

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİYARELİ HASTALARDA
CAMPYLOBACTER SPP. VE
ENTEROHEMORAJİK *ESCHERICHIA COLI*
SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

Dr. HATİCE SANLI AVCI

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2010

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİYARELİ HASTALARDA
CAMPYLOBACTER SPP. VE
ENTEROHEMORAJİK *ESCHERICHIA COLI*
SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

Dr. HATİCE SANLI AVCI

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. ZEYNEP GÜLAY

İZMİR-2010

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından 2006.KB.SAG.041
sayı ile desteklenmiştir

TEŐEKKÜR

Eğitim s¼rem boyunca bilimsel desteklerini esirgemeyen, b¼y¼k desteklerini g¼rd¼đ¼m ve tecr¼belerinden faydaland¼đ¼m danıŐman hocam Sayın Prof. Dr. Zeynep G¼LAY'a ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalındaki diğer hocalarıma ve Uzman Dr. Y¼ce AYHAN'a ve verdikleri manevi destekten dolayı ailem ve eŐime saygı ve teŐekk¼rlerimi sunarım.

Dr. Hatice SANLI AVCI

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA NO</u>
İÇİNDEKİLER.....	4
TABLO LİSTESİ.....	5
ŞEKİL LİSTESİ.....	6
GRAFİK LİSTESİ.....	6
KISALTMALAR.....	6
ÖZET-ANAHTAR SÖZCÜKLER	9
SUMMARY-KEYWORDS	10
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	12
2. GENEL BİLGİLER.....	13
2.1 <i>Campylobacter spp.</i> 'nin genel ve mikrobiyolojik özellikleri.....	15
2.1.1 <i>Campylobacter spp.</i> Epidemiyolojisi	18
2.1.2 <i>Campylobacter spp.</i> 'nin virulans faktörleri	19
2.1.2.1 Hareket ve kemotaksi.....	19
2.1.2.2 Adezyon ve invazyon	20
2.1.2.3 Toksin üretimi.....	20
2.1.2.4 Demir kullanımı.....	21
2.1.2.5 Yüzeyel (kapsüler) polisakkarit yapıları.....	21
2.1.2.6 Oksidatif stres yanıtı.....	22
2.1.2.7 Isı şok cevabı.....	22
2.1.3 <i>Campylobacter spp.</i> enfeksiyon patogenezi ve yol açtığı hastalıklar.....	23
2.1.4 <i>Campylobacter</i> türlerinin saptanması.....	25
2.1.4.1 Kültür yöntemleri	25
2.1.4.2 Kültür dışı tanımlama yöntemleri.....	28
2.1.4.3 <i>Campylobacter spp.</i> nin tiplendirilmesi	31
2.1.5 <i>Campylobacter</i> türleri ve antibiyotik duyarlılıkları.....	32
2.1.6 <i>Campylobacter</i> enfeksiyonlarını önlemek için öneriler.....	35
2.2 Enterohemorajik <i>Escherichia coli</i>	35
2.2.1 Enterohemorajik <i>Escherichia coli</i> enteritinin kliniği.....	37
2.2.2 Enterohemorajik <i>Escherichia coli</i> epidemiyolojisi.....	39
2.2.3 Enterohemorajik <i>Escherichia coli</i> izolasyonu.....	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
3.1 Örnekler.....	41
3.2 Dışkı örneklerinin incelenmesi.....	41
3.3 <i>Campylobacter spp.</i> kültürü	42
3.4 İnkübasyon	43
3.5 Tanımlama	43

3.6	<i>Campylobacter</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının incelenmesi.....	43
3.7	EHEC izolasyonu.....	43
3.8	Moleküler yöntemler	44
3.8.1	<i>Campylobacter</i> için moleküler yöntem.....	44
3.8.1.1	DNA ekstraksiyonu.....	44
3.8.1.2	PZR uygulaması.....	44
3.8.2	EHEC <i>stx</i> genlerinin saptanması.....	46
3.8.2.1	EHEC için moleküler yöntem.....	46
3.8.2.2	DNA ekstraksiyonu.....	46
3.8.2.3	PZR uygulaması.....	46
3.9	APİ Campy (bioMerieux, Fransa) ile <i>Campylobacter spp.</i> tanımlanması...48	
3.10	İstatistiksel Analizler:.....	48
4.	BULGULAR.....	48
4.1	Gaita kültürlerinin sonuçları.....	48
4.2	Üremelerin aylara göre dağılımı.....	51
4.3	<i>Campylobacter</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları.....	53
4.4	<i>Campylobacter</i> tür tanımlarının doğrulanması.....	54
4.4.1	<i>Campylobacter</i> multipleks PZR sonuçları.....	54
4.4.2	APİ Campy sonuçları	55
4.5	EHEC <i>stx-1</i> ve <i>stx-2</i> multipleks PZR sonuçları.....	55
5.	TARTIŞMA.....	56
6.	SONUÇ ve ÖNERİLER.....	58
7.	KAYNAKLAR.....	59

TABLO LİSTESİ:

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1: Çalışmada PZR analizi için kullanılan öncüller.....	47
Tablo 2: İşlenen ve <i>Campylobacter</i> üreyen örnek sayısı.....	49
Tablo 3: 01/06/2007-31/05/2008 tarihleri arasında DEÜ Merkez Laboratuvarı'na gelen dışkı örneklerinde üreyen patojen bakteriler ve sayıları.....	50
Tablo 4: Yaş gruplarına göre işlenen ve üreme saptanan örnek sayıları.....	51
Tablo 5: İzole edilen 85 <i>C. jejuni</i> ve 12 <i>C. coli</i> 'nin aylara göre dağılımı.....	52
Tablo 6: <i>C. jejuni</i> ve <i>C. coli</i> 'nin antibiyotik duyarlılıkları.....	53
Tablo 7: <i>C. jejuni</i> ve <i>C. coli</i> 'de cinsiyete göre dağılım.....	54
Tablo 8: APİ Campy sonucu.....	55
Tablo 9: EHEC multipleks PZR sonucu.....	56

ŞEKİL LİSTESİ:

<u>Şekil No</u>	<u>Şekil No</u>
Şekil 1: mCCDA besiyerinde üreyen <i>Campylobacter</i> kolonilerinden hazırlanan Gram boyalı preparatın X100 büyütmedeki mikroskopik görüntüsü.....	49
Şekil 2: <i>Campylobacter</i> Multipleks PZR jel görüntüsü.....	54
Şekil 3: EHEC Multipleks PZR jel görüntüsü.....	55

GRAFİK LİSTESİ:

<u>Grafik No</u>	<u>Grafik No</u>
Grafik 1: Yaş gruplarına göre <i>Campylobacter spp.</i> oranları.....	51
Grafik 2: İzole edilen 85 <i>C. jejuni</i> ve 12 <i>C. coli</i> 'nin aylara göre dağılımı.....	52

KISALTMA LİSTESİ:

AFLP: Amplified fragment length polymorphism analysis

CAT medium: Cefoperazon, Amphotericin-B ve Teichoplanin agar

CDT: Cytolethal Distending Toxin

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CSM: Karmali Agar veya Charcoal based Selective Medium

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EHEC: Enterohemorajik *Escherichia coli*

EHEC-Hly: Enterohemorajik *Escherichia coli* enterohemolizini

ELISA: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

EPEC: Enteropatojenik *Escherichia coli*

EPEC: Enterotoksijenik *Escherichia coli*

FDA: Food and Drug Administration

Gb3: Globotetraosilseramid

GBS: Guillain-Barre Sendromu

HSP: Heat Shock Proteins

HÜS: Hemolitik Üremik Sendrom

IVIG: İntravenöz immünglobulin

LEE: Locus of Enterocyte Effacement

LOS: Lipo-oligosakkarit

mCCDA: Modifiye Charcoal Cefoperazon Deoksikolat Agar

MFS: Miller Fisher Sendromu

MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon

MLEE: Multilocus Enzyme Electrophoresis

MLST: Multilocus Sequence Typing

NM: Non Motil

PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

REA: Restriction Endonuclease Analysis

RFLP: Restriction fragment length polymorphism

SDS-PAGE: Whole cell protein profiling

SMAC: Sorbitollü Mac Conkey besiyeri

SOD: Süperoksit dismutaz

SSM: Semisolid blood-free motility medium

Stx: Shiga-like toksin

ÖZET

Diyareli Hastalarda *Campylobacter spp.* ve Enterohemorajik *Escherichia coli* sıklığının Araştırılması

Sanli Avcı Hatice, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İzmir

Amaç: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ve Behçet Uz Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi mikrobiyoloji laboratuvarlarına diyare öntanısı ile gönderilen dışkı örneklerinde, *Campylobacter spp.* ve Enterohemorajik *Escherichia coli*'nin prevalansını belirlemek ve üreyen izolatların antibiyotik duyarlılıklarını incelemektir.

Yöntem: Çalışmamızda, Haziran 2007- Mayıs 2008 tarihleri arasında, 775 dışkı örneğinden m CCDA besiyeri ve hipurat hidrolizi testi kullanılarak 85 adet *Campylobacter jejuni* ve 12 adet *Campylobacter coli* izole edildi. Moleküler tanımlama için PZR ile *Campylobacter spp.* *16S rRNA* geni ile hipurikaz geni varlığı araştırıldı. Ayrıca, hipurat negatif izolatlar ile hipurat testi pozitif olan 5 izolatın tür tanımlanması ApiCampy ile de doğrulandı. İzolatların antibiyotik duyarlılıklarının saptanması için; E-Test yöntemi ile meropenem, gentamisin, doksisisiklin, eritromisin ve siprofloksasin duyarlılıklarına bakıldı. Çalışmanın EHEC izolasyonunu kapsayan ikinci kısmında, akut ishal yakınması ile başvuran ve yapılan dışkı kültürlerinde herhangi bir patojen bakteri (*Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* vb.) üremediği halde *E. coli* üremesi olan toplam 171 örnek işleme alındı.

Sonuç: Çalışma süresince toplam 97 *Campylobacter spp.* üretildi ve tanımlama protokolü rutin laboratuvara yerleştirildi. *C. jejuni*'lerde eritromisin ve doksisisikline % 11.8, gentamisine % 4.7, siprofloksasine % 51.8 oranında direnç tespit edildi. İzolatların tümü meropeneme duyarlı idi. *C. coli* izolatlarında ise, meropenem, gentamisin ve doksisisikline direnç saptanmazken, eritromisine % 17 ve siprofloksasine % 50 oranında direnç tespit edildi. EHEC saptanmasında; üreyen 171 *E. coli*'den beş tanesi O:157-H7 antiserumu ile reaksiyon verdi ve Enterohemorajik *Escherichia coli* olarak adlandırıldı. *Escherichia coli*'lerin tamamı *stx-1* ve *stx-2* genleri açısından PZR ile incelendi ve hiçbir suşta *stx-1* ve/veya *stx-2* geni saptanmadı.

Tartışma: Bu verilere göre bölgemizde Enterohemorajik *E. coli* O:157-H7 serotip dışında diğer serotiplerin diyare etkeni olması sözkonusu olabilir. Bu nedenle, diğer *E. coli*'nin serotiplerinin de araştırılması uygun olacaktır. Diyare etkenleri arasında önemli bir ajan

olduğu anlaşılan *Campylobacter spp.*'nin laboratuvar tanısı bölgemizdeki sıklığı ve antimikrobiyal duyarlılığının tespiti büyük önem taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Campylobacter spp.* , Enterohemorajik *E. coli* O:157-H7, izolasyon yöntemleri, PZR, Antimikrobiyal duyarlılık

SUMMARY

Investigation of *Campylobacter spp.* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* prevalence in diarrheal stools

Sanli Avcı Hatice, Dokuz Eylül University Medical Faculty, Medical Microbiology Department, İzmir

Aim: In this study, it was aimed to determine microbiological procedures that were used in isolation and identification of *Campylobacter spp.* and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* from the stools of the patients with diarrhea which were send to Microbiology Laboratories of Dokuz Eylül University Medical Faculty Hospital and Behçet Uz Education and Investigation Hospital of Children's Disease. Detection of 16S rRNA and hippuricase genes of *Campylobacter spp.* and *stx-1* and/or *stx-2* genes of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* was also aimed.

Method: A total of 775 stool specimens were examined by culture and hippurate hydrolysis during the study period (June 2007- May 2008). Genus and species identification were also confirmed by PCR by determining *Campylobacter* specific 16 SrRNA and hippuricase genes. Eighty- five *Campylobacter jejuni* and 12 *Campylobacter coli* strains which were isolated by phenotypic methods which were confirmed by the molecular methods also. Confirmation of the species identification in 9 hippuricase negative isolates and five hippuricase positive *Campylobacter* isolates was also performed by using ApiCampy kit. Susceptibilities of the isolates to meropenem, gentamicin, doxycyclin, erythromycin and ciprofloxacin were explored by E-Test method. In the second phase of the study 171 stool specimens which yielded no pathogens except *E.coli* and which were taken from patients who had applied to the outpatient clinics with a complaint of acute diarrhea that were investigated for the existence of EHEC O157:H7 by *stx1/2* PCR.

Result: A total of 97 *Campylobacter* spp were detected by culture and hippurate hydrolysis. The results were confirmed by PCR and API Campy. When antibiotic susceptibilities were studied, no resistance against meropenem had been detected among *C. jejuni* isolates. The resistance rates for erythromycin, doxycyclin, gentamicin, and ciprofloxacin were 11.8%, 11.8%, 4.7% and 51.8%, respectively. While no resistance against meropenem, gentamicin and doxycyclin had been detected among *C. coli* isolates, the resistance rates for erythromycin and ciprofloxacin were 17.0% and 50.0%, respectively. Five of 171 *E. coli* isolates gave agglutination with O:157-H7 antiserum and identified as enterohemorrhagic *Escherichia coli*. All *Escherichia coli* isolates were investigated for existence of *stx-1* and *stx-2* genes by PCR method and the *stx-1* and/or *stx-2* genes were detected in none of the isolates.

Conclusion: The ratio of diarrhea related with Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O:157-H7 is low in our region according to our data. The serotypes other than Enterohemorrhagic *E. coli* O:157-H7 may be the reason of diarrhea in our region. Therefore it will be appropriate to investigate the other serotypes of *E. coli*. This study confirmed that *Campylobacter* spp. are important pathogens among bacteria which cause diarrheae and their laboratory diagnosis, prevalence in our region and detection of antimicrobial susceptibility are important.

Key Words: *Campylobacter* spp. , Enterohemorajik *E. coli* O:157-H7, isolation methods, PCR, Antimicrobial susceptibility

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Tüm gelişmelere ve dünyanın pek çok yöresindeki sağlık önlemlerine karşın, bulaşıcı hastalıklar günümüzde de en önemli ölüm sebepleri arasında yer almaktadırlar. Gastrointestinal enfeksiyonlar, özellikle de diyareler, bütün dünyada üst solunum yolları enfeksiyonlarından sonra en sık görülen enfeksiyonlardır. Ülkemizde çocukluk yaş grubunda diyareler ölüm nedenleri arasında ikinci sırayı almaktadır. Diyare etkenleri, bölgelere göre farklılıklar gösterebilmektedir. Nüfus yoğunluğu fazla ve gelişmekte olan bölgelerde *Salmonella spp.* ve *Shigella spp.* gibi klasik gastroenterit etkenleri yaygın iken, gelişmiş bölge veya ülkelerde *Campylobacter spp.* gibi bazı mikroorganizmalar patojen olarak önem kazanmaktadır. Diyareye neden olan etkenler arasında *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Campylobacter spp.* ve EHEC (Enterohemorajik *E. coli*) Eylül 2004'te T.C. Sağlık Bakanlığınca yayınlanan "Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi; Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi"nde Grup D (laboratuvardan bildirim zorunlu hastalıklar) hastalıklar arasında yer almaktadır (1).

Campylobacter spp. ve EHEC özel üretim ve tanımlama koşulları gerektirdiği için ülkemizdeki laboratuvarlardan pek azı tarafından saptanmaktadır. Ülkemizde, laboratuvarlarda rutin olarak bakılmadığından dolayı *Campylobacter spp.*'ye bağlı enfeksiyon sıklığına ve direncine ilişkin veri kısıtlıdır. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzısıhha merkezince 2006 yılında yapılmış ve Türkiye genelini kapsayan bir anket çalışmasında, ankete katılan laboratuvarların % 96.7'sinde *Campylobacter spp.* bakılmadığı, % 0.7'sinde değerlendirilmenin geçersiz olduğu, % 0.5'inde iyi derecede değerlendirildiği ve % 2.1'inde ise orta derecede bir değerlendirme yapıldığı ortaya çıkmıştır (2).

Özellikle invazif, yangıya yol açan etkenler ile ilgili olarak sistemik yayılıma engel olmak ve diyare süresini kısaltmak için antibiyotik tedavisi uygulanabilmektedir. Günümüzde infeksiyöz diyare etkenlerinin virülans faktörleri, hastalığın fizyopatolojisi ve tedavisinde kayda değer gelişmeler sağlanmıştır. Ancak, patojen mikroorganizmaların gün geçtikçe daha çok sayıda antimikrobiyal ajana dirençli hale gelmesi enterik enfeksiyonların tedavisinde sorun yaratmaktadır. Akut gastroenteritlerin tedavisinde empirik olarak antibiyotik kullanımı

yaygın bir uygulamadır. Enfeksiyöz diyarelerin büyük bir bölümü kendi kendini sınırlayabilen hastalıklar olmalarına karşın, uygun olmayan ve/veya gereksiz antibiyotik kullanımı tedavi maliyetinde artışa, mikroorganizmalarda antibiyotik direncine ve hastalarda yan etkilere yol açabilmektedir. Bu nedenle, bir bölgede gastroenterit etkenlerinin bilinmesi doğru tanı ve etkin tedavi fırsatı sağlayacağı gibi, antimikrobiyal tedavi gereken durumlarda antibiyotik seçimi için de yol gösterecektir.

