The isolation of the *Campylobacter* species from different sources was found to be higher in slaughterhouse wastewater than those of others ($p < 0.001$) and the difference in the proportional distribution of the *Campylobacter* species obtained from various sources was statistically significant ($p < 0.05$). As a result of the disk diffusion test, while, all *C.jejuni* isolates were resistant to ciprofloxacin, 87.5%, 25%, 25% and 12.5% of *C.jejuni* isolates were resistant to enrofloxacin, neomycin, amoxicillin/clavulanic acid, and erythromycin, respectively. In addition, 25%, 25% and 12.5% of *C.fetus* isolates were resistant to amoxicillin/clavulanic acid, neomycin and gentamicin, respectively. *C.coli* isolate was not resistant to any of the antibiotics tested. Antibiotic gradient test results were found to be compatible with the disc diffusion test results. One of the virulence genes examined, *virB11*, was not detected in any of the isolates. Moreover, *iam* gene was not present in *C.fetus* and *C.coli* isolates, but only in one *C.jejuni* isolate. The *flaA* gene was detected in six *C.jejuni* isolates. *C.coli* isolate and seven *C.jejuni* and seven *C.fetus* isolates were positive in terms of the *cdtC* gene. The *cdtA*, *cdtB*, *ceuE* and *cadF* genes were found to be positive in all *C.jejuni* isolates. All isolates analyzed in the study demonstrated different ERIC-PCR profiles. In conclusion, it was shown that *Campylobacter* strains isolated from slaugh-

terhouses were resistant to the most of the current antibiotics. Moreover, the presence of highly virulent *Campylobacters* in the slaughterhouse environment threatens public health due to the risk of contamination of the humans via carcasses and foods. Therefore, it is recommended that strict hygiene rules should be followed to reduce *Campylobacter* species contamination in slaughterhouses.

Keywords: Antibiotic resistance; *Campylobacter* spp.; ERIC-PCR; slaughterhouse; virulence.

GİRİŞ

Gıda kaynaklı gastroenterit olguları genellikle *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp. ve *Escherichia coli* O157:H7 gibi patojen bakterilerden kaynaklanmaktadır¹. Bunlar arasında *Campylobacter* spp. ise dünya genelinde insanlarda görülen gıda kaynaklı bakteriyel hastalıkların en yaygın etkeni olarak rapor edilmektedir². *Campylobacter* türleri, gıda amacıyla üretilen hayvanlar ve insanlar arasında çeşitli yollarla bulaş gösterebilmektedir³. Farklı çalışmalarda, kanatlı etlerinde, yüksek düzeyde *Campylobacter* türlerinin varlığı ortaya konulsa da, sığır ve koyun gibi çiftlik hayvanlarının sindirim sistemlerinin, *Campylobacter* türleri için uygun bir yaşam alanı oluşturduğu bildirilmektedir⁴. *Campylobacter* türleri, bu sayede insanlarda ve hayvanlarda gastrointestinal ve genital enfeksiyonlara neden olabilmektedir⁵.

Campylobacter türleri, insan organizmasına kontamine etlerin tüketimi veya asemptomatik hayvanlardan hazırlanan hayvansal ürünler vasıtası ile giriş yapabilmektedir. *Campylobacter* türleri, kesim, işleme, depolama ve son olarak sofraya kadar ki her aşamada gıdaları kontamine edebilmektedir¹. *Campylobacter* türlerinin neden olduğu birçok enfeksiyon kendini sınırlayıcı özelliktedir ve hastalar genellikle tedaviye gerek kalmadan iyileşebilmektedir. Ancak septisemi, Guillain-Barre sendromu (GBS), irritabl bağırsak sendromu (İBS) ve reaktif artrit (RA) gibi komplike durumlar da oluşabilmektedir⁵.

Campylobacter türlerinin neden olduğu enfeksiyonlarda klinik semptomların çeşitliliğinde konak yanıtına ek olarak etkenin patojenik karakteri de rol oynamaktadır. Bu duruma neden olan hareket, konak hücre adezyonu/invazyonu, hücre ölümü, konak savunmasından kaçış gibi mekanizmalar ve birçok gen bulunmaktadır². Bunlar *flaA* (flajella proteini A), *cadF* (bakterinin fibrinonektine adezyonuna neden olan gen), *virB11* (yapışma ve kolonizasyon geni), *ciaB* (invazyon antijeni), *cdtABC* (sitoletal genişleten toksin A;B;C), *cgtB* (GBS ile ilişkili gen) genleridir⁶.

Bu çalışmada, Kayseri bölgesinde hizmet veren üç farklı kesimhanede karkaslar ile kesimhane ortamına ait çeşitli örneklerde *Campylobacter* türlerinin araştırılması, tanımlanan izolatların antibiyotik direnç profillerinin ve virülans genlerinin ortaya konulması ve bunun yanı sıra izolatların klonal yakınlıklarının belirlenerek kontaminasyon varlığının saptanması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Örneklerin Toplanması

Bu çalışmada, Haziran-Ağustos 2018 döneminde Kayseri ilinde bulunan ve şehir merkezine yaklaşık 7 km uzaklıkta yer alan Karpuzatan mevkiinde, özellikle büyükbaş hayvan-

Tablo 1. Çalışma Kapsamında Kesimhanelerden Toplanan Örnek Çeşitleri ve Sayıları

Örnek	Kesimhane 1	Kesimhane 2	Kesimhane 3	Toplam
Kesim tahtası	10	10	10	30
Bıçak	10	10	10	30
Duvar	10	10	10	30
Atık suyu	10	10	10	30
Karkas	10	10	10	30
Toplam	50	50	50	150

ların kesiminin yapıldığı, rastgele seçilen üç farklı kesimhaneden, iki hafta arayla toplam 150 adet numune toplandı (Tablo 1). Karkas, bıçak, duvar ve kesim tahtası yüzeylerinden örnek almak için Cary-Blair transport besiyeri (Oxoid, CM0519, İngiltere) kullanıldı. Kesimhane atık suyu örnekleri, kesimi takiben aseptik koşullarda, steril plastik tüpler içerisinde 30 ml hacminde temin edildi. Karkastan örnek alınımında seçilen her bir yarım karkasın değişik bölgelerinden (but, kavram ve döş) 10 x 10 cm (100 cm²) ebadında, steril plastik template (10 x 10'luk) kullanılarak, 10 adet horizontal ve 10 adet vertikal sürtme hareketi ile karkas yüzeyine eşit basınç uygulamaya dikkat ederek alınan steril sürüntü örnekleri Cary-Blair besiyeri içeren tüplere konuldu. Toplanan örnekler, soğuk zincirde laboratuvara getirilerek aynı gün içerisinde incelemeye alındı.

***Campylobacter* spp. İzolasyonu ve Tür Düzeyinde Tanımlama**

Kesimhane örneklerinden *Campylobacter* spp.'lerin izolasyonu için ISO 10272 yönteminden yararlanıldı⁷. İzolasyonda ilk olarak ön zenginleştirme işlemi yapıldı. Bu amaçla besiyeri olarak, Bolton buyyon zenginleştirme besiyeri (Oxoid CM0983, İngiltere) ve modifiye "charcoal cefoperazone desoxycholate (mCCD)" agar (Oxoid CM739, İngiltere) kullanıldı. Örnekler Bolton buyyon (Lize at kanı eklenmiş) besiyeri içeren tüplere ve "stomacher" poşetlerine konuldu. Daha sonra homojen hale getirilerek mikroaerofil ortamda 37°C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ön zenginleştirme yapılan sıvı kültürden 0.1 ml alınarak CCDA (Oxoid SR0155, İngiltere) supplementi ilave edilmiş seçici besiyerine (modifiye CCD Agar, Oxoid CM739, İngiltere) ekimler yapıldı. Daha sonra, petriyerler 37°C'de mikroaerofil ortamda (Anaerocult C, Merck, M116275.0001, Almanya) 48-72 saat inkübe edildi. Besiyerinde gri-beyaz renkteki şüpheli koloniler izole edilerek, fenotipik (Gram boyama, oksidaz, katalaz ve hareket testi) testlere tabi tutuldu. Fenotipik yönden pozitif bulunan izolatlar %10 gliserinli (Merck, M1040942500, Almanya) Brucella buyyon (Oxoid, CM0169, İngiltere) içeren kriyotüplere alınarak, sonraki testler için numaralandırılıp, etiketlendi ve -80°C'deki derin dondurucuda muhafaza edildi.

Campylobacter spp. izolatlarının moleküler tanımlaması amacıyla öncelikle izolatlardan DNA ekstraksiyonu yapıldı. Bu amaçla InstaGene™ Matrix (Bio-Rad, ABD) kitinden yararlanıldı. İzolatlar, üretici firmanın direktifleri doğrultusunda ekstraksiyon işlemine tabi

tutuldu. DNA örneklerinin konsantrasyonları ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) Qubit 3.0 florometre (Thermo Fisher, ABD) ile ölçülüp, analiz edilinceye kadar -20°C 'de saklandı. *Campylobacter* türlerinin moleküler tanımlaması amacıyla Wang ve arkadaşlarının⁸ bildirdiği multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (mPCR) koşulları ve primerler (Tablo II) ve pozitif kontrol amacıyla *Campylobacter jejuni* ATCC 700819 izolatu kullanıldı. Bu amaçla, her numune için toplam hacim 25 μl olacak şekilde bir reaksiyon karışımında; 2.5 μl DNA örneği, 1x PCR

Tablo II. Çalışmada Kullanılan Primerler ve Beklenen Bant Büyüklükleri

Primer	Baz dizilim 5'- 3'	Bant büyüklüğü (bp)
<i>C.jejuni</i>	F- 5'- ACT TCT TTA TTG CTT GCT GC -3'	323
	R- 5'- GCC ACA ACA AGT AAA GAA GC -3'	
<i>C.coli</i>	F- 5'- GTA AAA CCA AAG CTT ATC GTG -3'	126
	R- 5'- TCC AGC AAT GTG TGC AAT G -3'	
<i>C.lari</i>	F- 5'- TAG AGA GAT AGC AAA AGA GA -3'	251
	R- 5'- TAC ACA TAA TAA TCC CAC CC -3'	
<i>C.upsaliensis</i>	F- 5'- AAT TGA AAC TCT TGC TAT CC -3'	204
	R- 5'- TCA TAC ATT TTA CCC GAG CT -3'	
<i>C.fetus</i>	F- 5'- GCA AAT ATA AAT GTA AGC GGA GAG -3'	435
	R- 5'- TGC AGC GGC CCC ACC TAT -3'	
23SrRNA	F- 5'- TAT ACC GGT AAG GAG TGC TGG AG -3'	650
	R- 5'- ATC AAT TAA CCT TCG AGC ACC G -3'	
<i>flaA</i>	F- 5'- ATG GGA TTT CGT ATT AAC AC -3'	1700
	R- 5'- CTG TAG TAA ATC TTA AAA CAT TTT G -3'	
<i>cdtA</i>	F- 5'- GGA AAT TGG ATT TGG GGC TAT ACT -3'	165
	R-5'- ATC ACA AGG ATA ATG GAC AAT -3'	
<i>cdtB</i>	F- 5'- GTT AAA ATC CCT GCT ATC AAC CA -3'	495
	R- 5'- GTT GGC ACT TGG AAT TTG CAA GGC -3'	
<i>cdtC</i>	F- 5'- TGG ATG ATA GCA GGG GAT TTT AAC -3'	555
	R- 5'- TTG CAC ATA ACC AAA AGG AAG -3'	
<i>virB11</i>	F- 5'- TCT TGT GAG TTG CCT TAC CCC TTT T -3'	494
	R- 5'- CCT GCG TGT CCTGTGTTATTACCC -3'	
<i>ceuE</i>	F- 5'- CCT GCT CGG TGA AAG TTT TG -3'	794
	R- 5'- GAT CTT TTT GTT TTG TGC TGC -3'	
<i>cadFR1B</i>	F- 5'- TTG AAG GTA ATT TAG ATA TG -3'	400
	R- 5'- CTA ATA CCT AAA GTT GAA AC -3'	
<i>iam</i>	F-5'- GCG CAA AAT ATT ATC ACC C -3	518
	R- 5'- TTC ACG ACT ACT ATG CGG -3'	
ERIC-I	5'- ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C -3'	-
ERIC-II	5'- AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G -3'	-

tamponu (Thermo Scientific, ABD), 20 mM MgCl₂ (Vivantis, Malezya), 0.2 mM dNTP karışımı (Thermo Scientific, ABD), 0.5 µM *C.jejuni* ve *C.lari*; 1 µM *C.coli* ve *C.fetus*, 2 µM *C.upsaliensis*, 0.2 µM *Campylobacter* 23S rRNA primerleri ve 1.25 U Taq polimeraz (Thermo Scientific, ABD) olarak hazırlandı. DNA amplifikasyonu 95°C'de 6 dakika başlangıç denatürasyonu takiben 30 döngü olmak üzere, 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 59°C'de 30 saniye primer bağlanması ve 72°C'de 30 saniye uzama ve en son 72°C'de 7 dakika son uzama olarak döngü cihazı (Arctic™ Termal Cyclus; Thermo Fisher, ABD)'nda gerçekleştirildi. Amplifikasyon sonucunda elde edilen PCR ürünleri, %1.5 agaroz jelde 90 V'da 90 dakika boyunca elektroforez cihazında yürütüldükten sonra (Thermo EC 330, ABD) UVP jel dokümantasyon sistemi (Vilber Lourmat, Fransa) kullanılarak görüntüledi. Çalışmada yer alan örneklerde saptanan *Campylobacter* türleri bant büyüklüklerine göre tanımlandı (Tablo II).