Bu çalışmada, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ve Behçet Uz Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne diyare şikayeti ile başvuran yetişkin ve çocuk hastaların dışkı örneklerinden yapılacak kültürlerde rutin olarak bakılmayan, bildirim zorunlu etkenlerden *Campylobacter spp.* ve EHEC'in sıklığının kültür, biyokimyasal ve moleküler yöntemler kullanarak belirlenmesi ve bu etkenlerin tedavide en sık kullanılan antibiyotiklere karşı direnç durumlarını saptanması amaçlanmıştır. Böylelikle, bölgemizdeki *Campylobacter spp.* ve EHEC'in gastroenterit etkenleri arasındaki prevalansı ve antibiyotik direnç paternleri belirlenecek ve bu veriler, etken mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlarda uygun antibiyoterapi ile hastalık süresinin, komplikasyonlarının ve giderlerinin azalmasında etkili olacaktır. Bunların yanı sıra, PZR ile toksin genlerinin ve kolaylıkla tür tanımı yapılamayan mikroorganizmaların saptanabilmesi, laboratuvarında tanımlama süresini kısaltacak, verimi arttıracaktır. Yine bu çalışma süresince edinilen deneyim ile halen rutin laboratuvarımızda bakılmayan *Campylobacter spp.* ile ilgili saptama ve tanımlama yöntemlerinin laboratuvarımıza yerleştirilmesi hedeflenmektedir.

1. GENEL BİLGİLER

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) “diyare”yi, kişinin normalden daha sık ya da günde üç veya daha fazla sulu dışkılması veya sadece anne sütü ile beslenen bebeklerde ise her zamankinden daha sık ve sulu dışkılama olarak tanımlamaktadır (3). Diyare, sıklıkla gastrointestinal bir enfeksiyona ait bir bulgudur. Farklı patojenler diyareye yol açabilmektedir. İnfeksiyon; kontamine gıdalar, içme suları ile veya kötü hijyen nedeniyle bulaşmakta ve kişiden kişiye yayılabilmektedir. Ciddi diyare, özellikle çocukluk yaş grubunda sıvı kaybı nedeniyle hayatı tehdit edici nitelikte olabilmektedir. Bazı gıda kaynaklı hastalıklarda bulaş

yolu ve hastalık patogenezi göreceli olarak iyi bilinmektedir. Örneğin, salmonelloziste kümes hayvanlarının et ve yumurtaları ile bulaş sıktır. Kolera, kontamine su ve su ürünleri ile bulaşabilmektedir. Yine *Shigella spp.*, *E.coli* serotip O157:H7, *Campylobacter spp.*, *Listeria monocytogenes* gibi patojenler de gıda kaynaklı bulaştan sorumlu etkenler arasındadır (4,5). *E.coli* serotip O157:H7 için sığır ve diğer geviş getiren hayvanların rezervuar olduğu ve insanlara başlıca bulaş şeklinin çiğ veya az pişmiş etler ve çiğ sütle olduğu bilinmektedir. *E.coli* serotip O157:H7 çocuklarda akut diyare yanısıra hemolitik üremik sendroma (HÜS) da neden olmaktadır (6).

Birbirinden farklı pek çok sınıflama yapılmasına karşın DSÖ diyareli hastalıkları, klinik olarak ayırabilen ve farklı tedavi yaklaşımları getiren üç gruba ayırmaktadır: akut diyare, dizanteri ve inatçı (persistan) diyare (3).

Akut başlayan ve 14 günden kısa süren (genellikle yedi gün içerisinde sonlanan) diyare, akut diyare olarak tanımlanmaktadır. Bu olgularda genellikle dışkıda kan yoktur ve ölüm olursa dehidratasyondan kaynaklanır. En sık görülen etken mikroorganizmalar: rotavirus, adenovirus, enterotoksijenik *E.coli*, enteropatojenik *E.coli*, *Vibrio cholerae*'dir. Bir aydan uzun süren diyare ise kronik diyare olarak tanımlanıp genellikle altta yatan başka bir hastalık ile birlikte görülür.

Dizanteri, kanlı dışkılama olarak tanımlanmaktadır. Barsakta mukozal hasar ve bakteriyel invazyon mevcuttur. En sık görülen etken mikroorganizma *Shigella spp.*'dir. Ayrıca *Campylobacter jejuni*, enterohemorajik *E. coli* veya *Salmonella spp.* de etkendir. *Entamoeba histolytica* da dizanteriye yol açabilmektedir.

Akut başlayan ve ondört günden uzun süren diyare, inatçı diyare olarak tanımlanmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde beş yaş altı çocuklarda diyarelerin % 3-20'si inatçı diyare olarak seyretmektedir. En sık etken mikroorganizmalar: Enteroadheran *E. coli*, *Cryptosporidium* ve *Aeromonas*'tır.

Ülkemiz ve dünyada diyare belli yaş grubu hastalarda önemli morbidite ve mortalite sebebidir. Ülkemizin gelişmekte olan ülkeler arasında olduğu göz önünde tutulacak olursa bu durum bizim için daha da önem arz etmektedir. Çevresel etkenler, beslenme alışkanlıkları, su

ve gıda temizliği, bölgeler arası yolculuklar gibi farklı etkenler diyarede rol oynamaktadır. Diyareye sebep olan etkenin bilinmesi hem tedavide hem de korunma önlemlerinin alınmasında önemlidir.

Bakteriyel nedenli akut diyareler % 15- 20 oranında görülmekte olup *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Aeromonas* ve *Yersinia* türlerine sıklıkla rastlanmaktadır. Viral etkenler % 25-30 oranında akut diyareye sebep olurken bebeklerde bu oran % 30-40'a çıkmaktadır. Rotavirus ve enterik adenoviruslar en sık viral etkenlerdir. Paraziter nedenler % 15- 25 sıklıkta görülmekte ve en sık rastlanan etkenler *E. histolytica* ve *Giardia lamblia*'dir (7,8).

DSÖ verilerine göre diyarenin, gelişmekte olan ülkelerde her yıl çoğunluğu beş yaş altı çocuk olmak üzere yaklaşık 2. 2 milyon kişinin ölümüne sebep olduğu tahmin edilmektedir. Yine DSÖ verilerine göre tüm dünyada yılda yaklaşık dört milyar diyare vakası görülmektedir (9). Ülkemizde de 1- 5 yaş grubundaki ölümlerin alt solunum yolu enfeksiyonlarından sonra ikinci en sık nedenidir (3).

2.1. *Campylobacter spp.*'nin genel ve mikrobiyolojik özellikleri

Campylobacter spp. gastrointestinal sistem başta olmak üzere çeşitli sistemlerde enfeksiyona neden olan ve hem gelişmiş ülkelerde hem de gelişmekte olan ülkelerde akut diyare etkeni olarak karşımıza çıkan bir patojendir. Hastalık, genellikle kanlı mukuslu diyare, karın ağrısı, halsizlik, ateş, bulantı ve kusma ile seyreder. Diyare 2-5 günde kendi kendini sınırlar. Bazı hastalarda reaktif artrit ve Guillain-Barre Sendromu (GBS) gelişebilmektedir (10). Hastalıktan ölüm sık olmayıp daha çok bebek ve yaşlılarda karşımıza çıkabilmektedir. Dünyadaki tüm diyarelerin % 5-14'ünün *Campylobacter spp.*'den kaynaklandığı düşünülmektedir. Bakteri, kümes hayvanları, sığır, domuz, koyun gibi etlerinden faydalanılan hayvanlar ile kedi ve köpek gibi evcil hayvanlarda bulunabilmektedirler. Hayvanlarda herhangi bir belirti olmayabileceği gibi bir kısmı sığır ve domuzlarda infertilite ve düşüklere sebep olabilmektedir. İnsanlara az pişmiş veya çiğ etler ve çiğ süt ile bulaş olmaktadır (11).

Campylobacter spiral formları, ilk defa 1886 yılında Theodor Escherich tarafından diyareli yenidoğanlar ile yavru kedilerin dışkılarında tanımlanmıştır. Ancak bakteriyi katı besiyerlerinde üretme denemeleri başarılı olamamıştır. Daha sonra 1909 yılında McFadyean ve Stockman bugün *Campylobacter fetus* olarak bildiğimiz bakteriyi bir koyunun uterusundan saf olarak üretmeyi başarmışlardır. Bu araştırmacılar bakteriyi 'vibrio' olarak adlandırmışlardır. 1919 yılında Smith ve Taylor ise düşük yapmış bir sığırdan *Vibrio fetus* adını verdikleri bakteriyi izole etmişlerdir. Bakteri daha sonraları sığırların jejunumlarından izole edildiği nedeniyle *Vibrio jejuni* adını almıştır. Güvercinlerden de *Vibrio coli* izole edilmiştir. Mayıs 1938'de Illinois Eyaletinde bir hapisanenin bitişik koşullarında yatan 355 mahkumda süt kaynaklı ilk *Campylobacter jejuni* veya *Campylobacter coli* salgını rapor edilmiştir. Vibrio izolatlarıyla çeşitli sistematik çalışmalar yapan Elisabeth King'in *Campylobacter*'leri 'vibrio akrabası' olarak geçici bir şekilde tanımlaması bir dönüm noktası sayılabilir. 1972'de Belçika'da Dekeyser ve Butzler, bakteriyi akut gastroenteritli hastaların gaitalarından başarılı şekilde izole etmişlerdir (12). Özel kültür şartları gerektirmesi, genetik bilgisi ile ilgili fazla bir bilgi sahibi olunmaması bu bakteri hakkında *E.coli* ve *Salmonella spp.* gibi diğer enterik patojenler kadar bilgi sahibi olmaya engel olmuştur. Skirrow'un seçici besiyerinin geliştirilmesinden sonra mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin olarak *Campylobacter* izolasyonu yapılmaya ve bunların klinik rolleri araştırılmaya başlanmıştır. Gaita örneklerinden başarılı bir şekilde izolasyonundan sonra *Campylobacter jejuni* insan bakteriyel gastroenterit sebepleri arasında sık tanımlanır olmuştur (13).

Campylobacter jejuni için bir diğer dönüm noktası, bakterinin 1.64 milyon nükleotidlik genomunun tam dizisinin çıkarılması olmuştur. Bu durum, bakterinin virulans faktörleri ve yapısal özellikleri ile ilgili araştırmalara hız katmıştır. *Campylobacter jejuni*, insan hastalık etkeni *Campylobacter* türlerinin, hakkında en çok çalışılan ve en çok bilgi sahibi olunan üyesidir (14).

Campylobacter spp. ince, 1.5- 6.0 µm uzunluğunda ve 0.2- 0.5 µm eninde, Gram negatif, sivri bir şekilde sonlanan spiral veya martı kanadı şeklinde basillerdir. Katalaz ve oksidaz testleri pozitifdir. *Campylobacter* basilleri çoğunlukla spiral şeklinden ve hareket özelliğinden sorumlu olan bir ya da her iki ucunda yer alan polar flajellere sahiptir. *Campylobacter spp.* kültürünün özel şartlar gerektirmesi nedeniyle bu mikroorganizmanın gaitadan rutin kültürü

nispeten yakın zamanlarda gelişme göstermiştir. *Campylobacter spp.* mikroaerofilik özellikte olup % 5 O₂ ve % 10 CO₂ içeren atmosfer ortamına ihtiyaç duyar. Normal atmosferik oksijen varlığında üreyemez. Termofilik özellikte olup en iyi 42°C'de ürer. Bu özelliği onun sıcakkanlı hayvanlar ile kuşların bağırsak sisteminde yaşayabilmesini sağlar. Hipurikaz enzimi aracılığı ile N-benzoilglisin'i benzoik asit ve glisine parçalar.

Günümüze kadar tanımlanmış 16 *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. lari*, *C. coli*, *C. upsaliensis*, *C. helveticus*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. mucosalis*, *C. coccisus*, *C. curvus*, *C. showae*, *C. rectus*, *C. sputorum*, *C. gracilis*, *C. lanienae*, *C. hominis*) türü olmasına rağmen yeni türlerin ortaya çıkması devam etmektedir (15,16). *C. fetus* insan hastalık etkenlerinden nadiren izole edilmesine karşın koyun ve sığırlarda düşük ve infeksiyöz infertilitenin sık sebepleri arasında yer almaktadır. Geleneksel olarak *C. jejuni* ve *C. coli* insan enteropatojenleri olarak tanımlanmışlardır. Bununla beraber *C. upsaliensis*'e özellikle çocuklarda yeni yeni diyare etkeni olarak tanı konulmaya başlanmıştır (17).

Campylobacter spp. nisbeten küçük bir genoma sahiptir. Genomu yaklaşık 1.6-1.7 Mbp boyutunda olup AT'ce zengin bir DNA yapısı gösterir. GC oranının ise yaklaşık %30 civarındadır. Bu özellikleri *C. upsaliensis* hariç diğer *Campylobacter spp.*'de aynıdır. *C. upsaliensis* genomu 2 Mbp civarındadır (18).

C. jejuni ve *C. coli*'den kaynaklanan diyarelerin klinik spektrumu orta, inflamatuvar olmayan sulu diyareden ciddi inflamatuvar diyareye kadar değişkenlik gösterebilir. *C. jejuni* ve *C. coli* ilk başlarda gelişmiş ülkelerde sık gösterilirken daha sonraları gelişmekte olan ülkelerde de artan oranlarda tanı konmaya başlanmıştır.

Campylobacter'ler normal atmosferik oksijene maruz kaldıkları zaman spiral formdan yuvarlak veya kokoid forma geçerler. Bu şekil değişikliğinin kültüre edilebilir formdan kültüre edilemez forma geçiş ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu uyuyan formdaki (dormant-like state) bakterilerin uygun olmayan çevresel şartlarda yaşamak için bir adaptasyon şekli olduğundan şüphelenilmektedir (19).

2.1.1. *Campylobacter spp.* Epidemiyolojisi

Campylobacter enteriti gıda zehirlenmesinden çok, su ve gıda kaynaklı bulaş gösteren bir hastalık olarak ele alınmaktadır. *Campylobacter spp.* ilk olarak güvercinlerde rapor edilmiş olup çocuklarda, koyun, sığır, kedi ve köpeklerde kronik taşıyıcılık bildirilmiştir. *Campylobacter spp.* çok sayıda evcil hayvan, yabani kuş ve hayvanın normal gastrointestinal florasının bir üyesidir. Bu nedenle etlerinden yararlanan evcil hayvanlar ile evde beslenen kedi ve köpek gibi hayvanlardan bulaş epidemiyolojik açıdan önemlidir. Bakteri taşıyan hayvanın kesimi sırasında etin bağırsak içeriği ile teması ve bu etlerin yeterince pişirilmeden yenmesi, diyare olmuş evcil hayvanlar ile doğrudan temas veya bunların dışkıları ile kontamine olmuş su, süt veya diğer gıdaların alınması ile bulaş gerçekleşmektedir.

İnsanlardaki *Campylobacter* enfeksiyonlarının epidemiyolojisinin daha iyi anlaşılması ve antimikrobiyal direnç durumunun saptanması için hayvanlardan izole edilen suşların direnç profilinin de bilinmesinin katkısı olacaktır.

Avrupa'da, hayvanlarda, gıda çalışanlarında, kümes hayvanları ve etlerinde *Campylobacter* taşıyıcılığının izlenmesi amacıyla bir sürveyans çalışması yapılmaktadır. 1999 yılından beri bu sürveyans programı yürütülmekte ve katılımcı ülkelerdeki mevcut *Campylobacter* durumu rapor edilmektedir (20,21).

C. jejuni ve *C. coli* enteriti *Salmonella spp.* gibi diğer intestinal enfeksiyon ajanları ile kıyaslandığında gelişmiş ülkelerde büyük bir halk sağlığı problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Diğer bakteriyel diyare etkenleri ile kıyaslandığında insidansı belirgin bir şekilde yüksek olup özellikle kümes hayvanları gibi bazı yiyecek çeşitleri ile yakın ilişkilidir. En yüksek insidans küçük çocuklarda görülmektedir. Çoğu vaka sporadik olup mevsimlerle uyum göstermektedir. Genel popülasyondaki hastalık insidansının doğru tahmini, kuşkusuz laboratuvar izolasyon oranına bağlıdır.

Gelişmekte olan ülkelerdeki tanımlanmış *Campylobacter* enfeksiyonları, gelişmiş ülkelerdekinden farklı klinik ve epidemiyolojik özelliklere sahiptirler. Gelişmekte olan ülkelerde hastalık genellikle çocuklarla sınırlı olup yetişkinlerde sık görülmemekte ve güçlü bir mevsimsel ilişki saptanmamaktadır. Asemptomatik taşıyıcıların yüksek oranına rağmen enfeksiyona bağlı komplikasyon insidansı da yüksek değildir. Bu farklılıkların çoğu muhtemelen bakteriye yüksek maruziyet oranına ve enfeksiyonun erken yaşlarda geçirilmesine ve buna bağlı olarak gelişmiş farklı bağışık yanıtlara bağlıdır. Yine suş farklılıkları da klinik belirtilerle yakın ilişki içindedir. Gelişmekte olan ülkelerdeki suş tiplerinin gelişmiş ülkelerde bulunanlardan farklı olduğuna dair çok az kanıt vardır. Turist diyaresine sebep olan *C. jejuni* suşlarının, ülkelere dönen turistlerin kendi ülkelerinde tanımlanan suşlarla benzer özellikte olduğu gözlenmiştir.

2.1.2. *Campylobacter spp.*'nin virulans faktörleri

2.1.2.1 Hareket ve kemotaksi

Campylobacter spp. barsağa kolonize olabilmek için intestinal hücre yüzeyini kaplayan mukus tabakasının içinde hareket etmeye ihtiyaç gösterir. *Campylobacter spp.*'nin polar flajellaları ve tirbuşon şeklindeki formlarının hareketli yapısı ile mukus bariyere etkili bir şekilde penetre olması en önemli virulans faktörlerinden biridir. Flajel varlığı ve bakterinin şekli müköz ortamlarda yüksek düzeyde hareketliliğini sağlar. *C. jejuni*'de flajel ile ilgili *flaA* ve *flaB* gen bölgeleri tespit edilmiş olup bu bölgelerin hareketlilik üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Her iki gen bölgesinin % 91.8 oranında identik olduğu ve yüksek düzeyde homoloji gösterdiği tespit edilmiştir. Guerry ve arkadaşları, normalde *flaA* salınımının *flaB* salınımından daha fazla olduğunu ve yapılan mutasyonel çalışmalarda hareket üzerinde *flaA*'nın daha etkili olduğunu saptamışlardır. Aynı çalışmada *flaA*⁻ ve *flaB*⁺ mutantların kısa ve kesik flajel ile hareketsiz olduğunu, *flaA*⁺ ve *flaB*⁻ mutantların ise hareketlerinin hafif düzeyde azaldığını saptamışlardır. Bu durum *flaB* geninin flajellar fonksiyonda rol oynadığına dair kanıt sayılabilir (22-24).