Antibiyotik Duyarlılık Testi

Campylobacter spp. olarak tanımlanmış izolatların gentamisin (CN, 10 µg), amoksisilin-klavulanik asit (AMC, 30 µg), neomisin (N, 10 µg), enrofloksasin (ENR, 5 µg), eritromisin (E, 15 µg), siprofloksasin (CIP, 5 µg), doksisisiklin (DO, 30 µg) (Oxoid, İngiltere) antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları, disk difüzyon testi ile belirlendi. İzolatlar %5 defibrine koyun kanlı agar da mikroaerofil ortamda 37°C'de 24-48 saat süreyle inkübe edildi ve üreyen koloniler %0.075 NaCl çözeltisi içinde süspansiyon edildi. Bakteri yoğunluğu 0.5 McFarland bulanıklık standardına göre ayarlandıktan sonra 0.1 ml hacimde kanlı agar a inoküle edildi ve antibiyotik duyarlılık test diskleri besiyeri üzerine yerleştirildi. Petriler, mikroaerofil ortamda 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Test sonunda oluşan inhibisyon zon çapları ölçülerek "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" önerilerine göre değerlendirildi⁹. Çalışmada kontrol suşlar olarak *S.aureus* ATCC 25923, *E.coli* ATCC 25922 ve *C.jejuni* ATCC 700819 kullanıldı.

Antibiyotik Gradyent Testi

Campylobacter spp. izolatlarının gentamisin, amoksisilin-klavulanik asit, enrofloksasin, eritromisin, siprofloksasin, doksisisiklin (Liofilchem, İtalya) antibiyotiklerine karşı minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri antibiyotik gradiyent test yöntemi ile belirlendi. *C.jejuni*, *C.fetus* ve *C.coli* izolatlarının taze kültürü 0.5 McFarland yoğunluğuna getirilerek kanlı agar yüzeyine eküvyonla yayıldı. Agar yüzeyine yerleştirilen antibiyotik gradiyent şeritleri sonrasında besiyerleri 37°C'de 48 saat mikroaerofil ortamda inkübe edildi. Elde edilen sonuçlar CLSI önerilerine göre değerlendirildi⁹.

Virülans Genlerinin PCR ile Gösterilmesi

Virülans genlerin (*iam*, *cadF*, *cdtA*, *flaA*, *ceuE*, *cdtC*, *cdtB* ve *virB11*) varlığı daha önceki çalışmalarda belirtilen yöntemlere göre küçük değişiklikler yapılarak PCR tekniği ile belirlendi^{6,10-12}. Reaksiyon karışımı; 4 µl kalıp DNA, KCl eklenmiş 1x PCR tamponu (Thermo Scientific, ABD), 1.5 mM MgCl₂ (Vivantis, Malezya), 250 mM dNTP karışımı (Thermo Scientific, ABD), her bir primerden 1 µM and 0.5 U Taq polimeraz (Thermo Scientific, ABD)

içercek şekilde hazırlandı ve son hacim steril distile su ile 40 µl'ye tamamlandı. Isı döngüsü 94°C'de 1 dakika ön denatürasyonu takiben 30 döngü 52°C'de 1 dakika primer bağlanması ve 72°C'de 1 dakika uzama basamağı bulundu. Son olarak, 72°C'de 5 dakika son uzama basamağı yer aldı. PCR ürünleri bir saat boyunca 100 V'da %1.5 (a/h) TAE agaroz jelinde elektroforez cihazında (Thermo EC 330, ABD) yürütüldü. Agaroz jel, UVP jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat, Fransa) kullanılarak PCR ürünlerine ait bantlar görüntüledi.

***Campylobacter* spp. İzolatlarının "Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC)" PCR ile Moleküler Tiplendirilmesi**

Çalışmada izole edilen *Campylobacter* türlerinin moleküler tiplendirilmesi için Houf ve arkadaşlarının¹³ bildirdiği ERIC-PCR yöntemi kullanıldı. Amplifikasyon için PCR karışımı; 5 µl 10x PCR tampon A (Thermo Scientific, ABD), 4 mM MgCl₂ (Vivantis, Malezya), 5 U Taq DNA polimeraz (Thermo Scientific, ABD), son konsantrasyonu 0.2 mM olacak şekilde dNTP karışımı (Thermo Scientific, ABD), 25 pmol her bir primer (Sentromer DNA Teknolojileri, İstanbul, Türkiye) ve 1 µl kalıp DNA içeren toplam 50 µl hacimde hazırlandı. Amplifikasyon 94°C'de 5 dakika ön denatürasyonu takiben 40 döngü 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 25°C'de 1 dakika bağlanma ve 72°C'de 2 dakika uzama şeklinde gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünleri, %2'lik agaroz jelde yürütüldü (Thermo EC 330, ABD) ve oluşan bantlar jel dokümantasyon sisteminde (Vilber Lourmat, Fransa) incelendi. UPGMA algoritması, bant paternlerinin küme analizi için kullanıldı¹⁴. Filogenetik ağaç, iTOL versiyon 4 kullanılarak ortaya çıkarıldı¹⁵. Normalleştirmeden sonra, en üst pozisyona dayalı profil benzerlikleri, 100 tekrarlı olarak Jaccard benzerlik katsayısı kullanılarak hesaplandı. Çalışmada izole edilen yalnız bir *C.coli* izolatı olması nedeniyle, dendogram tür temelli olarak yapılmamış, izole edilen tüm *Campylobacter* türleri bir arada değerlendirilmiştir.

İstatistiksel Analiz

Çalışmada istatistiksel analiz için SPSS 14.01 paket programı kullanıldı. Çalışmada, *Campylobacter* türlerinin farklı kaynaklardan izolasyonunda pozitiflik oranları ve farklı kaynaklardan elde edilen *Campylobacter* türlerinin, türler arasında oransal dağılımının istatistiksel karşılaştırmalarında ki-kare (X²) testi kullanıldı¹⁶.

BULGULAR

Çalışmada, kesimhane ortamından alınan 150 örneğin 17 (%11.3)'si *Campylobacter* spp. varlığı yönünden pozitif bulunmuştur. Bu 17 pozitif örnekten yapılan fenotipik tanımlama testleri ile 17 *Campylobacter* spp. izolatı elde edilmiştir. Moleküler tanımlama testleri sonunda 17 izolatın, sekizi *C.jejuni*, sekizi *C.fetus* ve biri de *C.coli* olarak belirlenmiştir. *Campylobacter* türlerinin farklı kaynaklardan izolasyonunda pozitiflik oranlarının istatistiksel karşılaştırılmasında, kesimhane atık suyundaki oranının diğer kaynaklardan daha yüksek olduğu belirlenmiştir (p< 0.001). Farklı kaynaklardan elde edilen *Campylobacter* türlerinin oransal dağılımı açısından istatistiksel fark önemli bulunmuştur (p< 0.05). Buna göre, *C.jejuni* ve *C.fetus*'un görülme oranı birbirleriyle eşit, *C.coli*'ye göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. İzolatların kesimhane ortamındaki dağılımı Tablo III'te detaylı olarak verilmiştir.

Tablo III. İzole Edilen *Campylobacter* Türlerinin Kesimhane Ortamında Dağılımları

<i>Campylobacter</i> spp.	Atık su	Duvar	Karkas	Bıçak	Tahta
<i>C.jejuni</i>	6	1	-	1	-
<i>C.fetus</i>	4	1	2	-	1
<i>C.coli</i>	1	-	-	-	-

Disk difüzyon testi sonucu, izolatların kullanılan antibiyotiklere duyarlılıkları tür düzeyinde detaylı bir şekilde Tablo IV'te belirtilmiştir. Buna göre, *C.jejuni* izolatlarının tamamı gentamisin, neomisin ve doksisisikline duyarlıyken, *C.fetus* izolatlarının tamamı sadece doksisisikline duyarlı bulunmuştur. *C.coli* izolatı test edilen antibiyotiklere karşı dirençli değilken eritromisin, gentamisin, amoksisilin-klavulanik asit, neomisin ve doksisisikline duyarlı saptanmıştır. *C.jejuni* izolatlarının tamamı siprofloksasine dirençli olarak tespit edilmiştir. Antibiyotik gradiyent test sonuçları disk difüzyon testi bulguları ile uyumlu bulunmuştur. MİK aralıkları eritromisin, gentamisin, amoksisilin-klavulanik asit, siprofloksasin, enrofloksasin ve doksisisiklin antibiyotikleri için sırasıyla 0.12-16 µg/ml, 0.5-4 µg/ml, 0.5-64 µg/ml, 0.25-32 µg/ml, 0.25-16 µg/ml ve 0.5-4 µg/ml olarak bulunmuştur.

Çalışmada elde edilen izolatların virülans genlerine ilişkin sonuçları Tablo V'te özetlenmiştir.

İzolatların genetik yönden yakınlıklarının belirlenmesi amacıyla yapılan ERIC-PCR ile *Campylobacter* spp. izolatlardan elde edilen bant profillerinin birbirinden farklılık gösterdiği saptanmıştır. Bant sayısının 2 ile 11 arasında değiştiği belirlenmiştir. Çalışmamızda küme analizi yapılmamış ve izolatların bant profilleri şematik olarak gösterilmiştir. Çalışmada analiz edilen izolatların hepsi farklı ERIC-PCR profilleri göstermiş ve izolatların benzerlik durumlarına göre klonal yakınlıkları filogenetik ağaçta sunulmuştur (Şekil 1).

TARTIŞMA

Campylobacter türleri başlıca hayvan kaynaklı kontamine yiyeceklerle insanlara bulaşmaktadır. Gıdaların bu bakteri ile kontamine olması, gıda üretimi prosesi sırasında özellikle kesimhanelerde üretim, işleme, dağıtım ve hazırlık sırasında ortaya çıkabilmektedir. Kesimhanelerde gıda patojenleriyle kontamine olmuş sonrasında yetersiz ısı işlem uygulanmış et ürünlerinin insanlar tarafından tüketilmesi *Campylobacter* enfeksiyonlarının gelişmesinde risk faktörü olarak belirlenmiştir^{1,3}. Bu çalışmada, Kayseri yöresinde hizmet vermekte olan kesimhanelerden toplanan 150 örneğin 17 (%11.3)'si *Campylobacter* spp. yönünden pozitif bulunmuştur. Yapılan fenotipik ve moleküler tanımlama testleri sonunda 17 izolatın, sekizi *C.jejuni*, sekizi *C.fetus* ve biri *C.coli* olarak tanımlanmıştır.

Wieczorek ve Osek'in çalışmalarında¹⁷ incelenen 191 sığır karkas sürüntü örneğinin 28 (%14.7)'inde *Campylobacter* yönünden pozitiflik saptanmıştır. Bu çalışmada *C.jejuni* ve *C.coli* izolasyon oranı sırasıyla %57.1 ve %42.9 olarak tespit edilmiştir. Wieczorek ve arka-

Tablo IV. *Campylobacter* Türlerinin Antibiyotik Duyarlılık Profilleri

Antibiyotikler	S (n/%)						I (n/%)						R (n/%)					
	C.jejuni		C.fetus		C.coli		C.jejuni		C.fetus		C.coli		C.jejuni		C.fetus		C.coli	
	DD	MIK	DD	MIK	DD	MIK	DD	MIK	DD	MIK	DD	MIK	DD	MIK	DD	MIK	DD	MIK
E*	7/87.5	7/87.5	7/87.5	7/87.5	1/100	1/100	-	-	1/12.5	1/12.5	-	-	1/12.5	1/12.5	-	-	-	-
CN*	8/100	8/100	7/87.5	7/87.5	1/100	1/100	-	-	-	-	-	-	-	-	1/12.5	1/12.5	-	-
AMC*	6/75	6/75	6/75	6/75	1/100	1/100	-	-	-	-	-	-	2/25	2/25	2/25	2/25	-	-
CIP*	-	-	7/87.5	7/87.5	-	-	-	-	1/12.5	1/12.5	1/100	1/100	8/100	8/100	-	-	-	-
ENR*	-	-	7/87.5	7/87.5	-	-	1/12.5	1/12.5	1/12.5	1/12.5	1/100	1/100	7/87.5	7/87.5	-	-	-	-
N*	8/100	Y	6/75	Y	1/100	Y	-	Y	-	Y	-	Y	-	Y	2/25	Y	-	Y
DO*	8/100	8/100	8/100	8/100	1/100	1/100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

E: Eritromisin, CN: Gentamisin, AMC: Amoksisilin-klavulanik asit, CIP: Siprofloksasin, ENR: Enrofloksasin, N: Neomisin, DO: Doksisiklin, DD: Disk difüzyon, MIK: Minimum inhibitör konsantrasyonu, n: İzolat sayısı, S: Duyarlı, I: Orta duyarlı, R: Dirençli, Y: Yapılmamıştır.