Kemotaksi, organizmanın kimyasal uyarılara karşı verdiği cevap, onları saptama ve arttırma veya eksiltme yeteneğidir. Hem hareket hem de kemotaksi *C. jejuni*'nin barsağa

kolonizasyonu için gereklidir. Çünkü yapılan hayvan modellerinde kemotaksi yapamayan *C. jejuni*'nin barsağa kolonize olamadığı görülmüştür (25).

İntestinal boşlukta L-serin ve L-fukoz varlığında *C. jejuni*'nin mukusa kemotaksisinin arttığı ancak safra asitlerinin kemotaksi üzerinde olumsuz etki gösterdiğini bildirilmiştir (26).

2.1.2.2 Adezyon ve invazyon

İnfeksiyondan sonra *Campylobacter spp.* epitelial hücreleri kaplayan mukus tabakasını geçer ve bu hücelere adere olur (yapışır). Takiben epitelial hücreler içerisine girer. *Campylobacter* enfeksiyonlarında, epitelyal hücelere girişin mukozal hasar ve inflamasyonu başlatabildiği sıklıkla görülür. Hücreye girişin inflamasyonu tetiklediği ve interlökin-8 gibi çok sayıda proinflamatuvar belirteci indüklediği düşünülmektedir. Ancak inflamasyonun epitelial hasar veya diyarede doğrudan rol oynayıp oynamadığı açık değildir (27,28). İlk teşhis belirteci flajellar yapışma ve hücre içerisine giriştir. Yapışma ve hücre içerisine giriş hareket ve flajella üretimine bağlıdır. Nitekim *C. jejuni* mutantları ile yapılan çalışmalarda flajellar paraliye bağlı azalmış hareket durumunda yapışmanın azaldığı ve hücre içerisine girişin olmadığı gösterilmiştir (29).

2.1.2.2 Toksin üretimi

C. jejuni'nin konak bağırsak hücresine invazyonu her ne kadar yavaş bir sitotoksik etki oluştursa da asıl sorumlu olan faktör bakterinin toksik aktivitesidir. Sitotoksinler, enterotoksinler toksik aktivite oluşturan elemanlardır.

Sitotoksinler hedef hücreyi öldüren proteinler olarak tanımlanmışlardır (30). “Cytotolethal distending toxin (CDT)”, 70-kDa “cytotoxin”, hemolitik sitotoksinler, “Vero/HeLa cell cytotoxin”, “Shiga-like” toksin, fosfolipaz (pldA), hepatotoksin vb. toksinler tanımlanmıştır (30,31). CDT belli hücre tiplerinde yavaş etkiden başlayıp hücre ölümüne ilerleyen toksik aktiviteye sebep olur (32). *C. jejuni* ve *C. coli* CDT gen titresini açısından incelenmiş ve *C. jejuni* suşlarının yüksek CDT aktivitesi gösterdiği buna karşın *C. coli* suşlarının ise daha düşük CDT aktivitesi gösterdiği saptanmıştır (31). Diyare ile ilişkili CDT'nin fonksiyonel

villöz epitelyal hücrelerin doğrudan kaybına veya absorpsiyonu bozarak fonksiyon kaybına sebep olduğu düşünülmektedir.

Enterotoksinler, bir hücresele reseptöre bağlandıktan sonra hücre içine girip hücre içi cAMP seviyelerini arttırarak etki gösteren proteinler olarak tanımlanabilirler (30).

2.1.2.4 Demir kullanımı

Konaktan demiri elde etme yeteneği de virulans faktörleri içinde önemli yer almaktadır. Konak dokularındaki serbest demir konsantrasyonu bakteriyel büyüme için gereklidir ve çok düşük seviyelerinde bile *C. jejuni* demirden yeterli olarak yararlanabilmektedir (33). *C. jejuni* siderofor üretemez fakat diğer bakteriler tarafından üretilen siderofor ferrikrom ve enteroşelini kullanabilir. Aynı zamanda inflamasyon bölgesinden serbestleşebilen hem bileşiklerini de kullanabilir (33,34).

Gram negatif bakterilerin demir (Fe^{+2}) kazanım sistemleri genellikle bir dış membran proteinine bağlıdır. Bu sistemde demir eldesi demirin dış membran yüzeyinden alınması ve bir periplazmik bağlayıcı protein ve permeaz ile ATP bağlayıcı proteine bağlı bir iç membran taşıyıcı sistemi aracılığı ile yapılmaktadır. Ferröz demir (Fe^{+3}) transportu ise genellikle tek bir iç membran proteini tarafından taşınır ve transportta kullanılan enerji ATP hidrolizi aracılığı ile karşılanır.

C. jejuni, demirin kısıtlı bulunduğu durumlarda bir hemin/hemoglobin arttırma sistemi veya dış membran proteini reseptörünce fakir enteroşelin taşıyıcı sistemi gibi birkaç farklı demir kazanım sisteminin salınımını arttırabilir.

2.1.2.5 Yüzeysel (kapsüller) polisakkarit yapıları

Campylobacter spp.'nin dış membranı lipo-oligosakkarit (LOS) ve lipopolisakkaritleri içerir. Bu yapılar dış membranının major bileşenleri olup serum direnci, endotoksisite ve adezyon gibi virulans faktörlerinde rol alırlar. LOS, lipid A ve O-antijeni olmak üzere iki kısımdan oluşur (35).

C. jejuni'nin insan gangliosidine benzeyen sialillenmiş yüzeyel polisakkarit yapıları ve flajellasına yanıt olarak GBS geliştiği düşünülmektedir. GBS, akut gevşek paralizinin en sık sebeplerinden biri olup periferik sinir sisteminin otoimmün bir hastalığıdır. Kol, bacak ve solunum kaslarında hızla ilerleyen güçsüzlük, çoğunlukla kendi kendini sınırlayabilen ciddi nörolojik bozukluklarla karakterizedir. *C. jejuni*'nin ısıya dirençli serotiplerine karşı oluşan otoantikörlerin GBS'na neden olan demiyelinizasyondan sorumlu olduğu düşünülmektedir (36,37).

Campylobacter jejuni biyotip 2, serotip O:41'in sıklıkla izole edildiği GBS'lu hastalarda, hastalığın ciddi seyrettiği ve sıklıkla ventilatöre uzun süre ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir (10).

2.1.2.6 Oksidatif stres yanıtı

Campylobacter'ler mikroaerofilik bakteriler olup taşınma sırasında veya konak immün sistemi ile karşılaştığında üretilen toksik oksijen metabolitleri ile ölürlür. *C. jejuni* ve *C. coli* süperoksit stres savunma ve peroksit stres savunma sistemi olarak ikiye ayrılan benzer oksidatif stres savunma mekanizmalarına sahiptirler. Katalaz enzimi, metabolik aktiviteler sırasında oluşan serbest radikal süperoksit (O_2^-) anyonlarının süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından çevrildiği hidrojen peroksit (H_2O_2)'i H_2O ve O_2 'e parçalayarak bakteriyi oksidatif stresten korur (38).

2.1.2.7 Isı şok cevabı

C. jejuni ve *C. coli* herhangi bir ısı değişikliğine cevap verebilir. Çünkü bulunduğu yerlerdeki ısılar birbirlerinden farklı olabilmektedir. Nitekim, doğal olarak buldukları kanatlı sindirim sistemlerinde 42 °C'de yaşayabildikleri gibi konak insan vücudundaki ısı olan 37 °C'de veya taşınma sırasında su, süt veya etin ısısında (4°C veya değişik ısılar) yaşamını sürdürebilirler. Bakterinin bu ısı stres cevabı çoğunlukla yapımı indüklenen Isı Şok Proteinleri ("Heat Shock Proteins": HSP) tarafından gerçekleştirilir. *C. jejuni*'de birkaç tane ısı şok proteini tanımlanmıştır. GroESL, DnaJ, DnaK ve ClpB proteinleri gibi (39).

2.1.3. *Campylobacter spp.* enfeksiyon patogenezi ve yol açtığı hastalıklar

Campylobacter spp. gıda veya su ile alındıktan sonra mide asit bariyerini geçip distal ileum ve kolona kolonize olur. Mukus tabakası içerisine kolonize olduktan sonra intestinal hücre yüzeyine yapışır ve barsağın normal emilim kapasitesini bozarak epitelyal hücre fonksiyonlarını direkt olarak hasara uğratar. Bunun yanı sıra hücre invazyonu veya toksin üretimi ile indirekt yolla da inflamasyona sebep olarak hasara yol açar (40).

C. jejuni ve *C. coli* enfeksiyonları, akut karın ağrısı, ateş ve genel halsizlik gibi prodromal özellik gösterip yaklaşık yarıya yakını inflamatuvar tipte diyareye sebep olur. Belirtiler ciddi sulu diyareyi de içeren şekilde ağırlaşabilir. Belirtilerin ortaya çıkışı bakterinin alımından yaklaşık 1-7 gün sonradır. Diyareli gaita taze kan, mukus ve lökosit içerir. Bakteriyemi, enfeksiyonun erken dönemlerinde olup, yetersiz miktar ve sıklıkta örnek alımından dolayı tespiti zor olabilir. Akut diyare ve karın ağrısı genellikle 2-3 gün sürmekte ve çoğunlukla kendiliğinden sonlanmaktadır. Sigmoidoskopi, genellikle mukozal hasar, peteşiyal hemorajiler, ödem ve hiperemiden kaynaklanan mukozal değişiklikleri gösterir. İnflamasyon ileum ve jejunumun bazı kısımlarında da etkili olabilir. Bazen ilk ataktan daha ciddi olmayan alevlenmeler de görülebilir. Klinik belirtilerin bitiminden haftalar sonra bile bazı hastalardan *Campylobacter spp.* izole edilebilir. Hastalık çoğunlukla kendi kendini sınırladığından komplikasyon sık görülmez. En belli başlı komplikasyonu ise GBS olup yakın zamanda geçirilmiş *Campylobacter spp.*'ye bağlı enfeksiyonun serolojik kanıtları önemli bir göstergedir (10).

C. jejuni ve *C. coli*'ye bağlı gelişen diyarenin mekanizması tam olarak anlaşılamamasına rağmen kompleks ve birden fazla faktörün rol aldığı düşünülmektedir. Flajel ile ilişkili olduğu gösterilen hareketi, *Campylobacter spp.*'nin bağırsak duvarına kolonizasyonu için gereklidir. Deneysel çalışmalarda adezyon ve invazyonun da inflamatuvar diyare gelişiminde önemli rolü olduğu gösterilmiştir. Adezyonda, lipopolsakkarit, flajel, fimbrial filamentler ve yüzeyel proteinler gibi çok sayıda bakteriyel faktör etkili olmaktadır. İnvazyon kadar önemli bir diğer faktör de “ Cytolethal Distending Toxin” (CDT)'i de içeren toksin yapımıdır. İnvazyonun toksin gibi direkt olarak inflamatuvar etkisi olduğu düşünülmektedir. Diyare başlangıç döneminde bol ve sulu karakterde olup zamanla kanlı bir hal alır. *Campylobacter spp.*'ye

bağlı enterit tablosundaki diğer klinik belirtiler arasında ateş, baş ağrısı, kas ağrısı, bulantı ve kusma sayılabilir. Diyare özellikle küçük çocuklarda pik yapar ve birkaç gün sürüp çoğunlukla kendi kendine iyileşir.

Hastalık daha az sıklıkta kronik diyare, reaktif artrit, GBS, Miller Fisher Sendromu (MFS), peritonit, bakteriyemi, kolesistit, postinfeksiyöz ensefalopati vb. şekillerde de görülebilmektedir (10). *C. fetus* daha çok immün sistemi baskılanmış hastalarda (Agamaglobulinemi ve AIDS'lilerdeki tekrarlayan bakteriyemiler ve post-renal transplant hastalarındaki menenjitler gibi) sistemik enfeksiyon nedeni olarak tespit edilebilmektedir.

Reaktif artrite bağlı eklem şikayetleri genellikle diyare iyileştikten sonra ortaya çıkar. Reaktif artritin HLA-B27 ile birlikteliğinin % 11.6, diyare ile birlikteliğinin ise % 6.5 olarak bildirildiği çalışmalar mevcuttur. Finlandiya'da yapılmış bir çalışmada *Campylobacter spp.*'nin tetiklediği reaktif artrit oranı %7 olarak bulunmuştur (41).

Campylobacter'lerin GBS'nin patogenezindeki rolü hakkındaki bilgiler reaktif artrite bilinenlere göre nispeten daha fazladır. GBS periferik sinir sisteminin otoimmün bir hastalığıdır. Etkilenen kişilerde solunum kaslarını da içeren kaslarda zayıflık ve refleks kaybı gelişmektedir. Hastaların % 80-85'i sekelsiz iyileşmekte ancak % 15-20'sinde ciddi nörolojik sekeller kalabilmektedir. *C. jejuni*'nin lipopolisakkaritinin moleküler yapısı ile periferik sinir sisteminde yer alan gangliosidlerin moleküler yapısı arasında benzerlik söz konusudur. *C. jejuni*'nin lipopolisakkaritine karşı gelişmiş antikolar sinir ganglioizidleri ile de reaksiyona girer. Bu durum periferik sinirlerde hasara ve fizyolojik fonksiyon kaybına sebep olur.

Ataksi, arefleksi ve oftalmopleji, alt bulber varyantında konuşma ve yutkunma güçlüğü ile karakterize olan MFS, GBS'nin bir çeşididir. Tüm GBS'lu olgular arasında MFS'nun oranı % 7-8 arasında değişmektedir. MFS'da, GBS'nda olduğu gibi, otonom tutulum ve solunum yetersizliği kötü prognoz göstergesidir. Tedavinin temelini optimal yoğun bakım şartlarının sağlanması, uygun monitörizasyon, destek tedavisi yanı sıra plazmaferezis ve intravenöz immünglobulin (IVIG) uygulaması oluşturmaktadır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda komplikasyonlara bağlı mortalite oranı % 8- 18 arasında bildirilmektedir (10,42,43).

C. jejuni, *Campylobacter*'ler içerisinde insan patojeni olarak en sık karşımıza çıkan türdür. Gelişmiş ülkeler dahil tüm dünyada diyareli dışkılarından izolasyon oranı *Salmonella spp.* ve *Shigella spp.*'ye oranla iki ile yedi misli daha sıktır. Tüm evcil hayvanlar *C. jejuni* açısından taşıyıcı olabilir. *C. jejuni* özellikle tavuk, hindi ve su kuşları gibi kümes hayvanlarında kolonize olur. Bu hayvanların az pişmiş etleri, bakteri ile kolonize küçükbaş ve büyükbaş hayvanların çiğ sütleri, kontamine sular ve evcil hayvanların diyareli dışkıları ile temas, insan enfeksiyonlarına en sık yol açan kaynaklardır. Bu organizma ile gelişen diyarede, diğer *Campylobacter* türlerindeki diyarelerde olduğu gibi, kramp şeklinde karın ağrısı, ateş, halsizlik, baş/kas ağrısı ve başta kansız da olabilen ama genellikle kanlı şekle dönüşen diyare gelişir. Hastalarda diyare çoğunlukla 3- 7 gün içinde kendi kendini sınırlar. Bakterinin dışkı ile atılımı ise 2- 4 hafta devam eder. Diyare için antibiyotik tedavisine gerek yoktur ancak hastalığın ciddi seyrettiği kişilerde oral antibiyotik tedavisi verilebilir. Hastalık sadece diyare ile seyredebildiği gibi, septik artrit, menenjit ve sekonder proktokolit gelişimin de bildirildiği vakalar mevcuttur (44).

2.1.4. *Campylobacter* türlerinin saptanması

2.1.4.1 Kültür yöntemleri

Campylobacter'ler için farklı izolasyon yöntemleri 1970'lerin başlarında geliştirilmeye başlanmıştır. Bu yöntemler dışkının santrifugasyon sonrası filtrasyonu ve ekimi, seçici besiyerlerine ekim ya da farklı formülasyonlarda zenginleştirici sıvı besiyerlerini kullanarak çoğaltma idi. *Campylobacter* türlerinin iyi bir şekilde üremesi için basit besiyerlerine kan, serum ve kömür tozu gibi ek maddelerin eklenmesi ile başarılı sonuçlar alınmıştır. *Campylobacter spp.*'yi fekal içerikten rahat bir şekilde izole edebilmek için, kullanılan besiyerlerine sefalosporin, trimetoprim, polimiksin, novobiosin, vankomisin, teikoplanin, basitrasin, rifampisin, amfoterisin-B ve sodyum deoksikolat gibi flora bakterilerini baskılayacak, buna karşın *Campylobacter spp.*'nin dirençli olduğu antimikrobikler (antibiyotik/antifungal) eklenmektedir. Ancak sefalotin, kolistin ve polimiksin gibi ajanlar *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus subsp fetus*, *C. jejuni subsp doylei*, *C. upsaliensis* ve *Arcobacter butzleri*'nin bazı suşlarının üremesini inhibe edebilir. Bu nedenle dikkatli olunmalıdır.

Campylobacter spp. için kullanılan besiyerlerini kan içerip içermemelerine göre başlıca iki gruba ayırmak mümkündür.

- Kan içerenler: Skirrow besiyeri, Campy CVA besiyeri, Preston besiyeri, Campy-BAP (Blaser's besiyeri), Butzler besiyeri ve Campy-cefex besiyeri.
- Kan içermeyenler: Modifiye Charcoal Cefoperazon Deoksikolat Agar (mCCDA), Cefoperazon, Amphotericin-B ve Teichoplanin agar (CAT medium), Karmali Agar veya Charcoal based Selective Medium (CSM) ve Semisolid blood-free motility medium (SSM) sayılabilir.

Seçici besiyerleri içindeki antimikrobik ajanların, duyarlı *Campylobacter spp.* üzerindeki inhibitör etkilerinden dolayı, bu bakterilerin üretiminde filtrasyon gibi pasif yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntem, *Campylobacter spp.*'nin 0.65-0.45 µm çapındaki filtre özelliği gösteren membranlardan geçebilmesi prensibi ile çalışmaktadır. Fekal süspansiyon membrana damlatılır ve kanlı besiyeri yüzeyine filtrasyonu sağlanır. Bu da oda ısısı veya 37 °C'de yaklaşık 45 dakika sürer. Süzme tamamlandıktan sonra membran steril bir spatula ile silinir ve besiyeri mikroaerofilik ortamda 37 °C'de inkübasyona kaldırılır. Bu yöntem ile hem *Campylobacter spp.*'nin fekal içerikten izolasyonu sağlanmış olur hem de hassas *Campylobacter spp.*'nin seçici besiyerindeki inhibisyon riski ortadan kaldırılmış olur. Filtrasyon yöntemi ile seçici olmayan besiyerlerinde (basit kanlı besiyeri gibi) termofilik *Campylobacter* olan *C. jejuni* ile *C. coli* üretimi seçici besiyerlerine oranla daha az duyarlı bulunmuştur. Bu nedenle *Campylobacter* üretiminde tek başına filtrasyon yöntemi önerilmemektedir.

Campylobacter'lere bağlı oluşan diyarede, dışkıdan hazırlanan preparatların Gram boyamasında, Gram negatif boyanmış, eğri martı kanadı şeklinde ya da spiral görünümde bakteriler görülebilir. *Campylobacter* enfeksiyonundan şüphelenilen tüm diyareli dışkılar gerek direkt bakı olarak gerekse de boyanarak polimorfonükleer lökositler ve spiral formdaki bakteriler açısından incelenmelidirler. Bazı laboratuvarlar sadece lökosit içeren dışkı örneklerini *Campylobacter* açısından işlemlemektedirler. Lökosit içermeyen örneklerde *Campylobacter* üretilebilme şansının düşük olmasından ve *Campylobacter*'lere bağlı diyarede dışkıda genellikle lökosit bulunmasından dolayı lökosit içeren dışkı örneklerinin

işlemlenmesinin hem zaman kaybını hem de özel besiyerlerinin kullanımına bağlı ekonomik kaybı engellediği düşünülmektedir.

İnfeksiyonların başlangıç döneminde fekal örneklerden *Campylobacter* izolasyonu daha kolay olmaktadır. Zenginleştirici besiyerleri genellikle az miktarda bakteri içeren örneklerde, aile teması sözkonusu ise, asemptomatik taşıyıcı veya reaktif artrit veya GBS gibi hastalık sonrası sekel gelişmiş hastalarda etkeni saptamak amacıyla kullanılabilirler. Bu amaçla kullanılan birkaç zenginleştirici besiyeri mevcuttur. Bunlar arasında: Preston zenginleştirici sıvı besiyeri, Campy-thio, *Campylobacter* zenginleştirici besiyeri ve Bolton zenginleştirici besiyeri sayılabilir.

Campylobacter spp. mikroaerofilik bakteriler oldukları için en iyi % 5 O₂ ve % 10 CO₂ varlığında üreyebilirler. Bazı özel türler dışında genellikle buldukları atmosfer ortamında hidrojen gereksinimi duymazlar. Gereksindikleri hidrojen konsantrasyonu da bilinmemektedir. Hidrojen gereksinen *Campylobacter spp.* (*C. concisus*, *C. rectus*, *C. sputorum* gibi) için ideal atmosfer ortamını % 6 O₂, % 6 CO₂, % 3 H₂ ve % 85 N₂ olarak belirtilmektedir. Ancak, bu ortam en sık karşılaşılan türler olan *C. jejuni* ile *C. coli* için uygun üreme ortamı değildir (45,46).

Campylobacter spp.'nin en iyi üreme ısıları farklılık göstermektedir. Termofilik *Campylobacter spp.* olan *C. jejuni* ile *C. coli* en iyi 42°C'de ürerler. Seçilen besiyerine göre inkübasyon ısısı da değişebilmektedir. Örneğin mCCDA besiyerinde *C. jejuni* ile *C. coli* izolasyonunun 37°C'de 42°C'deki izolasyonundan daha başarılı olduğu bildirilmiştir (47).

Campylobacter diyarelerinden % 85- 95 civarında *C. jejuni*, % 5- 15 civarında *C. coli* sorumludur (48).

C. jejuni'nin üretimi için membran filtrasyon tekniği kullanılarak normal kanlı besiyerine ekim ile seçici besiyerine ekim sonrası üremeler arasında belirgin fark görülememiştir.

İnfeksiyon durumunda dışkı ile atılan bakteri yükü yüksek olup, infektif doz da 500- 800 bakteri arasındadır.

2.1.4.2 Kültür dışı tanımlama yöntemleri

Campylobacter spp.'nin tanımlanmasında klasik fenotipik özellikler olan koloni morfolojisi, hareket, katalaz, oksidaz, hipurat hidrolizi, indoksil asetat hidrolizi, H₂S üretimi ve sefalotin ile nalidiksik asit için duyarlılığın araştırılmasıdır. Bu klasik fenotipik görünüm türler arasında bir veya iki farklı karaktere dayanarak bir ayırma gidilmesinde kullanılır. Örneğin hipurikaz aktivitesi *C. jejuni*'yi diğer *Campylobacter* türlerinden ayırmaya yarar. Ancak yaklaşık % 5-8 oranında hipurikaz aktivitesi göstermeyen *C. jejuni* suşu söz konusu olup bunlar yanlış negatifliklere neden olabilmektedir. Atipik *C. jejuni* ve *C. jejuni* dışındaki *Campylobacter*'lerin tanımlanmasında ek biyokimyasal testler ve ve/veya moleküler yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

“Penner serotiplendirmesinde” *C. jejuni* ve *C. coli* kapsüller ısıya dayanıklı antijenlerine göre pasif hemaglutinasyon yöntemi ile serogruplara (49,50), “Lior serotiplendirmesinde” ise *C. jejuni* ısıya duyarlı flajellar antijenlerine göre serogruplara ayrılmıştır (51).

Klinik örneklerin akut fazdaki değerlendirimi için kullanılan direkt değerlendirme, geleneksel mikroskopik yöntemler olan Gram boyama ve mikroskopta bakteri hareketinin görülmesi % 66- 94 arasında duyarlılık oranları ile yüksek özgüllüğe sahiptirler.

Yakın zamanda, dışkıda *C. jejuni* ve *C. coli* antijenlerini tarayabilen ELISA testi olan “*Campylobacter* Microplate Assay” hızlı tanı testleri arasında yer almıştır. Bu test kültür ile kıyaslandığında duyarlılığı % 96, özgüllüğü % 99 bulunmuştur (52).

Campylobacter'lerde hızlı tarama testi olarak ELISA'nın kullanıldığı ve kültür ile kıyaslandığı farklı bir çalışmada duyarlılık % 89, özgüllük ise % 99 bulunmuştur (53).

Birçok araştırmacı direkt dışkı örneklerinden *Campylobacter spp.* tanımlamaya yönelik moleküler (PZR) bazlı yöntemler geliştirmiştir. PZR testleri dışkıdan direkt olarak *C. jejuni* ve *C. coli* taramasında kültür ile kıyaslandığında, daha düşük duyarlılığa sahiptir (54).

PZR, PZR-ELISA ve kültürün karşılaştırıldığı farklı çalışmalarda birbirine yakın sonuçlar alınmıştır (55-57).

Kültür ile ELISA yönteminin karşılaştırıldığı ve 1104 dışkı örneğini kapsayan çalışmada, ELISA yönteminin duyarlılığını % 89.1, özgülüğünü % 97.7, pozitif prediktif değeri %78.3 ve negatif prediktif değeri de % 99.0 bulmuşlardır. ELISA yöntemi yaklaşık iki saat gibi kısa bir sürede *C. jejuni* ve *C. coli* saptanmasına olanak vermektedir. Bu nedenle bu testin, yüksek ateşi, kanlı ishali olan, yedi günden fazla diyaresi devam eden, hamile ya da bağışıklık problemi olan hastalar gibi hemen antibiyotik tedavisinin başlanması gerektiği durumlarda kullanımı önerilmektedir (58).

Campylobacter türlerini tanımlamaya yönelik ticari sistemler mevcuttur. Bu yöntemlerin geleneksel yöntemlere belirgin üstünlükleri yoktur. Örneğin *Campylobacter* 'lerin ticari tanımlama kiti olan API Campy *C. concisus*, *C. mucosalis*, *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryoerophilus* veya *Helicobacter cinaedi*'yi yanlış tanımlayabildiği gibi *C. coli* ve *C. lari* suşlarının tanımlamasında da hatalar bildirilmiştir. Geleneksel yöntemler ile API Campy sisteminin karşılaştırıldığı çalışmada *C. jejuni* tanımlamasında % 100 uyum bulunurken, *C. coli*'de % 74, *C. lari*'de % 66 oranında uyum bulunmuştur (59).

Diğer ticari yöntemler arasında serolojik testler de sayılabilir. Lateks partikül kaplamanın kullanıldığı ELISA yöntemi ile *Campylobacter* türlerine karşı oluşmuş immünoglobülinler tespit edilebilmektedir. Ancak bu testin enfeksiyonun başlangıç döneminde kullanımı önerilmektedir.

Kültürden izole edilen *Campylobacter spp.*'yi de tanımlamaya yönelik kullanılan lateks aglütinasyon temeline dayanan ticari testler de mevcuttur (60).

Campylobacter enteritinde serolojik tanının değeri sınırlı olup serolojik testler GBS gibi *Campylobacter* enfeksiyonu sonrası komplikasyon gelişen durumlarda daha değerli bir araçtır. GBS hastaların dışkılarından *Campylobacter* izolasyonu zordur. Çünkü, infekte hastaların dışkıları ile bakteriyi atma süreleri çoğunlukla kısadır. GBS gelişen hastalarda diyareli dönemden 1-3 hafta sonra dışkıda *Campylobacter* üretimi oldukça güçleşir. Bundan sonra standart olmamak üzere serolojik testlerle *Campylobacter*'lere karşı gelişen serum antikorları ölçülebilir. Serum antikorlarının ölçümü, *C. jejuni*'ye bağlı önceden geçirilmiş enfeksiyon göstergesi olup *Campylobacter* ve GBS arasındaki ilişkiyi tanımlamak için yeterli bir kanıt olmayabilir. Önceki *Campylobacter* enfeksiyonundan kaynaklandığından şüphelenilen GBS vakalarının tespitinde klinik anamneze yardımcı yöntemler kullanılabilir. Dışkı örneklerinin önce zenginleştirici besiyerine alınması ve daha sonra ekimi izolasyonu kolaylaştırıcaktır. DNA bazlı tanımlama yöntemleri ile serolojik testler kombine uygulanabilecek yöntemlerdir.

Yakın zamana kadar DNA prob veya DNA bazlı tanımlama çalışmaları dahil çok sayıda moleküler yöntem araştırılmış ve yayınlanmıştır. Bu çalışmalarda, GTPaz- bazlı PZR reverse hibridizasyon çalışması, *ceuE* geni, 16S rRNA geni, 23S rRNA geni, *glyA* geni, *flagellin* geni, *lipidA* geni, *IpxA* geni, randomize veya multiplex PZR ile 16S rRNA aranması, hipurikaz ve aspartokinaz genleri gibi çok sayıda gen araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda, her testin duyarlılık ve özgüllüğü, testte kullanılan suşa bağlı olarak değişiklik göstermiştir (61).

Campylobacter spp.'nin 16S rRNA sekansına dayalı türe spesifik tanımlanması *C. jejuni* ve *C. coli* gibi iki baskın *Campylobacter* türünün ayırımında yeterli bulunamamıştır (62). Benzer şekilde, *ceuE* geninin sekansına dayalı olarak genetik varyasyonlarından dolayı *C. jejuni* türlerinin farklılık gösterebildiği bildirilmiştir (63).

PZR-RFLP ile kısmi groEL gen sekansı ile bildirilen sonuçlar 16S rRNA'dakinden daha iyi bulunmuştur (64).

AFLP gibi yüksek tanımlayıcı moleküler tiplendirme yöntemlerinin *Campylobacter spp.*'yi tür düzeyinde tanımlamada yararı saptanmıştır (65).

Tek bir test kullanıldığı zaman yakın ilişkili *Campylobacter*'lerin doğru olarak ayırımı ve sınıflandırılmasında başarısızlık söz konusu olabilir. Bu nedenle *Campylobacter spp.*'nin tanımlanması için hem fenotipik hem de genotipik yöntemlerin bir arada olduğu çok yönlü stratejiler önerilmektedir (61,66).

2.1.4.3 *Campylobacter spp.* nin tiplendirilmesi

Campylobacter spp.'nin tiplendirilmesinde fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılmaktadır.

Kullanılan fenotipik yöntemler arasında:

Biyotiplendirme:

- Antibiyogram tiplendirme
- Serotiplendirme
- Fagotiplendirme
- “Multilocus Enzyme Electrophoresis” (MLEE)
- “Whole cell protein profiling” (SDS-PAGE) sayılabilir.

Kullanılan genotipik yöntemler arasında ise:

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)-based methods:

- “Restriction Endonuclease Analysis” (REA)
- “Pulsed Field Gel Electrophoresis” (PFGE)
- “Ribotyping” ve “Riboprinting”i de içine alan Ribotiplendirme

PZR amplifikasyon temelli yöntemler:

- 23S rDNA bölgesinin PZR ile amplifikasyonu
- “Random Amplified Polymorphic DNA” (RAPD) analizi
- “Denaturing Gradient Gel Electrophoresis” (DGGE)

Kombine RFLP ve PCR yöntemleri:

- “Restriction digests of PCR products” (PCR-RFLP)
- “Amplified Fragment Length Polymorphisms” (AFLP)

Sekans bazlı yöntemler:

- “Multilocus Sequence Typing” (MLST)

Genomotiplendirme:

- “Whole-genome DNA microarrays” sayılabilir.

2.1.5 *Campylobacter* türleri ve antibiyotik duyarlılıkları

Campylobacter enteritleri genellikle kendi kendini sınırlayan tarzda enfeksiyonlar olduğu için ilk etapta antibiyotik tedavisi önerilmemektedir. Ancak hastalığın ciddi seyrettiği bebek veya yaşlı gruptaki hastalar ile bağışıklık problemi olan hastalarda antibiyotik tedavisi verilebilir. Antibiyotik tedavisi gerektiğinde, ilk seçenek eritromisindir ancak florokinolonlar (örneğin siprofloksasin) da tüm enterik patojenleri kapsayan etkinlikleri nedeniyle, yaygın olarak kullanılmaktadır. Alternatif tedavi seçenekleri arasında, özellikle sistemik enfeksiyonlarda kullanılan tetrasiklinler ve gentamisin sayılabilir. Ancak son yıllarda, *Campylobacter* türlerinde bu ilaçlara karşı giderek artan düzeylerde direnç görülmektedir. Bu duruma etkili faktörler arasında besi hayvancılığında özellikle tavuk çiftliklerinde antibiyotik kullanımı sayılabilir. Direnç oranlarının artması ve diğer gastroenteritlerden klinik olarak ayırt edilemeyen enfeksiyonlara neden olmasından dolayı, uygun tedavi ve kontrol önlemlerinin alınabilmesi ve antimikrobiyal duyarlılık paterninde meydana gelen değişikliklerin saptanabilmesi açısından *Campylobacter*'lerin laboratuvar tanısı büyük önem taşımaktadır (67).

C. jejuni ve *C. coli*, sefalotin, trimetoprim, basitrasin, novobiyosin,, rifampin gibi birçok antibiyotiğe doğal olarak dirençlidir. Bu nedenle bu antibiyotikler sıklıkla bu bakteriler için geliştirilmiş seçici besiyerlerine eklenmektedir (68).

Campylobacter spp. için duyarlılık testleri henüz tam standardize edilmemiş ve sonuçların yorumlanması için kesin kriterler belirlenmemiştir. “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) tarafından bazı antibiyotikler için standardize edilip önerilen yöntemler agar dilüsyon ile Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerinin bakılmasıdır. Agar dilüsyon yöntemi özel ekipman ve emek isteyen bir yöntem olmasının yanı sıra az sayıda örnekte duyarlılık bakmak için masraflıdır. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile de MİK bakılmakta ancak bu yöntem henüz tam standardize olmayıp yapımı zahmetlidir.

Yine MİK bakılabilen ticari bir difüzyon yöntemi olan E-Test (AB Biodisk Solna), agar dilusyona yakın sonuçlar verdiği için rutinde kullanıma aday bir yöntemdir. Bu testin avantajı, uygulanım kolaylığı, dezavantajı ise pahalı oluşudur.

Disk difüzyon testi güvenilir ve ucuz bir duyarlılık testidir. CLSI eritromisin, siprofloksasin ve nalidiksik asit için direnç taraması amacıyla bu yöntemi önermektedir.

Disk difüzyon ve E-Test yöntemlerinin, *Campylobacter*'ler için hala standart hale getirilemediği belirtilse de (69,70), her ikisinin de duyarlılık durumunu saptamada kullanabileceğini belirten çalışmalar da bulunmaktadır (71-73). Bu çalışmalarda özellikle florokinolonlar için standart dilüsyon yöntemleri ile uyumlu sonuçlar elde edilmektedir (72,73).

Meropenem, eritromisin, siprofloksasin, gentamisin ve doksisisiklin antibiyotikleri için, yine CLSI tarafından bir agar dilüsyon yöntemi önerilmektedir.