* CLSI 2014, *Campylobacter* türleri için sınır değer sağlamadığından referans olarak *Enterobacteriales* için verilen limitler kullanılmıştır².

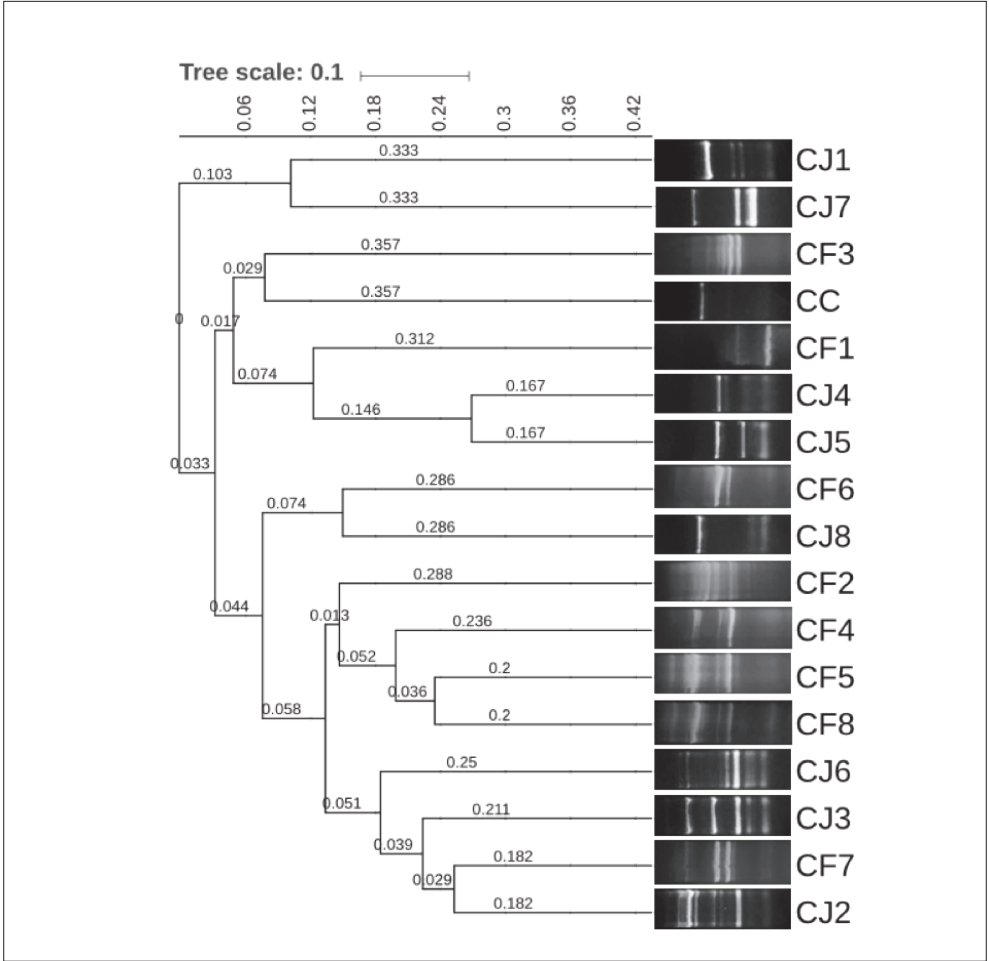
Tablo V. *Campylobacter* Türlerinde Virülans Genlerinin Dağılımı

Örnek	mPCR	<i>flaA</i>	<i>cdtA</i>	<i>ceuE</i>	<i>cdtB</i>	<i>iam</i>	<i>virB11</i>	<i>cdtC</i>	<i>cadF</i>	Toplam
1	<i>C.jejuni</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	7/8
2	<i>C.jejuni</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	6/8
3	<i>C.jejuni</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	6/8
4	<i>C.jejuni</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	6/8
5	<i>C.jejuni</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	4/8
6	<i>C.jejuni</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	6/8
7	<i>C.jejuni</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	6/8
8	<i>C.jejuni</i>	-	+	+	+	-	-	+	+	5/8
9	<i>C.fetus</i>	-	+	+	-	-	-	+	-	3/8
10	<i>C.fetus</i>	-	+	+	+	-	-	+	+	5/8
11	<i>C.fetus</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	1/8
12	<i>C.fetus</i>	-	+	+	+	-	-	+	-	4/8
13	<i>C.fetus</i>	-	-	+	+	-	-	+	-	3/8
14	<i>C.fetus</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	4/8
15	<i>C.fetus</i>	-	-	+	+	-	-	+	-	3/8
16	<i>C.fetus</i>	-	+	+	+	-	-	+	-	4/8
17	<i>C.coli</i>	-	+	+	+	-	-	+	+	5/8
Toplam	17	6/17	13/17	16/17	16/17	1/17	-	15/17	11/17	

mPCR: Multipleks polimeraz zincir reaksiyonu.

daşlarının çalışmalarında¹⁸ 812 sığır derisi ve karkas örneklerinden toplam 115 (%14.2) *Campylobacter* izolatu elde edilmiştir. Bu çalışmada karkastan izole edilen türlerin %63.6'sı *C.jejuni*, %36.4'ü ise *C.coli* olarak tanımlanmıştır. Farklı olarak, Rahimi ve arkadaşları¹⁹ ise inceledikleri karkas örneklerinin hiçbirinde *Campylobacter* türünü tespit edememişlerdir. Bulgular arası farklılıkların, incelenen hayvanın cinsi, hayvanın yaşı, mevsimsel fark, örneklem sahası, örneklem sıklığı ve izolasyon yöntemi, coğrafya, diyet ve hayvancılık uygulamaları gibi değişkenlerden kaynaklandığı düşünülmektedir²⁰. Wiczorek ve Osek¹⁷ ile Wiczorek ve arkadaşlarının¹⁸ yaptıkları çalışmalarda *Campylobacter* spp. prevalansının bu çalışmada elde edilen değerden daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu farklılığın nedeni, sadece karkas örneği alınmayıp ek olarak kesimhane ortamından da örnek toplanmış olmasına bağlı ortaya çıkan örnek çeşitliliği olabileceği düşünülmüştür.