Bunun yanı sıra her iki türde de rutin tedavide sıklıkla kullanılan antibiyotiklere karşı gittikçe artan oranlarda direnç bildirilmeye başlanmıştır. Direnç bildirilen antibiyotikler arasında kinolonlar, tetrasiklinler ve eritromisin gibi sık kullanılan antibiyotikler yer almaktadır. Kinolon direnci gerek insan gerekse de hayvan kökenli izolatlarda gittikçe artan sayılarda bildirilmektedir (74-78).

C. jejuni suşlarında temel eritromisin direnç mekanizması, 23S rRNA ve ribozomal proteinlerdeki mutasyonlardır. Bu durum, MİK değerinin 128 µg/ml olduğu yüksek düzey dirence neden olmaktadır (79,80).

Campylobacter'lerde kinolon direnç mekanizması, DNA giraz A (*gyrA*) mutasyonlarına bağlı düşük düzey, orta düzey veya yüksek düzey siprofloksasin direnci ile yüksek düzey nalidiksik asit direnci ile ilişkili olabilir. Yine topoizomeraz mutasyonları da (*parC*) kinolon direncinin diğer bir sebebidir (81,82).

CmeABC aktif pompa sistemi, florokinolonları da içeren geniş spektrumlu antibiyotiklere karşı yapısal veya kazanılmış dirençte en iyi karakterize edilmiş aktif pompa

sistemidir. Florokinolon dirençli suşlarda özellikle yüksek düzey direnç varlığında, *gyrA* mutasyonları ile CmeABC'nin fazla salınımının birlikte saptandığı çalışmalar mevcuttur. CmeABC'nin fazla salınımı bakteri hücresinde siprofloksasin birikimini önemli ölçüde azaltmaktadır (83,84).

C. jejuni ve *C. coli*'de yüksek düzey tetrasiklin direnci genellikle plazmidler aracılığı ile taşınan *tet(O)* geni ile ilişkilidir. *tet(O)* geni kromozomal olarak da bulunabilir. Bu genin kodladığı ve ribozomda üretilen Tet(O) proteini tetrasiklin üzerinde inhibitör etki yaratmaktadır (85-88).

Gıda kaynaklı bulaştan dolayı veterinerlik ve gıda sanayinin de *Campylobacter*'lerin antibiyotik duyarlılığı ve direnci üzerinde çok sayıda çalışmaları olmaktadır. Bu çalışmalar hayvan veya gıda izolatları ile ilgili bölgedeki insan izolatlarının karşılaştırması ve etkenin yayılım yolu ile ilgili bilgi sahibi olunmasında faydalıdır.

Campylobacter spp, duyarlılık oranları coğrafi bölgeye göre değişmektedir. Genel olarak, hayvan kökenli *C.coli*'deki direnç oranları insan kökenli olanlar ve *C.jejuni*'ye göre yüksektir. Örneğin, Arap yarımadasında 2004 yılında Ocak-Aralık ayları arasında izole edilen insan ve tavuk *C.jejuni* suşlarında siprofloksasine % 80 civarında direnç saptanırken, tetrasiklin direnci insan izolatlarında % 30'larda tavuk izolatlarında ise % 70'lerde saptanmış, sadece iki insan izolatında eritromisine karşı yüksek düzeyde direnç tespit edilmiştir (89). Kuzey Amerikada insanlardan izole edilen *Campylobacter* izolatlarının %19-47'sinin siprofloksasine dirençli olduğu belirtilmektedir. Yine Avrupa ülkelerindeki florokinolon direnç oranları da % 17-99 arasında değişmektedir. Asya'da Tayland ve HongKong'da da direnç % 80'lere erişmiştir (67).

Makrolid direnci de insan izolatlarında ve *C.jejuni*'de düşük olmakla birlikte (<% 10), özellikle hayvan kökenli *C.coli*'de % 15-80 arasında bildirilmektedir(67).

İnsanlardan 1998-2001 yılları arasında izole edilen *C. jejuni* subsp. *jejuni*'lerde antibiyotik direncinin araştırıldığı bir çalışmada siprofloksasin direncinin %10'dan %47'ye

yükselerek önemli bir artış gösterdiği ancak diğer antibiyotikler olan eritromisin (%1'den %12'ye) ve tetrasiklin direncinin (%43'ten %68'e) ise daha düşük seviyelerde artış gösterdiğini saptanmıştır (75).

Dünyada gittikçe artan kinolon dirençli *C. jejuni* bildirimleri, bazı ülkeleri önlemler almaya sevk etmiştir (90). Örneğin, Avustralya'da hayvan yemlerinde kinolon kullanımının kısıtlanmasına yönelik politikalar başarı ile uygulandığı için kinolon direnci % 2 gibi oldukça düşük seviyelerde bildirilmektedir (91).

Ülkemizde yapılmış çalışmalarda, *Campylobacter*'lerin antibiyotik duyarlılıkları gerek işlemlenen örnek sayısı gerekse de izole edilen bakteri sayısı bakımından farklılık göstermektedir. Bu çalışmalarda, florokinolon direnci % 7.8- 59 arasında bildirilmiştir (92,93).

2.1.6 *Campylobacter* enfeksiyonlarını önlemek için öneriler

- Yeterince hijyenik içme suyu tüketiminin sağlanması
- Kedi ve köpekler ile temas olduğunda iyi bir temizlik yapılması
- Etlerin hazırlandığı ve ellendiği mutfak tezgah vb'nin iyi temizlenmesi
- Kontamine gıda ürünlerinin getirilmesinin engellenmesi
- Kümes hayvanlarının *Campylobacter* kolonizasyon oranlarının düşürülmesi
- Yurt dışı gezilerinde enfeksiyondan nasıl korunulacağına dair tüketicilerin eğitilmesi
- Özellikle et reyonlarının etkili temizliğinin sağlanması
- Gıda ile uğraşan kişilerin el temizliğine yeterli özeni göstermesi

2.2. Enterohemorajik *Escherichia coli*

E. coli genellikle insan ve sıcakkanlı hayvanların gastrointestinal sistemlerinde bulunan bir bakteridir. *E.coli* türlerinin çoğu zararsızdır. Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) gibi bazı türleri ciddi gıda kaynaklı enfeksiyonlara sebep olabilirler. İnsanlara bulaşı başlıca az pişmiş et ile et ürünleri ve çiğ süt gibi kontamine gıdaların tüketimi ile gerçekleşir.

1982'ye kadar EHEC'in toplum sağlığı açısından önemi bilinmemekteydi. Bu durum, ABD'de gıda kaynaklı bir salgında etken olarak tanımlanmasına ve önceleri etiyolojileri bilinmeyen hemorajik kolit ve Hemolitik remik Sendrom (HÜS)'un bu bakteri ile ilişkisi anlaşılıncaya kadar devam etmiştir. EHEC, verotoksin veya *S. dysenteriae* tarafından üretilen shiga toksine benzerliğinden dolayı "shiga-like toxin" olarak bilinen bir toksin üretir. EHEC'ler 7°C ile 50°C gibi geniş bir ısı aralığında reyebilmekle birlikte en iyi 37°C'de ürerler. Bazı EHEC'ler pH'sı 4.4'n altında olan asidik gıdalarda da yaşamlarını devam ettirebilirler. 70°C ve üzeri ısılarda ısıtılan gıdalarda parçalanırlar. *E.coli* O157:H7 suşu toplum sağlığı ile ilgili en önemli EHEC serotipi olup diğer serotipler sporadik vakalar ve daha nadiren salgınlar şeklinde karşımıza çıkabilirler (94).

E. coli O157:H7 serotipinin adı 157. O somatik antijeni ve 7. H flajellar antijenini bulundurmasından kaynaklanmaktadır. *E. coli* O157:H7'nin önemli virulans faktörlerinden olan shiga-like toksinleri (Stx) Stx-1 ve Stx-2 olarak iki ana gruba ayrılabilirler. Stx-1 *S. dysenteriae*'nin ürettiği shiga toxin'den ayırt edilemez. Stx2 ise Stx-2, Stx-2c, Stx-2d, Stx-2e, Stx-2f gibi çoklu varyantlara sahiptir. Bunlar kendi aralarında birbirlerine benzeyip Stx-1'e ise fazla benzemezler. Bazı *E. coli* O157:H7 suşları sadece Stx-1 üretirken bazıları sadece Stx-2 veya hem Stx-1 hem de Stx-2 retirler. Toksinler HS gelişiminde tek başlarına risk oluşturmazlar. Örneğin sadece Stx-2 üreten suşlar yüksek riske sahip olup sadece Stx-1 üreten suşlar çok az risk taşırlar. Hem Stx-1 hem de Stx-2 taşıyan suşlar ise orta derecede risk taşırlar.

Her iki toksin yapılarında bir adet A parçası ile 5 adet B parçası bulundurur. B parçası, ökaryotik hücre membranında değişik miktarlarda bulunan bir glikolipid olan globotroazilseramid (Gb₃)'e bağlanır. A parçası ise hücre hasarına sebep olan bir sitotoksin niteliğindedir.

Shiga toxin üretimi hastalık oluşturmak için tek başına yeterli değildir. *E.coli* O157:H7 tespitinde diğer virulans faktörleri olan 60-mDa'luk virulans plazmidi (pO157) ve LEE ("Locus of Enterocyte Effacement") nemlidir. 60-mDa'luk plazmidi enterohemolizin (EHEC-Hly)'i kodlar. EHEC-Hly eritrositleri hemolize uğratarak hemoglobinin açığa çıkmasını ve dolayısı ile *E.coli* O157:H7 çoğalmasını uyaran demir kaynağını sağlar. LEE ise

enterosit kaybına neden olan lezyonların yapışma/silinmesi için önemli faktörlerin ve adezyon molekülünün üretimi için gerekli genleri içerir.

2.2.1. Enterohemorajik *Escherichia coli* enteritinin kliniği

E. coli O157:H7'ye bağlı oluşan hastalık kliniği farklılıklar gösterebilmektedir. Kansız diyaresi olan asemptomatik kişiler olabileceği gibi, hemorajik kolit, HÜS ve ölüm gelişen vakalar da olabilir. Bakteri ile karşılaşmadan sonraki 1-8 günlük inkübasyon döneminin ardından hastalık gelişir. Hemorajik kolit gelişen hastaların çoğu yedi gün içinde iyileşir. Hastalık tipik olarak abdominal kramplar ve kansız diyare şeklinde başlar. İlk günlerden sonra dışkıda kan görülmeye başlar. Hastalık ilerledikçe dışkıdaki kan miktarı artar ve hatta neredeyse dışkının tamamı kandan oluşur. Hastaların %30-60'ında kusma da görülür. Ateş ya yoktur ya da düşük seviyelerde seyredir. HÜS gelişen EHEC kaynaklı idrar yolu enfeksiyonları bildirilmiştir (95,96).

HÜS böbrek damarlarındaki endotelial hücrelerin hasarı ile seyreden trombotik bir hastalıktır. HÜS tanımlamasında kullanılan triadı şu şekilde belirtebiliriz:

1. Kırmızı kürelerin parçalanması ile oluşan mikroanjiopatik hemolitik anemi
2. Trombositopeni
3. Akut böbrek yetmezliği

HÜS çocuklarda, azalmış glomerüler filtrasyon oranı ve ürenin atılımındaki azalmadan kaynaklanan akut böbrek yetmezliğine neden olur. Sendrom en sık ciddi karın ağrısı, kusma ve sulu diyarenin geliştiği hastalık formunda meydana gelir.

Hemorajik Kolit geliştiğinde diyare genellikle kanlı olup bazen sadece kandan oluşur. Çocukların ateşinin olmaması veya az olması tipiktir. Ciddi vakaların çoğunda iskemik kolit ve perforasyon görülebilir. Bazı hastalarda iskemik koliti takiben kolonda daralma gelişebilir.

EHEC bakterileri kalın barsağa kolonize olur. Bunu da intestinal epitelyal hücrelerin yüzeyine sıkı bir şekilde yapışık lezyonlar aracılığı ile yaparlar. Bakterinin kolonizasyonu için LEE ("Locus on Enterocyte Effacement") olarak adlandırılan patojenite adasında yer alan

genlere ihtiyacı vardır. EHEC kolonize olduktan sonra shiga toksin (stx) üretir ve dolaşıma salar. Shiga toksinin dolaşıma girmesinde nötrofil migrasyonunun da kolaylaştırıcı etkisi vardır. Dolaşıma girdikten sonra shiga toksin ilk olarak böbreklere gider. Toksin B parçası ile hedef hücreler olan glomerüler endotel ve tubuler epitelyal hücre yüzeyindeki reseptörler olan nötral glikolipid globotrazosilseramid'lere (Gb₃) bağlanır. Daha sonra hücre içine girer ve endoplazmik retikuluma gider. Tek olan A parçası ile enzimatik olarak ribozomları inaktive ederek protein sentezinin inhibisyonuna ve hücre hasarına neden olur. Bu hasar, glomerüler endotelial hücrelerin kabarıp alttaki bazal membrandan ayrılması, trombosit ve koagülasyon kaskadının sekonder olarak aktive olması ile oluşur. Bu olaylar zinciri shiga toksine bağlı HÜS'un klasik belirtileriyle sonuçlanır.

Fibrin birikimi ile sonuçlanan koagülasyon kaskadı, kapillerlerde daralamaya ve eritrositlerde parçalanmaya neden olarak zarar gören damarlara doğru gitmelerini sağlar. Bu eritrosit parçalanması mikroanjiopatik hemolitik anemiye sebep olur. Trombositlerin tükenmesinin neden olduğu trombositopeni ve anemi böbreklere kan akımını azaltarak böbrek yetmezliğine neden olur.

HÜS'un destekleyici bakımlar dışında ispatlanmış bir tedavisi yoktur. *E. coli* O157:H7 enfeksiyonlarının antibiyotiklerle tedavisi HÜS gelişme riskini arttırdığından dolayı, çocuklarda antibiyotik tedavisinden kaçınılmalıdır (97).

Sitotoksinlerin endotele bağlanmalarını engelleyici spesifik antikorların geliştirilmesine ek olarak oral yoldan verilebilecek, sitotoksinleri gastrointestinal sistemde yakalayan ve dolaşıma girmelerine engel olacak sentetik Gb₃ analogları için çalışmalar devam etmektedir (98).

Düşük prevalansından dolayı, rutin taramalarda Sorbitol kullanmayan *E. coli* izolatları shiga toksin açısından değerlendirilir. *E. coli* O157:H7 suşlarına bağlı enfeksiyonlarda antibiyotiklerin bakterinin shiga toksin üretimini arttırabilmelerinden dolayı antibiyotik kullanımı önerilmemektedir. Shiga toksin genleri bakteriyofajlar tarafından kodlanan genler olup florokinolonlar, trimetoprim sulfametoksazol ve furazolidon gibi antibiyotiklerin kullanımı bakteriyofaj uyarımına sebep olabilir. Bu da shiga toksin artışını açıklar niteliktedir. Bütün bu sebeplerden dolayı klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının *E. coli* O157:H7 veya

shiga toksin üreten diğer *E. coli* izolatları için antibiyotik duyarlılık sonuçlarını rutin olarak rapor etmemeleri önerilmektedir.

2.2.2 Enterohemorajik *Escherichia coli* epidemiyolojisi

1993 yılının başlarında ABD’de Washington, Idaho, California ve Nevada’da meydana gelen *E. coli* O157:H7’nin neden olduğu gıda kaynaklı salgın, *E. coli*’nin yaptığı en geniş çaplı salgındır. Kültür ile doğrulanmış 587 vaka bildirilmiştir. Bunların 171’i hastaneye yatırılmış, 41’inde HÜS ve dört vakada ölüm gelişmiştir. Salgına bir hazır gıda restoran zincirinden dağıtılan hamburgerler neden olmuştur (99).

E.coli O157:H7 genellikle az pişmiş biftek, hamburger köftesi gibi kırmızı et veya kümes hayvanları ile bulaşır. Etler için başlıca kontaminasyon şekli üretim çiftliklerinde kesim sırasında infekte sığırların etleri ile olurken ikinci sıklıkta bulaş market vb. satış yerlerindeki et reyonlarından olmaktadır. İnfeksiyon rezervuar hayvanlarda devamlı bir şekilde seyredebilir. Çünkü bakterinin toprakta uzun süre canlılığını koruyabilmesi nedeni ile hayvanların bakteri ile tekrar tekrar karşılaşması söz konusudur.

Güvercin, koyun, geyik ve tavşanların da aralarında bulunduğu çok sayıda hayvan EHEC taşıyabilir. Eğer bu hayvanlar EHEC ile infekte olmuşsa dışkıları ile su ve gıdaları kontamine edebilirler. İçme suları, yabani geyik etleri, pişirilmemiş sebzeler, lor peyniri, elma şarabı ve yonca filizlerinin kaynak olduğu salgınlar bildirilmiştir. Az sayıda bakteri ile hastalık gelişebildiği için aile içinde, bakım merkezlerinde, süt çiftlikleri veya hayvanat bahçelerini ziyaret eden çocuklar arasında kişiden kişiye bulaş görülebilir. Bu da küçük çaplı salgınlara yol açar.

EHEC enfeksiyonlarına özellikle *E. coli* O157:H7 serotipi başta olmak üzere O26:H11, O48:H21, O103:H2, O111:NM (Non Motil) ve O145:NM serotiplerinin neden olabildikleri gösterilmiştir (100,101,102,103).

E. coli O157:H7’den daha az sıklıkta olsa da EHEC enfeksiyonu yapan diğer serotiplerin neden olduğu, az sayıda olgunun etkilendiği salgınlar da bildirilmiştir. ABD’de non-O157

serotipleri arasında ilk sırada O26, ikinci sıklıkta O111 serotipi bildirilmiştir. Avrupa’da ise O111 serotipi non-O157 serotipleri arasında ilk sırada gelmektedir (104,105).