Veteriner hekimlikte *Campylobacter* türleri arasında en önemli tür *C.fetus*'tur. *C.fetus*, sığır ve koyunlarda abortus ve kısırılık gibi üreme bozukluklarının potansiyel etkenidir²⁰. Gastrointestinal semptomların %90'ı *C.jejuni* ve *C.coli* kaynaklıdır. Buna karşılık, *C.fetus*, %19-%53 oranı ile *Campylobacter* kaynaklı bakteriyeminin en yaygın nedenidir. Bu tür invaziv *C.fetus* enfeksiyonlarında ölüm oranları da yaklaşık %14 civarındadır ve dünya genelindeki yüksek *Campylobacter* enfeksiyonlarının insidansı göz önüne alındığında, bu



Şekil 1. *C. jejuni*, *C. fetus* ve *C. coli* izolatlarının filogenetik ağaç görüntüsü. CJ: *C. jejuni*, CF: *C. fetus*, CC: *C. coli*.

veriler *C. fetus* enfeksiyonlarının pek de nadir olmadığını ve halk sağlığı açısından oldukça önemli olduğunu vurgulamaktadır²¹. Çalışmamızda elde edilen *C. fetus* izolatlarının 2 (%1.2)'si karkas kaynaklıdır. Bu durum, *C. fetus* izolatlarının kesimhane ortamında karkaslara kontamine olduğunu ve potansiyel bir enfeksiyon odağı haline geldiğini göstermektedir.

Kesimhanelerde atık su, esas olarak; sığır ve koyunların derilerinin yüzülmesinden, nakil sonrası karkasların yıkanmasından, ekipman ve tesislerin temizlenmesi ve sterilizasyonundan, mekanik ekipmanın soğutulması vs. işlemleri sonucu ortaya çıkmaktadır. Atık su ayrıca kan, iç organ, kemik, idrar ve dışkı, kesim ve kesme sırasında çıkarılan yumuşak dokuları, deri ve tırnak kaynaklı toprak, erimiş yağ ve temizleme ve dezenfektan bileşiklerini kapsamaktadır²². Bununla birlikte, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. ve

L.monocytogenes gibi gastroenteritlerin en önemli etkenleri olan bakteriyel patojenlerin, kesimhane atık suyundan izole edildiği bildirilmiştir²³. Kesimhane atık suları yakınındaki içme su kaynaklarına sızarak onları da kontamine etmekte, bu vesile ile içme suyu vasıtasıyla insanlarda ve hayvanlarda *Campylobacter* enfeksiyonlarına neden olmaktadır²⁴. Çalışmamızda izolatların büyük bir kısmı (11, %7.3) kesimhane atık suyundan elde edilmiştir. Bu çalışma sonuçlarına benzer şekilde Elmalı ve Can'ın bildirdikleri çalışmada², incelenen 78 atık su örneğinden, 8 (%10.3) *Campylobacter* spp. izolasyonu yapılmıştır. Kesimhane atık sularında *Campylobacter*'lerin izole edilmiş olması, etkenin çevresel kontaminasyondan sorumlu olabileceğinin en önemli göstergesidir².

Sığırlar, *Campylobacter*'lerin muhtemel asemptomatik taşıyıcılarıdır; bu nedenle kesim sürecinde hayvanın dışkılarından, kesim sırasında farklı hayvanlardan ya da kesimde kullanılan kontamine alet ve ekipmandan karkası kontamine edebildikleri bildirilmiştir²⁵.

Kesimhanelerde karkasla temas eden yüzeylere ilişkin sınırlı sayıda yayına ulaşılmıştır. Çalışmamızda kesimhanelerden ayrılan *C.jejuni*'lerden 1 (%5.9)'i bıçak örneklerinden izole edilmiştir. Ayalew ve arkadaşlarının²⁶ bildirdiği bir çalışmada kesim tahtaları ve bıçaklarda *Campylobacter* varlığı saptanamamıştır. Bıçak gibi karkas dışındaki kesimhane materyallerinde *Campylobacter* türlerinin varlığı kullanılan alet ve malzemelerde gerekli hijyenik tedbirlerin yeterince uygulanmadığının ve kontaminasyon varlığının bir göstergesidir.

Çalışmamızda *C.jejuni* izolatlarının tamamı kinolon grubu antibiyotiklerden siprofloksasine ve %87.5'i enrofloksasine dirençliken, *C.fetus* izolatlarının %87.5'i siprofloksasine ve enrofloksasine duyarlı bulunmuştur. *C.coli* izolatı ise orta duyarlı olarak tespit edilmiştir. Wiczorek ve arkadaşlarının çalışmasında¹⁸ siprofloksasin direnci *C.jejuni* izolatları için %29.4 ve *C.coli* izolatları için %51.1 olarak tespit edilmiştir. Adıgüzel ve arkadaşlarının çalışmalarında²⁷ siprofloksasin direnci, *C.jejuni* izolatları için %87.8, *C.coli* izolatlarında ise %98.8 oranında bulunmuştur. Kayman ve arkadaşlarının çalışmasında²⁸ insanlardan elde edilen *C.jejuni* izolatlarının %74.3'ü siprofloksasine dirençli olarak tespit edilmiştir. Elmalı ve Can² *C.jejuni* izolatlarının %50'sini, *C.coli* izolatlarının ise tamamını siprofloksasine dirençli olarak bildirmişlerdir. Maktabi ve arkadaşlarının çalışmasında³ enrofloksasine düşük oranda (%6.2) direnç gösterilmiştir. Farklı olarak Turgay ve Bozdoğan'ın bildirdikleri çalışmada⁴ *C.jejuni* ve *C.coli* izolatlarının tamamı siprofloksasine duyarlı bulunmuştur. Ülkemizden ve çeşitli ülkelerden yapılmış çalışmalarda yüksek siprofloksasin direnci ortaya konmuştur. Bu durum tedavide siprofloksasin kullanımının azaltılması gerekliliğini vurgulamaktadır.