2.2.3. Enterohemorajik *Escherichia coli* izolasyonu

E. coli O157:H7 izolasyonu, hastalığın akut fazında mümkündür. Hastalığın başlangıcından 5-7 gün sonra tespit edilemeyebilir. EHEC enfeksiyonlarının çoğu *E. coli* O157:H7 serotipinden kaynaklandığı için, mevcut laboratuvarların çoğu taramalarını ya shiga toksin üzerinden ya da *E. coli* O157:H7 serotipi üzerinden yapmaktadırlar. Tarama yöntemi olarak da genellikle:

- Doğrudan dışkıdan *E. coli* O157 serotipi veya shiga toksin aranması,
- Sorbitollü Mac Conkey besiyeri (SMAC), sefiksim-SMAC, tellürit + sefiksim-SMAC, 5-bromo-5-kiono-3-indoksil-β-D-glukuronid veya 4-metilumbeliferil-β-D-glukuronid’ li SMAC’a direkt ekim,
- Bakteriyolojik kültür kullanılarak O157’ye özgü antikor bağlanmış boncuklar kullanılarak yapılan immün manyetik ayırma gibi yöntemler kullanılmaktadır.

Çoğu laboratuvar sadece sorbitol eklenmiş Mac Conkey besiyeri üzerinde sorbitolü kullanmayan *E. coli*’leri şüpheli kabul ederek bu suşları O157:H7’ye spesifik serumlarla muamele ederek O157:H7 EHEC suşlarını tespit etmeye çalışmaktadır. Bu besiyeri doğal olarak sorbitolü kullanan diğer EHEC suşlarını ayırt ettiremez.

Diğer tarama yöntemleri arasında kromojenik besiyeri ve ELISA gibi yöntemlerden bahsedilebilir. Bu yöntemler daha hassas ve daha özgül olup dezavantajları sorbitollü Mac Conkey besiyerine göre daha pahalı olmalarıdır (106,107).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Örnekler

Campylobacter açısından çalışmaya Haziran 2007-Mayıs 2008 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Poliklinik'leri ve Acil Servisi'ne akut ishal yakınması ile başvuran ve akut gastroenterit ön tanısı olarak ayaktan ya da yatarak izlenen ve antibiyotik tedavisi almayan 388 hasta ve Behçet Uz Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Poliklinik'leri ve Acil Servisi'ne akut ishal yakınması ile başvuran ve akut gastroenterit ön tanısı olarak ayaktan ya da yatarak izlenen ve antibiyotik tedavisi almayan 387 hastadan alınan toplam 775 dışkı örneği işleme alındı.

EHEC açısından Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Poliklinik'leri ve Acil Servisi'ne akut ishal yakınması ile başvuran ve akut gastroenterit ön tanısı olarak ayaktan ya da yatarak izlenen ve antibiyotik tedavisi almayan ve yapılan dışkı kültürlerinde herhangi bir patojen bakteri (*Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* vb.) üremediği halde *E. coli* üremesi olan toplam 171 örnek işleme alındı.

3.2. Dışkı örneklerinin incelenmesi

Hastalardan alınan taze dışkı örnekleri Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı tarafından 24 saat boyunca kabul edildi. Bu örnekler pazartesi, çarşamba ve cuma günleri mesai saatlerinde işleme alındı. Bugünler dışında ve gece kabul edilen örnekler Cary-Blair (BBL Transport Medium 211743) taşıma besiyeri içerisinde +4°C'de soğukta zenginleştirmeye bırakılıp takip eden ekim gününde işleme alındı. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden kabul edilen örnekler ise tarafımızdan verilen Cary-Blair taşıma besiyeri içerisinde her hafta Cuma günü uygun transport şartlarında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na nakledildi. Örneklerin teslim alınmasına kadar geçen sürede örnek içeren Cary-Blair taşıma besiyerleri +4°C'de tutuldu. Cuma günleri teslim alınan örnekler uygun şartlarda hemen işleme alındı (58,108-110).

Laboratuvara gelen dışkının önce makroskopik özellikleri (kan, mukus varlığı, sulu veya katı oluşu gibi) belirlendi. Dışkının mikroskopik incelenmesi, küçük bir miktar taze dışkı örneği (1 damla kadar), 1 damla serum fizyolojik ile sulandırılarak yapıldı. Üzerine lamel kapatılıp mikroskopta, 10 x 40'lık büyütmede boyama yapılmadan direkt olarak incelendi. Her sahada görülen lökosit ve eritrosit sayısı kaydedildi

Campylobacter spp. açısından değerlendirilmek üzere eritrosit ve lökosit içeren dışkı örneklerinden ayrıca Gram boyalı preparat hazırlandı ve martı kanadı şeklinde soluk boyanmış Gram negatif çomakçıklar aranmak üzere mikroskopta değerlendirildi.

3.3. *Campylobacter spp.* kültürü

Kültür için Endtz ve arkadaşlarının yöntemi uygulandı (111). Bunun için dışkı örnekleri aşağıdaki yöntem ile Modifiye kömürlü sefoperazon deoksikolat agar (mCCDA) veya “*Campylobacter* Blood-Free Selective Agar Base” (Oxoid CM0739) olarak da bilinen besiyeri'ne kültürü yapıldı. Yaklaşık 0.5 gr (veya 0.5 ml) dışkı 3 ml Beyin Kalp İnfüzyon buyyon (Oxoid CM225) içinde süspanse edildi ve bir Pastör pipeti yardımı ile mCCDA besiyerine 2 damla damlatılıp steril öze yardımı ile besiyeri yüzeyine tek koloni ekimi şeklinde ekildi.

mCCDA besiyerinin bileşimi pepton 20,0 g/L; kazein hidrolizatı 3,0 g/L; aktif kömür 4,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; Sodyum deoksikolat 1,0 g/L; Sodyum piruvat 0,25 g/L; demir sülfat 0,25 g/L; agar 12,0 g/L şeklindedir. Toz besiyeri 22,75 g/litre olacak şekilde distile suda çözülüp, kaynatılarak eritildi ve otoklavda 121 °C 'de 15 dakika sterilize edildi. Otoklavlama sonrası 45–50 °C'ye soğutulup, steril 2 mL distile su ile çözülmüş mCCDA “Selective supplement” (Oxoid SR 0155E) ilave edildi. Besiyeri karıştırılıp 4 cm çaplı küçük petri kutularına dağıtıldı. Hazırlanmış besiyeri siyah renkli olup, 2–8 °C 'da 2 hafta depolanabilmekle birlikte besiyerininin her hafta başında taze dökülmesine dikkat edildi. Örnek sayısının fazla olduğu dönemlerde haftada iki defa taze besiyeri döküldü. Besiyerinin pH 'sı 25 °C 'de 7,4±0,2 olacak şekilde ayarlandı.

3.4. İnkübasyon

Kültür plakları anaerobik kavanozda mikroaerofilik ortam (%5 O₂, %10 CO₂, %85 N₂) oluşturan gaz paketleri kullanılarak (Oxoid CN0035A) ve 37°C'de 72 saat inkübe edildi. Plaklar inkübasyon süresi tamamlanınca üreme açısından değerlendirildi.

3.5. Tanımlama

Üreyen bakterilerin tür tanımı için koloni morfolojisi, Gram boyanma özellikleri, oksidaz, katalaz ve hipurat hidrolizi test sonuçları incelendi. Elde edilen *Campylobacter spp.* kolonileri moleküler yöntem ile tür tanımı yapılmak üzere % 20 gliserol (Appllichem A2926) içeren Triptikaz Soya Buyyonu (LAB M 065052), ve Beyin Kalp İnfüzyon Buyyonu ile yağsız süt tozu (Pınar yağı alınmış süt tozu) ile hazırlanmış stok besiyeri (skim milk) içerisinde -70°C'ye kaldırıldı (112).

3.6. *Campylobacter* izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının incelenmesi

Üretilen koloniler % 5 koyun kanı içeren Mueller-Hinton agar (Oxoid CM337) plaklarına 0.5 McFarland bulanıklığında olacak şekilde ekildi ve izolatların duyarlılıkları, siprofloksasin (AB BIODISK BH 2412), eritromisin (AB BIODISK BH 3045), gentamisin (AB BIODISK BH 2264), meropenem (AB BIODISK BH 2260) ve doksisisiklin (AB BIODISK BH 2260) E test strpleri kullanılarak çalışıldı. Bunun için her plağa en fazla iki strip konuldu ve 37 °C'de 24-48 saat mikroaerofilik ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda CLSI standartları doğrultusunda MİK değerleri kontrol edilerek antibiyotik duyarlılıkları tespit edilip kaydedildi (113-117). Nalidiksik asit (Oxoid CT0031B) ve sefalotin (Oxoid 230725) duyarlılığına ise disk difüzyon yöntemi ile bakıldı.

3.7. EHEC izolasyonu

Eritrosit ve lökosit içeren dışkı örnekleri Sorbitollu MacConkey agar (Oxoid CM0813) ve EMB agara ekildi. Kültür plakları 37°C'de 24-48 saat enkübe edildi ve bu süre sonunda oluşan laktoz pozitif kolonilerden: Üç şekerli demirli besiyeri (TSI), indol, metil kırmızısı, üre

ve sitrat testleri yapıldı. O157:H7 serotipi sorbitolu fermente etmediği için Sorbitollu MacConkey agardaki sorbitol negatif koloniler O157 (Denka Seiken 295798) ve H7 (Denka Seiken 295569) anti serumları kullanılarak lam aglütinasyonu ile incelendi.

Bu yöntemle EHEC olarak tanımlanan suşlar ve bunların yanısıra diğer invazif etkenlerin izole edilmediği hastaların kültürlerinden elde edilen *E.coli* kolonileri (özellikle sorbitol negatif olanlar O157 antiserumu ile aglütinasyon vermese de) moleküler yöntemle toksin geni varlığı araştırılmak üzere % 20 gliserol içeren Beyin Kalp İnfüzyon buyyonu içerisinde -70°C'de dondurularak saklandı (118).

3.8. Moleküler Yöntemler

3.8.1. *Campylobacter* için moleküler yöntem

Campylobacter türlerinin moleküler yöntemlerle tanımlanması için Linton ve arkadaşlarının kullandıkları 16S rRNA ve hipürikaz genlerinin araştırıldığı multipleks PZR yöntemi uygulandı (55,119).

Pozitif kontrol olarak *Campylobacter* 16S rRNA ve hipürikaz geni pozitif olan 710.25255 nolu *C. jejuni* suşu ve negatif kontrol olarak da *E. coli* suşu kullanıldı.

3.8.1.1 DNA ekstraksiyonu

24-48 saatlik koloniler toplandı ve 500 µl distile su içerisinde süspanse edilerek 10 dakika süreyle kaynatıldı. Daha sonra soğutulup 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant kalıp DNA olarak kullanıldı. Hazırlanan hedef DNA hemen kullanılmadığı zaman -70°C'de dondurularak saklandı (64).

3.8.1.2 PZR uygulaması

16S rRNA için forward primer: 5'-AAT CTA ATG GCT TAA CCA TTA-3'

reverse primer: 5'-GTA ACT AGT TTA GTA TTC CGG-3'

Hipürrikaz geni için forward primer: 5'-GAA GAG GGT TTG GGT GGT G-3'

reverse primer: 5'-AGC TAG CTT CGC ATA ATA ACT TG-3'

-Hazırlanan PZR karışımının (master mix) içeriği:

MgCL ₂ (2.5 mM) (Fermentas-R0181)	5 µl
10X Taq tamponu(Fermentas-R0181)	5 µl
dNTP karışımı (her birinden 200 pmol/µl) (Fermentas-R0181)	5 µl
16S rRNA için forward primer (20 pmol/µl).....	0.5 µl
16S rRNA için reverse primer (20 pmol/µl)	0.5 µl
Hipürrikaz geni için forward primer (20 pmol/µl).....	0.5 µl
Hipürrikaz geni için reverse primer (20 pmol/µl).....	0.5 µl
Taq polimeraz (2,5 Ü) (Fermentas EP0402).....	0.5 µl
dH ₂ O.....	29.5 µl
Kalıp DNA.....	3 µl
Son hacim.....	50 µl

Isı döngü programı

Ön denatürasyon: 94°C'de 5 dakika

- Denatürasyon: 94°C'de 1 dakika
 - Birleşme: 58 °C'de 1 dakika
 - Uzama: 72 °C'de 1 dakika
- } 25 döngü

Son uzatma: 72°C'de 5 dakika

Tm 1: 43.6 °C, Tm2: 40.4 °C

Tm 3: 51.5 °C, Tm4: 50.1 °C

-Görüntüleme için 10 µl PZR ürünü etidiyum bromür (Sigma E-1510) içeren %1.5'lük agaroz (Sigma A5093) jel içerisinde boyandıktan ve 120 voltluk akımda (Thermo EC 135-90) 45 dakika yürütüldükten sonra ultraviyole transilluminatörde bant oluşumu değerlendirildi. 16S rRNA için ~850 bp'lik ürün, hipürrikaz geni için ise ~750 bp'lik ürün beklenmekteydi. 16S

rRNA ve hipürrikaz pozitif izolatlar *C.jejuni*; 16S rRNA pozitif ve hipürrikaz negatif izolatlar *Campylobacter spp.* olarak değerlendirildi.

3.8.2 EHEC *stx* genlerinin saptanması

3.8.2.1 EHEC için moleküler yöntem

EHEC izolatlarının moleküler tanısı için Zhao ve arkadaşlarının kullandıkları multipleks PZR yöntemi uygulandı (118). Bu yöntemde EHEC sitotoksinleri olan Shiga toxin-1 (*stx-1*) ve Shiga toxin-2 (*stx-2*) genlerinin varlığına bakılmaktadır.

PZR için pozitif kontrol olarak *stx-1* ve *stx-2* pozitif 87.1215 nolu *E. coli* suşu ve negatif kontrol olarak da *stx-1* ve *stx-2* negatif olan 25922 nolu *E. coli* O6:H1 suşu kullanıldı

3.8.2.2 DNA ekstraksiyonu

24-48 saatlik koloniler toplandı ve 500 µl distile su içerisinde süspanse edilerek ve 10 dakika süreyle kaynatıldı. Daha sonra soğutulup 10.000 rpm'de 5 dakikalık santrifüjden sonra elde edilen süpernatant kalıp DNA olarak kullanıldı. Hazırlanan hedef DNA hemen kullanıldı. Hemen kullanılmayacağı durumda süpernatant ayrılır ayrılmaz -70°C'de dondurularak saklandı.

3.8.2.3 PZR uygulaması

Stx-1 için forward primer: 5' TGT AAC TGG AAA GGT GGA GTA TAC A-3'

reverse primer: 5' GCT ATT CTG AGT CAA CGA AAA ATA AC-3'

Stx-2 için forward primer: 5'GTT TTT CTT CGG TAT CCT ATT CC-3'

reverse primer: 5'GAT GCA TCT CTG GTC ATT GTA TTA C-3'

-Hazırlanan PZR karışımın (master mix) içeriği:

MgCL₂ (1.5 mM) (Fermentas-R0181).....3 µl

10X Taq tamponu(Fermentas-R0181).....3 µl

dNTP karışımı (her birinden 200 pmol/µl) (Fermentas-R0181).....5 µl

Stx-1 geni forward primer (20 pmol/µl).....1 µl

Stx-1 geni reverse primer (20 pmol/μl)	1 μl
Stx-2 geni forward primer (20 pmol/μl)	1 μl
Stx-2 geni reverse primer (20 pmol/μl)	1 μl
Taq polimeraz (2 Ü) (Fermentas EP0402)	0.4 μl
DNA	5 μl
dH ₂ O	29.6 μl
Son hacim	50 μl

Ön denatürasyon: 94°C’de 5 dakika

- Denaturasyon: 94°C’de 1 dakika
 - Birleşme: 60 °C’de 1 dakika
 - Uzama: 72 °C’de 1 dakika
- } 30 döngü

Son uzatma: 72°C’de 5 dakika

Tm 1: 51.8 °C, Tm2: 52.2 °C

Tm 3: 50.2 °C, Tm4: 51.5 °C

-Görüntüleme için 10 μl PZR ürünü etidiyum bromür (Sigma E-1510) içeren %1.5’luk agaroz (Sigma A5093) jel içerisinde boyandıktan ve 120 voltluk akımda (Thermo EC 135-90) 45 dakika yürütüldükten sonra ultraviyole transilluminatörde bant oluşumu değerlendirildi. Yürütme sonunda elde edilen ~210 bp’lik ürün oluşumu stx-1 gen varlığını ve ~484 bp’lik ürün oluşumu da stx-2 gen varlığını göstermektedir.

Tablo 1: Çalışmada PZR analizi için kullanılan öncüller

Öncüller	Ürün büyüklüğü	Kaynaklar
16S rRNA-1- 5’-AAT CTA ATG GCT TAA CCA TTA-3’ 16S rRNA-2- 5’-GTA ACT AGT TTA GTA TTC CGG-3’	850	55
Hip-1- 5’-GAA GAG GGT TTG GGT GGT G-3’ Hip-2- 5’-AGC TAG CTT CGC ATA ATA ACT TG-3’	750	55
Stx-1-1- 5’ TGT AAC TGG AAA GGT GGA GTA TAC A-3’ Stx-1-2- 5’ GCT ATT CTG AGT CAA CGA AAA ATA AC-3’	210	118
Stx-2-1- 5’GTT TTT CTT CGG TAT CCT ATT CC-3’ Stx-2-2- 5’GAT GCA TCT CTG GTC ATT GTA TTA C-3’	484	118

3.9 API Campy (bioMerieux, Fransa) ile *Campylobacter* türlerinin tanımlanması:

Daha önceden izole edilen katalaz ve oksidaz pozitif, spiral şekilli mikroaerofilik bakteriler kanlı agara pasajlandı. Mikroaerofilik şartlarda 37°C’de 24- 48 saat inkübe edilen plaklardaki koloniler toplanarak API NaCl % 0.85 Medium (3ml) içinde McFarland 6 bulanıklığında süspansiyon hazırlandı. Test stribi iki bölümden oluştuğu için her iki stribi de çalışılan suşun numarası ayrı ayrı yazıldı. Zaman kaybetmeden stribin ilk bölümünde ÜRE-PAL testleri ile stribin ikinci bölümünde H₂S testi hava kabarcığı oluşumu önlenerek yaklaşık 80-100 µl her kuyucuğa dağıtıldı. H₂S kuyucuğu ise tamamen dolduruldu. Üre test kuyucuğunun üzeri mineral yağı (BioMerieux 70100) ile bombe oluşturacak şekilde kapatıldı. Stribin ilk bölümünün kapağı kapatılarak 37°C’de aerop ortamda 24 saat inkübasyona kaldırıldı. Stribin ikinci bölümünde GLU-ERO testleri için API AUX Medium ampulüne ilk süspansiyondan yaklaşık 150 µl eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra süspansiyon test kuyucuklarını dolduracak şekilde dağıtıldı ve 37°C’de mikroaerofilik ortamda 24 saat inkübasyona kaldırıldı.