Çalışmamızda *C.jejuni* izolatlarının yalnız 1 (%12.5)'inde eritromisin direnci tespit edilmiştir. Çalışmamıza benzer şekilde Kayman ve arkadaşlarının çalışmasında²⁸ *C.jejuni* izolatlarının %5.9'unda eritromisin direnci saptanmıştır. Wiczorek ve arkadaşlarının çalışmasında¹⁸ eritromisin direnci %4.3 (*C.jejuni*, n= 1 ve *C.coli*, n= 4) olarak bildirilmiştir. Adıgüzel ve arkadaşları²⁷ ile Turgay ve Bozdoğan'ın⁴ çalışmalarında izolatların tamamı eritromisine duyarlı bulunmuştur. Çalışmamızdan farklı olarak, Elmalı ve Can'ın yaptığı

çalışmada² eritromisin direnci %71.4 oranında tespit edilmiştir. Bu çalışmada² yüksek direnç rapor edilmiş olsa da daha önce yapılan çalışmaların^{4,18,28} büyük bir kısmında çalışmamıza benzer şekilde düşük eritromisin direncinden bahsedilmektedir.

Çalışmamızda, *C.jejuni* ve *C.coli* izolatlarının tamamı, *C.fetus* izolatlarının ise %87.5'i gentamisine duyarlı bulunmuştur. *C.fetus* izolatlarının sadece 1 (%12.5)'inde gentamisin direnci saptanmıştır. Wieczorek ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada¹⁸ gentamisin direnci %2.6 (*C.jejuni*, n= 1 ve *C.coli*, n= 2) olarak bulunmuştur. Benzer şekilde, Maktabi ve arkadaşlarının³ ve Turgay ve Bozdoğan'ın⁴ yaptıkları çalışmalarda izolatların tamamı gentamisine duyarlı bulunmuştur.

Çalışmamızda araştırılan virülans genlerinden *virB11*, izolatların hiçbirinde tespit edilememiştir. Bununla birlikte, *iam* geni *C.fetus* ve *C.coli* izolatlarında bulunmazken yalnız 1 (%12.5) *C.jejuni* izolatında bu gen saptanmıştır. *cdtA*, *cdtB*, *ceuE* ve *cadF* genleri, *C.jejuni* izolatlarının tamamında pozitif bulunmuştur. Wieczorek ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada¹⁸ izolatların çoğunluğu *cadF* ve *flaA* genlerine sahipken, daha az kısmında ise *iam* ve *virB11* genleri saptanmıştır. Çalışmada *cdtA*, *cdtB* ve *cdtC* genleri *C.jejuni* izolatlarının tamamında pozitif olarak belirlenmiştir. *C.coli*, 47 izolatın sadece 8 (%17)'inde *cdtA*, *cdtB* ve *cdtC* genleri pozitif olarak elde edilmiştir. Datta ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada⁶, çalışmamızdan farklı olarak insan, kanatlı ve sığır kökenli *C.jejuni* izolatlarının tamamında, *flaA*, *cadF*, *cdtA,B* ve *cdtC* geni bulunmuştur. Elmalı ve Can'ın yaptıkları çalışmada², *C.jejuni* izolatlarının %66.6 ve %41.6'sında sırasıyla *cdtA* ve *cadF* virülans genleri tespit edilmiştir. Wieczorek'in çalışmasında²⁹, çalışmamızdan farklı olarak, tüm sığır kökenli *Campylobacter*'lerde *flaA* ve *cadF* genleri tespit edilirken, izolatların büyük bir kısmında *cdtA*, *cdtB* ve *cdtC* gibi toksin genleri ve *iam* bulunmuştur. Çalışmamızda ise *iam* geni *C.fetus* ve *C.coli* izolatlarında saptanmazken yalnız 1 (%12.5) *C.jejuni* izolatında tespit edilmiştir. Çalışmamızın aksine, *virB11* geni, Wieczorek'in bildirdiği çalışmada²⁹ izolatların %12.5'inde bulunmuştur. *Campylobacter*'lerin patojenitesinden sorumlu genler, adezyon, invazyon, kolonizasyon ve sitotoksin üretiminden sorumludur ve hastalığın klinik ve epidemiyolojik özellikleri *Campylobacter* enfeksiyonlarında rol oynayan moleküler mekanizmalar hakkında ipuçları sağlamaktadır⁶.

İzolatların klonal yakınlıklarının belirlenmesi amacıyla ERIC-PCR yapılmış ve *Campylobacter* izolatlarının bant profillerinin birbirinden farklı olduğu saptanmıştır. Bant sayısının 2 ile 11 arasında değiştiği ortaya konmuştur. Çalışmada kullandığımız, ERIC-PCR, nispeten yüksek bir ayırt edici güce sahip olup, aynı zamanda kolay ve hızlı olmanın yanı sıra düşük maliyetlidir²⁹. Wieczorek'in bildirdiği çalışmada²⁹, ERIC-PCR profillerinden üretilen dendrograma dayalı filogenetik analizde *C.jejuni* ve *C.coli* izolatlarının üç kümeye ait olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda küme analizi yapılmamış ve izolatların bant profilleri şematik olarak gösterilmiştir. Ayrıca, çalışmamızda *C.jejuni* izolatları ile *C.jejuni* ve *C.fetus* izolatları ile *C.fetus* izolatlarının birbirleriyle klonal yönden benzerlik gösterdiği ve aynı klonlar içerisinde yer aldığı ortaya çıkmıştır. Ek olarak, bazı *C.jejuni* izolatları ile *C.fetus* ve *C.coli* ile *C.fetus* izolatlarının benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada kesimhanelerden izole edilen *Campylobacter* izolatlarının güncel antibiyotiklerin bir çoğuna dirençli olduğu ortaya konmuştur. Kesimhane ortamında özellikle kesimhane atık suyunda yüksek virülans özelliklerine sahip *Campylobacter* türlerinin bulunması, karkaslar ve dolayısıyla gıdalar aracılığıyla insanlara bulaşma riskinden dolayı halk sağlığı açısından göz ardı edilemez bir tehlike oluşturabileceği açıktır. Bu nedenle, kesimhanelerde *Campylobacter* türlerinin azaltılması ve bunlara bağlı enfeksiyonların önlenmesi için halihazırda uygulanan hayvansal gıdalar için özel hijyen kurallarına uyulması ve gerekli durumlarda denetimlerin artırılması önerilmektedir.