İnkübasyon süresinin bitiminde ilk stribi reaktifler ilave edildi. NIT kuyucuğuna NIT1 ve NIT2 reaktiflerinden (BioMerieux 70442) birer damla, HIP kuyucuğuna NIN reaktifinden (BioMerieux 70491) üç damla, GGT, PyrA, ArgA, AspA ve PAL test kuyucuklarına ise birer damla FB reaktifi (BioMerieux 70562) damlatılarak beş dakika beklendi. Daha sonra apiweb™ tanımlama yazılımı ile reaksiyonlar ve ikinci stripteki üreme durumu girilerek tanımlama işlemi yapıldı.

3.10 İstatistiksel Analizler

İstatistiksel Analiz; Epi info (Versiyon3.4.3 2007) StatCalc programında Yates düzeltilmeli ki-kare ve eğimde ki-kare yöntemi ile araştırıldı.

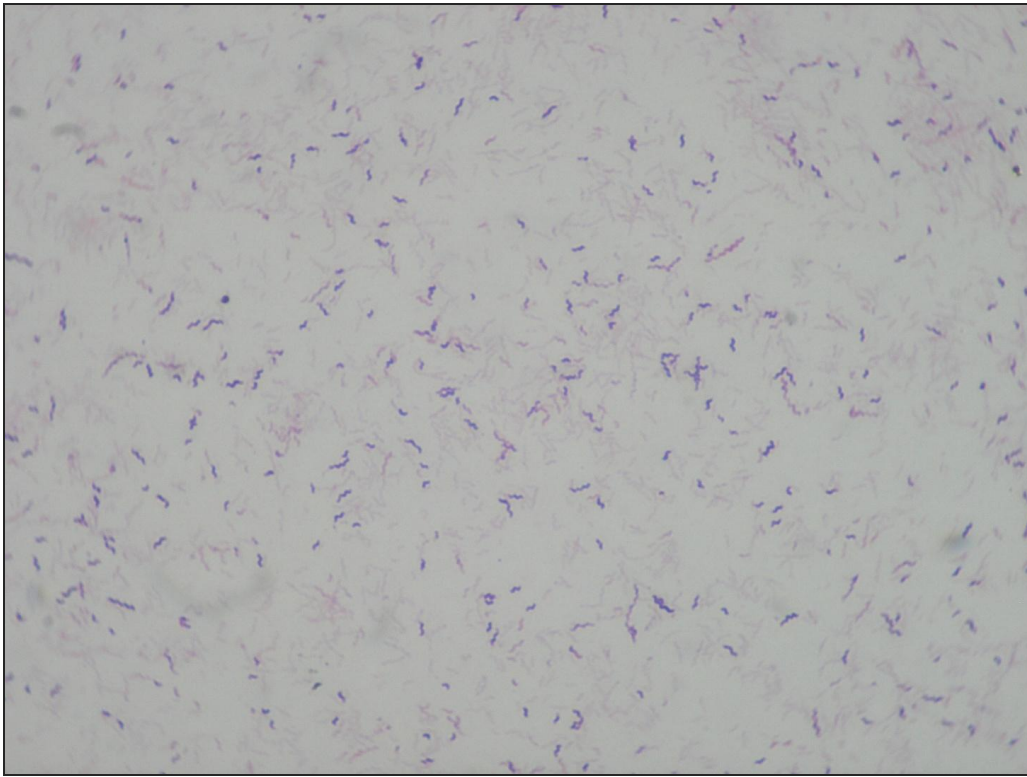
4. BULGULAR

4.1. Gaita Kültürlerinin Sonuçları

01/06/2007-31/05/2008 tarihleri arasında 388’i Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı’na ve 387’si Behçet Uz Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları

Araştırma Hastanesi'ne başvuran diyareik hastalardan olmak üzere toplam 775 gaita örneği işlemlendi. mCCDA agarda üremiş olan gri kolonilerden katalaz ve oksidaz reaksiyonu pozitif olanlar içerisinde Gram boyamasında Gram negatif spiral şeklinde (Bkz. Şekil 1) bakteri görülen 97 örnekte hipurat hidrolizi araştırıldı. Hipurat hidrolizi sonucunda hipurat negatif olarak saptanan 12 izolat *Campylobacter spp.* ve pozitif olarak saptanan 85 izolat ise *C. jejuni* olarak adlandırıldı (Bkz. Tablo 2). *Campylobacter* üreyen örnek sayısında; merkezler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0.05$).

Şekil 1: mCCDA besiyerinde üreyen *Campylobacter* kolonilerinden hazırlanan Gram boyalı preparatın X100 büyütmedeki mikroskopik görüntüsü



Tablo 2: İşlemlenen ve *Campylobacter* üreyen örnek sayısı

	İşlemlenen örnek sayısı	Üreyen* Örnek sayısı (%)	Hipurat pozitif (<i>C.jejuni</i>) örnek sayısı (%)	Hipurat negatif (<i>Campylobacter spp.</i>) örnek sayısı
DEÜ örnekleri	388	45 (11.6)	36 (9.3)	9 (2.3)
Behçet Uz örnekleri	387	52 (13.4)	49 (12.7)	3 (0.8)
Toplam	775	97 (12.5)	85 (11)	12 (1.6)

*: *Campylobacter* üreyen örnek sayısı

$p>0.05$

01/06/2007–31/05/2008 tarihleri arasında DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda toplam kültüre alınan dışkı sayısı 2129 olup bunlardan direkt mikroskopik bakısında lökosit, eritrosit veya her ikisi bir arada olanların sayısı 529 idi. Bu dışkılarda mikroskopik bakısı anlamlı olup herhangi bir patojen bakteri üremesi saptanan örnek sayısı 102 iken (% 19.3), mikroskopik bakısı anlamsız olup patojen bakteri üremesi saptanan örnek sayısı ise 10 (% 0.6) idi. Mikroskopik bakısı anlamlı olan dışkı örneklerinde patojen bakteri üremesi mikroskopik bakısı anlamsız örneklere göre istatistiksel olarak daha fazladır (p:0.000). Tablo 3'de araştırma süresince labovatuvarımızda dışkı örneklerinden üretilen patojen bakterilerin dağılımı görülmektedir.

Tablo 3: 01/06/2007-31/05/2008 tarihleri arasında DEÜ Merkez Laboratuvarı'na gelen dışkı örneklerinde üreyen patojen bakteriler ve sayıları

Üreyen Patojenler	Sayı
<i>Campylobacter spp.</i>	45
<i>Salmonella spp.</i>	40
<i>Shigella spp.</i>	22
EHEC	5
Toplam	112

EHEC açısından Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Poliklinik'leri ve Acil Servisi'ne akut ishal yakınması ile başvuran ve akut gastroenterit ön tanısı alarak ayaktan ya da yatarak izlenen ve antibiyotik tedavisi almayan ve yapılan dışkı kültürlerinde herhangi bir patojen bakteri (*Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* vb.) üremediği halde *E. coli* üremesi olan toplam 171 örnek işleme alındı. Bunlardan beş tanesi O:157:H7 antiserumu ile reaksiyon verdi ve EHEC olarak adlandırıldı.

Campylobacter açısından 0-1 yaş grubunda işlemlenen 139 örnekten 25'inde (%18), 2-5 yaş grubunda işlemlenen 213 örnekten 41'inde (%19), 6-10 yaş grubunda işlemlenen 118 örnekten 13'ünde (%11), 11-15 yaş grubunda işlemlenen 42 örnekten dördünde (%10), 16-40 yaş grubunda işlemlenen 122 örnekten sekizinde (%7) ve 41 yaş ve üzeri yaş grubunda işlemlenen 141 örnekten altısında (%4) pozitif üreme saptandı (Bkz Tablo 4, Grafik 1).

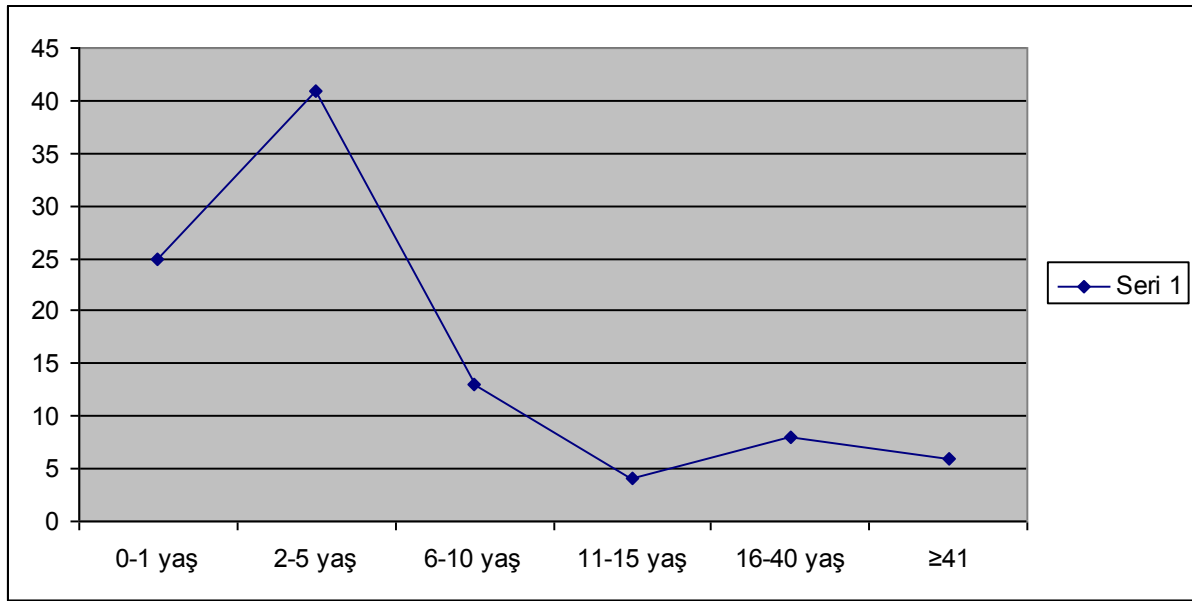
Campylobacter üreyen örnek sayısında; yaşlara göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır (p:0.000). Yaş attıkça *Campylobacter* üreme sıklığı anlamlı şekilde azalmaktadır.

Tablo 4: Yaş gruplarına göre işlemlenen ve üreme saptanan örnek sayıları

	0-1 yaş	2-5 yaş	6-10 yaş	11-15 yaş	16-40 yaş	≥41 yaş	Toplam
Üreme saptanan örnek sayısı	25	41	13	4	8	6	97
İşlemlenen örnek sayısı	139	213	118	42	122	141	775
Yaş grubundaki % üreme	%18	%19	%11	%10	%7	%4	%13

p: 0.000

Grafik 1: Yaş gruplarına göre *Campylobacter* spp. oranları

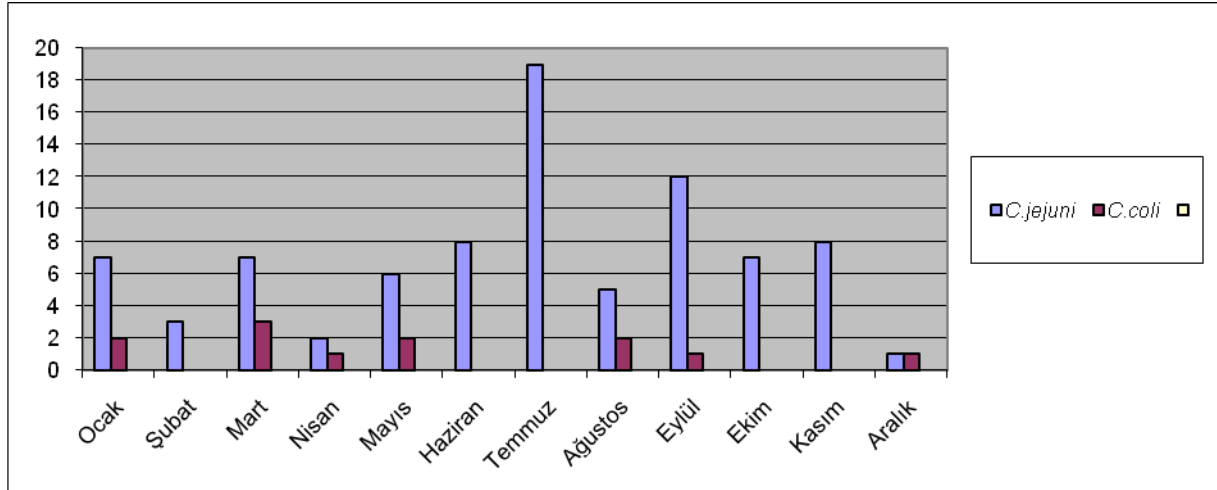


4.2. Üremelerin aylara göre dağılımı

Ocak ayında yedi *C. jejuni* ve iki *C. coli*, şubat ayında üç *C. jejuni*, mart ayında yedi *C. jejuni* ve üç *C. coli*, nisan ayında iki *C. jejuni* ve bir *C. coli*, mayıs ayında altı *C. jejuni* ve iki *C. coli*, haziran ayında sekiz *C. jejuni*, temmuz ayında 19 *C. jejuni*, ağustos ayında beş *C. jejuni* ve iki *C. coli*, eylül ayında 12 *C. jejuni* ve bir *C. coli*, ekim ayında yedi *C. jejuni*, kasım ayında sekiz *C. jejuni* ve aralık ayında bir *C. jejuni* ve bir *C. coli* izole edildi (Bkz. Tablo 5, Grafik 2). *Campylobacter* üreyen örnek sayısında; mevsimlere göre istatistiksel olarak anlamlı

bir fark yoktur ($p>0.05$). Fakat mart ve temmuz aylarındaki üremeler diğer aylara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir ($p:0.000$)

Grafik 2: İzole edilen 85 *C. jejuni* ve 12 *C. coli*'nin aylara göre dağılımı



Tablo 5: İzole edilen 85 *C. jejuni* ve 12 *C. coli*'nin aylara göre dağılımı

Aylar	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	Toplam üreme	Toplam Örnek	Üreme yüzdesi	Üreyen sayı/İşlemlenen sayı:%
Aralık	1	1	2	54	3,70	Kış 14/134:%10,44
Ocak	7	2	9	53	16,98	
Şubat	3	0	3	27	11,11	
Mart	7	3	10	38	26,31	İlkbahar 21/148:%14,18
Nisan	2	1	3	50	6	
Mayıs	6	2	8	60	13,33	
Haziran	8	0	8	47	17,02	Yaz 34/250:%13,6
Temmuz	19	0	19	85	22,35	
Ağustos	5	2	7	118	5,93	
Eylül	12	1	13	97	13,40	Sonbahar 28/243:%11,52
Ekim	7	0	7	81	8,64	
Kasım	8	0	8	65	12,30	
Toplam	85	12	97	775	12,51	

4.3. *Campylobacter* izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları

İzole edilen 85 adet *C. jejuni* ile 12 adet *C. coli*'nin %5 taze koyun kanlı Mueller Hinton agarda E-test yöntemi ile meropenem, eritromisin, gentamisin, doksisisiklin ve siprofloksasin duyarlılıklarına bakıldı. *C. jejuni* izolatlarında meropeneme direnç tespit edilmezken eritromisin ve doksisisikline % 11.8, gentamisine %4.7, siprofloksasine %51.8 oranında direnç tespit edildi. *C. coli* izolatlarında ise, meropenem, gentamisin ve doksisisikline direnç saptanmazken, eritromisine %17 ve siprofloksasine %50 oranında direnç tespit edildi.

Hem *C. jejuni* hem de *C. coli*'de disk difüzyon yöntemi ile sefalotin ve nalidiksik asit duyarlılığına da bakıldı. *C. jejuni*'de sefalotine %100, nalidiksik asite % 48.2 oranında direnç tespit edildi. *C. coli*'de ise sefalotine %100 ve nalidiksik asite %83 oranında direnç tespit edildi (Bkz. Tablo 6).

Tablo 6: *C. jejuni* ve *C. coli*'nin antibiyotik duyarlılıkları

Antibiyotik	<i>C. jejuni</i> (n=85)		<i>C. coli</i> (n=12)	
	Duyarlı (%)	Dirençli (%)	Duyarlı (%)	Dirençli (%)
Meropenem	85 (%100)	- (%0)	12 (%100)	- (%0)
Eritromisin	75 (%88.2)	10 (%11.8)	10 (%83)	2 (%17)
Gentamisin	81 (%95.3)	4 (%4.7)	12 (%100)	- (%0)
Doksisisiklin	75 (%88.2)	10 (%11.8)	12 (%100)	- (%0)
Siprofloksasin	41 (%48.2)	44 (%51.8)	6 (%50)	6 (%50)
Sefalotin	- (%0)	85(%100)	- (%0)	12 (%100)
Nalidiksik asit	44 (%51.8)	41 (%48.2)	2 (%17)	10 (%83)

C. jejuni'lerin 31 tanesi kadınlardan ve 54 tanesi erkeklerden izole edilirken; *C. coli*'lerin ise 6 tanesi kadınlardan ve 6 tanesi de erkeklerden izole edildi. Toplam olarak erkeklerde 60 *Campylobacter spp.* ve kadınlarda da 37 *Campylobacter spp.* izole edildi (Bkz.Tablo 7). Cinsiyete göre; *C. jejuni* üreyen örnek sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır

(p:0.042). Erkeklerde *C. jejuni* üreme sıklığı kadınlara göre daha fazladır. Bunun erkeklerde dışarıda yemek yeme alışkanlığından kaynaklanması sözkonusu olabilir.