TEŞEKKÜR

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyometri Anabilim Dalı Öğretim Üyesi, Doç. Dr. Aytaç Akçay'a çalışmamızın istatistiksel analiz kısmına katkılarından dolayı ve makalenin İngilizce özet kısmının kontrol edilmesinde ve düzenlenmesinde katkılarından dolayı Erciyes Üniversitesi Bilimsel Metin Destekleme Ofisine (Proofreading & Editing Office) teşekkür ederiz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Bailey GD, Vanselow BA, Hornitzky MA, Hum SI, Eamens GJ, Gill PA, et al. A study of the foodborne pathogens: *Campylobacter*, *Listeria* and *Yersinia*, in faeces from slaughter-age cattle and sheep in Australia. *Commun Dis Intell Q Rep* 2003;27(2):249-57.
2. Elmali M, Can HY. Antimicrobial susceptibility and virulence-associated genes in *Campylobacter* isolates from milk and wastewater in Hatay, Turkey. *Ciência Rural* 2019;49(5):e20180227.
3. Maktabi S, Ghorbanpoor M, Hossaini M, Motavalibashi A. Detection of multi-antibiotic resistant *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in beef, mutton, chicken and water buffalo meat in Ahvaz, Iran. *Vet Res Forum* 2019;10(1):37-42.
4. Turgay Ö, Bozdoğan H. Kırmızı ette *Campylobacter* türlerinin varlığı ve antibiyotik dirençliliğinin belirlenmesi. *KSÜ Doğa Bil Derg* 2011;14(3):5-8.
5. Kayman T, Abay S, Hızlısoy H. *Campylobacter* türlerinin fenotipik yöntemler ve multipleks polimeraz zincir reaksiyonu ile tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıkları. *Mikrobiyol Bul* 2013;47(2):230-9.
6. Datta S, Niwa H, Itoh K. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. *J Med Microbiol* 2003;52(Pt 4):345-8.
7. ISO 10272. Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for detection of thermotolerant *Campylobacter*. The International Organization for Standardization 1995.
8. Wang G, Clifford GC, Tracy MT, Pucknell C, Barton C, Price L, 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.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Clinical and Laboratory Standards Institute performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Fourth Informational Supplement, 2014; M100-S 24, Wayne PA.
10. Krutkiewicz A, Klimuszko D. Genotyping and PCR detection of potential virulence genes in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from different sources in Poland. *Folia Microbiol (Praha)* 2010;55(2):167-75.

11. Chansiripornchai N, Sasipreeyajan J. PCR detection of four virulence-associated genes of *Campylobacter jejuni* isolates from Thai broilers and their abilities of adhesion to and invasion of INT-407 cells. *J Vet Med Sci* 2009;71(6):839-44.
12. Ripabelli G, Tamburro M, Minelli F, Leone A, Sammarco ML. Prevalence of virulence-associated genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter* spp. isolated in Italy. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2010;33(4):355-64.
13. Houf K, De Zutter L, Van Hoof J, Vandamme P. Assessment of the genetic diversity among *Arcobacters* isolated from poultry products by using two PCR-based typing methods. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(5):2172-8.
14. Viswanathan M, Pearl DL, Taboada EN, Parmley EJ, Mutschall SK, Jardine CM. Cluster Analysis of *Campylobacter jejuni* genotypes isolated from small and medium-sized mammalian wildlife and bovine livestock from Ontario farms. *Zoonoses Public Health* 2017;64(3):185-93.
15. Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* 2019; 47(W1):W256-9.
16. SPSS Statistical Package for Windows, Version 14.0.1, (Serial: 9869264). SPSS Inc. Chicago, USA, 2001.
17. Wieczorek K, Osek J. Occurrence of *Campylobacter* on carcasses of slaughtered animals between 2009 and 2013. *Bull Vet Inst Pulawy* 2014;58(4):553-8.
18. Wieczorek K, Kania I, Osek J. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated from poultry carcasses in Poland. *J Food Prot* 2013;76(8):1451-5.
19. Rahimi E, Momtaz H, Hemmatzadeh F. The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter* spp. on bovine carcasses in Isfahan, Iran. *Iran J Vet Res* 2008;9(4):365-70.
20. Nonga HE, Sells P, Karimuribo ED. Occurrences of thermophilic *Campylobacter* in cattle slaughtered at Morogoro municipal abattoir, Tanzania. *Trop Anim Health Prod* 2010;42(1):73-8.
21. Wagenaar JA, Van Bergen Map, Blaser MJ, Tauxe RV, Newell DG, Van Putten JPM. *Campylobacter fetus* infections in humans. exposure and disease. *Clin Infect Dis* 2014;58(11):1579-86.
22. Yıldırım NC, Tanyol M, Serdar O, Yıldırım N. *Gammarus pulex* as a model organism to assess the residual toxicity of slaughterhouse wastewater treated by electrocoagulation process. *Bull Environ Contam Toxicol* 2019;103(3):447-52.
23. Nafarnda WD, Ajayi IE, Shawulu JC, Kawe MS, Omeiza GK, Sani NA, et al. Bacteriological quality of abattoir effluents discharged into water bodies in Abuja, Nigeria. *ISRN Vet Sci* 2012;e515689.
24. Trigui H, Thibodeau A, Fravalo P, Letellier A, Faucher SP. Survival in water of *Campylobacter jejuni* strains isolated from the slaughterhouse. *Springerplus* 2015;4(1):799.
25. Kashoma IP, Kassem II, John J, Kessy BM, Gebreyes W, Kazwala RR, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolated from dressed beef carcasses and raw milk in Tanzania. *Microb Drug Resist* 2016; 22(1):40-52.
26. Ayalew H, Berhanu A, Sibhat B, Serda B. Microbiological assessment of meat contact surfaces at abattoir and retail houses in Jigjiga town, Somali National Regional State of Ethiopia. *ISAAB J Food Sci* 2015;5(3):21-6.
27. Adiguzel MC, Sigirci BD, Celik B, Kahraman BB, Metiner K, Ikiz S, et al. Phenotypic and genotypic examination of antimicrobial resistance in thermophilic *Campylobacter* species isolated from poultry in Turkey. *J Vet Res* 2018;62(4):463-8.
28. Kayman T, Abay S, Aydin F, Şahin O. Antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* isolates recovered from humans with diarrhoea in Turkey. *J Med Microbiol* 2019;68(2):136-42.
29. Wieczorek K. Relationship between the molecular typing of *Campylobacter* strains and the prevalence of their virulence genes. *Bull Vet Inst Pulawy* 2009;53(2):193-8.