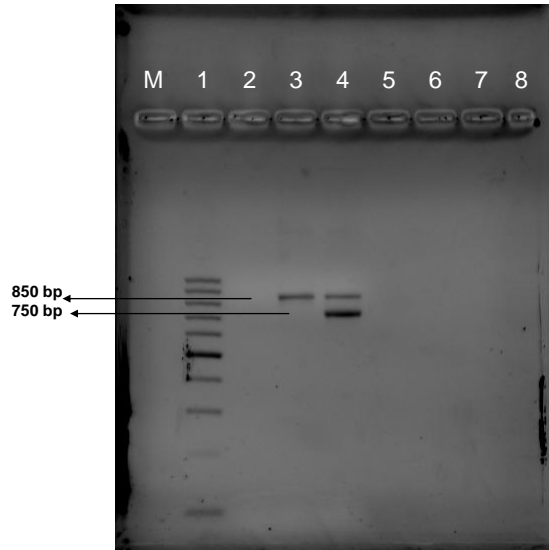
Tablo 7: *C. jejuni* ve *C. coli*'de cinsiyete göre dağılım

Cinsiyet(n=Hasta sayısı)	<i>C. jejuni</i> (%)	<i>C. coli</i> (%)	Toplam (%)
Kadın (n=363)	31 (% 8.5)	6 (% 1.7)	37 (% 10.2)
Erkek (n=412)	54(% 13.1)	6 (% 1.5)	60 (% 14.6)

4.4. *Campylobacter* tür tanımlarının doğrulanması

4.4.1. *Campylobacter* multipleks PZR sonuçları

Multipleks PZR sonucu sadece *Campylobacter* 16S rRNA geni (850 bp) taşıyan 12, hem *Campylobacter* 16S rRNA geni hem de *Campylobacter jejuni*'ye özgü hipurikaz geni (750bp) (Bkz. Şekil 2) taşıyan 85 suş olmak üzere toplam 97 suş tespit edildi.



Şekil 2: *Campylobacter* Multipleks PZR jel görüntüsü. *Campylobacter spp.* (3) ve *C. jejuni* (4) . 850 bp'lik band *Campylobacter 16SrRNA* genini, 750 bp'lik band ise *hipurikaz* genini göstermektedir.

Böylelikle tür tanımları ve sayılar PZR ile de doğrulanmış oldu.

4.4.2. APİ Campy sonuçları

Hipurat hidolizi negatif olan ve multipleks PZR sonucu sadece *Campylobacter* 16S rRNA geni taşıyan 12 suşun APİ Campy ile tür düzeyinde tanımlaması yapıldı. Suşların tamamı *C. coli* olarak tanımlandı (Bkz: Tablo 8). Bunun dışında, gerek kültür gerekse multipleks PZR ile *C.jejuni* olarak tanımlanan beş suş da kontrol için APİ Campy ile incelendi ve tümünün bu yöntemle de tür tanımı doğrulandı.

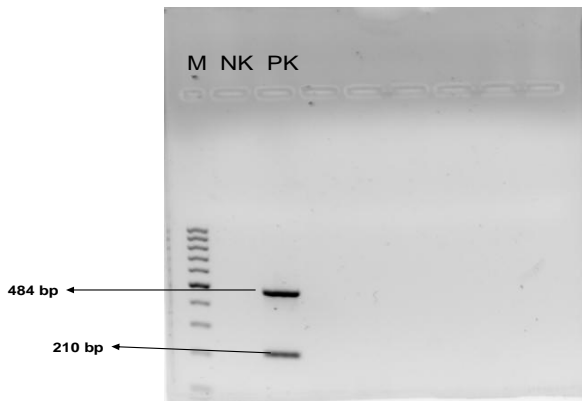
Tablo 8: APİ Campy sonucu

	Hipurat (-) örnek sayısı	APİ Campy sonucu
DEÜ örnekleri	9	9 <i>C.coli</i>
Behçet Uz örnekleri	3	3 <i>C.coli</i>

4.5. EHEC stx-1 ve stx-2 multipleks PZR sonuçları

İncelemeye alınan 171 adet *E. coli* izolatından hiç birinde, *stx-1* veya *stx-2* genine ait bantlar (Şekil 3) tespit edilmedi. Aynı durum laboratuvarında sorbitollü MacConkey'de şeffaf koloni oluşturmuş ve O157:H7 antiserumu ile aglütinasyon verdiği için EHEC olarak belirlenmiş 5 izolat için de geçerli idi.

Sonuç olarak; çalışmamızda EHEC suşu saptanmadı (Tablo 9).



Şekil 3: EHEC Multipleks PZR jel görüntüsü. 484 bp'lik band *stx-2* genini, 210 bp'lik band ise *stx-1* genini göstermektedir.

Tablo 9: EHEC multipleks PZR sonucu

	Toplam <i>E. coli</i> (n=171)	O157:H7(+) (n=5)
<i>stx-1</i> pozitif örnek sayısı	Ø	Ø
<i>Stx-2</i> pozitif örnek sayısı	Ø	Ø

5. TARTIŞMA

Dünyada gastroenterit etkenleri arasında *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* ve *Shigella spp.* ilk üç sırada yer almaktadır. FoodNet süreyans programı çerçevesinde, 2006 yılı içerisinde laboratuvarca doğrulanmış toplam 17.252 diyare vakası tespit edilmiştir. Bunların identifikasyonu neticesinde 6.655 vaka ile *Salmonella spp.*, 5.712 vaka ile *Campylobacter spp.*, 2.736 vaka ile *Shigella spp.* ilk üç sırada yer almıştır (5).

Gelişmiş ülkelerde yiyecek kaynaklı gastroenterit salgınlarında *Campylobacter spp.* ilk sırada yer alırken ikinci sırada non-tifoidal salmonelloz gelmektedir (120).

Ülkemizde ishallerden izole edilen bakteriyel etkenler ve sıklıkları: *Shigella spp.* % 0.3-10.9, *Salmonella spp.* % 1.6-6.3, *Campylobacter spp.* % 1.0-13.0, EPEC %1.1-5.4, *Aeromonas* % 2.7 olarak bildirilmiştir (7,8,121-123).

Genel olarak ülkemizde bulunan rutin laboratuvarlarda *Shigella* ve *Salmonella* izolasyonunda sorun olmadığı, buna karşın birçok laboratuvarında *Campylobacter* ve EHEC tanımlaması yapılmadığı görülmektedir. Bu nedenle, bu iki patojene ait veriler ancak özel çalışmalardan veya tez çalışmalarından elde edilmektedir. *Campylobacter* türlerinin üretimi için özel şartlar gerekmesi (seçici besiyeri, mikroaerofilik ortam ve 42°C’de inkübasyon gibi) bu kısıtlılıkta etkili olabilir. Son yıllarda Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Müdürlüğüne yürütülen UEPLA projesinin bu konudaki veri eksikliğini gidermesi beklenmektedir (124).

Yapılan çalışmalar, *Campylobacter* türlerinin azımsanmayacak oranlarda bulunduğu işaret etmektedir. Örneğin, Öztürk ve arkadaşlarının (92) Mayıs 1992-Şubat 1994 tarihleri arasında yürüttükleri ve 1890’ı diyareli ve 432’si sağlıklı bireylerden olmak üzere toplam

2322 dışkı işlemedikleri çalışmalarında % 10.9 oranında *Shigella spp.*, % 6.6 *Campylobacter spp.*, % 6.29 *Salmonella spp.*, % 5.35 EPEC, % 2.69 *Aeromonas spp.* tespit edilmiştir. Aynı çalışmada *Campylobacter*'lerin yaz aylarında daha sık olmak üzere yıl boyunca ve başta 0-2 yaş grubu olmak üzere her yaşta izole edildiği görülmektedir.

Ülkemizde yapılmış değişik çalışmalarda tespit edilen *Campylobacter spp.* oranları farklılık göstermektedir. Aşçı ve arkadaşları % 13, Altındiş ve arkadaşları % 6.6, Hasçelik ve arkadaşları, % 10.6, Işık ve arkadaşları % 7.5, Yıldırım ve arkadaşları % 2.7, Gültekin ve arkadaşları % 4.8, Aktaş ve ark. % 8.8, Akgün ve ark. % 1.4, Taş ve arkadaşları % 3.5 oranında *Campylobacter spp* izole etmişlerdir (125-133).

Taş ve arkadaşları (133),dışkı patojenlerinin tespitine yönelik yaptıkları çalışmada, ishallerde % 5'lik oranla rotavirusu takiben % 3.5 ile *Campylobacter spp.*'yi tespit etmişlerdir. *Campylobacter spp.*'nin *Salmonella spp.* (% 0.5) ve *Shigella spp.*'den (% 0.5) daha sık izole edilmiş olması ve *Campylobacter spp.*'nin 0-14 yaş grubunda daha sık görülmesi bizim bulgularımızla da uyumludur.

Campylobacter spp. izolasyonu için çok sayıda seçici besiyeri mevcuttur. Besiyerlerine seçiciliği arttırmak amacıyla çeşitli antimikrobiyal maddeler eklenebilmektedir. Bunlar arasında sefoperazon, amforisin B, vankomisin, teikoplanin ve basitrasin sayılabilir (46).

Engberg ve arkadaşları 600 fekal örnekten oluşan küçük çaplı çalışmalarında *Campylobacter spp.*'nin 37°C ve 42°C'deki inkübasyonlarında üreme durumunu araştırmışlardır. *C. upsaliensis*'in 42°C'de çok iyi ürediği ancak CAT (Cefoperazon, Amphotericin-B ve Teichoplanin agar) hariç seçici besiyerlerinde genellikle üremediğini saptamışlardır. Termofilik olmayan *Campylobacter* türleri 42°C'de üremediği halde çoğu *Campylobacter* türü 37°C'de iyi üremektedirler. Skirrow besiyeri ve SSM ("Semisolid blood-free motility medium") besiyerleri 42°C'de kullanılmak üzere tasarlanmışlardır. Bunlar 37°C'de zayıf seçici özellik gösterirler. Ancak mCCDA ve CSM ("Charcoal based Selective Medium") besiyerleri ise 37°C'de iyi seçici özellik gösterirler. Engberg ve arkadaşlarının termofilik *Campylobacter spp.* izolasyon derecelerini araştırdıkları çalışmalarında ise üç seçici besiyeri (Skirrow besiyeri, CAT besiyeri, mCCDA besiyeri) ve filtrasyon yöntemi

kıyaslanmıştır. İkinci günde ve 2-5 gün arasındaki inkübasyon sonunda mCCDA besiyerinin *C. jejuni* ve *C. coli* izolasyon oranı diğerlerinden daha iyi bulunmuştur (46).

Besiyerlerine eklenen antibiyotikler hassas bazı *Campylobacter* türlerinin üremesini inhibe edebileceği için filtrasyon ile seçici olmayan besiyerlerine ekimi öneren araştırmacılar da bulunmaktadır (45). *Campylobacter spp.* izolasyonunda kullanılan altı besiyeri ile filtrasyon tekniğinin karşılaştırıldığı çalışmada, CSM ve mCCDA besiyerleri, en seçici besiyerleri olarak saptanmışlardır. Aynı çalışmada SKM ve Campy BAP'ın besiyerleri de *C.coli* için en inhibitör besiyerleri olduğu görülmüştür (111).

Bu çalışmada kullandığımız mCCDA besiyerine de 32 mg/L Sefoperazon ve 16 mg/L Amfoterisin B ilave edilmiştir. Literatürdeki çalışmalarda bu besiyerinin farklı *Campylobacter* türlerini üretebildiği ve inhibitör etkisinin daha az olduğu bildirilmiştir (46). Bu nedenle bu çalışmada mCCDA tercih edilmiştir. Ayrıca, bu tez çalışması ile uygulamaya girmesini takiben mCCDA besiyeri, DEÜ Merkez laboratuvarında da halen başarıyla kullanılmaktadır.

İnkübasyon sürelerinin uzatılması ile *C. jejuni* ve *C. coli* izolasyon oranlarında belirgin bir artışın gözlemlenmemesi, ek inkübasyon süresine gereksinim olmadığını göstermektedir (46).

Direkt bakıları anlamlı olan diyare örneklerinin seçimi *Campylobacter spp.* gibi diğer dışkı patojenlerinin izolasyon oranını belirgin olarak arttırmaktadır (110,134). Bu nedenle, bu çalışmada da örnek grubu seçilirken lökosit ve/veya eritrosit içeren dışkı örnekleri tercih edilmiş ve laboratuvarımıza 01.06.2007 – 31.05.2008 tarihleri arasında gönderilen dışkı örnekleri, makroskopik görünüm, hücre tipi, hücre sayısı ve üreme açısından değerlendirilmiştir. Bu süre içinde toplam 2129 dışkı kültürü yapılmış olup direkt bakısı anlamlı olanlar 529 (% 25), direkt bakısı anlamlı olup patojen bakteri üremesi saptananlar 102 (% 5), direkt bakısı anlamsız olup patojen bakteri üremesi saptananları ise 10 (% 0.5) olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamızda *Campylobacter spp.*, başta 0-10 yaş grubunda ve yaz aylarında olmak üzere her yaş ve mevsimde diyare etkeni olarak saptanmıştır. Dünyada ve ülkemizde yapılmış farklı çalışmalarda da benzer durum söz konusudur. *Campylobacter spp.*'nin yaz aylarında ve çocuklarda izolasyonu daha fazla bulunmuştur (92,93,108,129). Ancak bu çalışmada örneklerimizin yarısını Behçet Uz Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden almış olmamız izole edilen bakterilerin sebep olduğu hastalığın yaş grubu tespitinde çocukluk yaşına yönelik bir eğilim artışına sebep olmuş olabilir. Ancak yaş gruplarındaki izolasyon oranları kendi hastanemizdeki sonuçlar ile uyum göstermektedir. Hastanemizde 0-1 yaş grubunda altı (%35.3), 2-5 yaş grubunda 19 (%34.0), 6-10 yaş grubunda iki (%5.7), 11-15 yaş grubunda dört (%22.2), 16-40 yaş grubunda sekiz (%6.6) ve 40 ve üzeri yaş grubunda ise altı (%4.3); Behçet Uz Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden ise 0-1 yaş grubunda 19 (%15.7), 2-5 yaş grubunda 22 (%14.1), 6-10 yaş grubunda 11 (%13.3) *Campylobacter spp.* izole edilmiştir (p:0.000). Bu verilere göre, hastanemizde bir yıllık araştırma süresince diyareli hastalardan izole edilen patojenlerin başında *Campylobacter spp.*(n=45) gelmiş, bunu *Salmonella spp.* (n=40) ve *Shigella spp.* (n=22) izlemiştir.

Gelişmiş ülkelerde, dört yaş altı ve 15-44 yaş gruplarında *Campylobacter spp.*'ye bağlı enfeksiyonların sıklığı daha fazla olarak bildirilmiştir (78). Danimarka'da Ocak 1995 – Eylül 1996 tarihleri arasında yapılan bir çalışmada, 133.810 dışkı örneğinden 3.255 *C. jejuni* ve *C. coli* izole edilmiş olup 0-9 yaş grubu ile 20-29 yaş grubunda belirgin bir yoğunlaşma tespit edilirken diğer yaş gruplarında da çok az olmamak üzere her iki türle de diyare etkeni olarak karşılaşılmıştır. Aynı çalışmada *C. concisus*'un ise daha çok 0-9 yaş grubundan izole edilmiştir (46).

Taylor ve arkadaşlarının beş yaş altı çocuklarda diyare etkenlerini araştırdıkları çalışmalarında *Campylobacter spp.* izolasyonunun 0-2 yaş grubunda yoğunlaştığı görülmüştür (110).

Tahran'da yapılmış bir çalışmada *Campylobacter spp.*'nin 6-7 yaş grubunda daha belirgin sıklığı olduğu görülmektedir. Yaz ve sonbaharda izolasyon oranı daha fazla bulunmuştur (135).

Hasçelik ve arkadaşları (127) çalışmalarında 1-4 yaş grubunda daha sık *Campylobacter spp.* izole etmişlerdir. Yine aynı çalışmada erkeklerden % 58.3 oranında *Campylobacter spp.* izole etmişlerdir. Bu bulgular, bizim bulgularımızla da uyumludur.

Buna karşın; Ateş-Yılmaz ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (136), yaz aylarında *Campylobacter spp.* izolasyonu daha sık olup yaş grupları arasında belirgin bir farklılık tespit edilememiştir. Aynı çalışmada erkeklerde % 61 ve kadınlarda % 39 oranında *Campylobacter spp.* izole edilmiştir.

Genellikle ishal ile kendini gösteren *Campylobacter spp.* enfeksiyonları sıklıkla görülüp, mevsimsel farklılık da gösterirler. Yaz aylarında kış aylarına göre sıklığının iki kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (78).

Danimarka'daki bir *Campylobacter* sörveyans çalışmasında, piliçlerde kış aylarına göre yaz aylarında *Campylobacter spp.* ile daha fazla kontaminasyon olduğu ve insan *Campylobacter spp.* enfeksiyonlarında da benzer mevsimsel artış olduğu gösterilmiştir. Diğer Avrupa ülkeleri için de benzerlik söz konusudur (21). Biz de çalışmamızda *Campylobacter* izolasyonunun en fazla yaz mevsiminde olduğunu; bunu sırası ile sonbahar, ilkbahar ve kış aylarının izlediğini gözlemledik.

1995-2001 yılları arasında yapılmış çalışmada, *Campylobacter spp.* üreyen hastalarda cinsiyet açısından anlamlı bir fark tespit edilememiştir (Erkek/kadın oranı 1.15/1) (90). Çalışmamızda da *C. coli*, her iki cinsiyette eşit olarak saptanırken *C. jejuni*, ise erkeklerde daha fazla izlenmiştir. Tahran'da yapılmış çalışmada ise tespit edilen 40 *Campylobacter spp.*'den 19'u erkek ve 21'i ise kız çocuklardan izole edilmiştir (135).

Campylobacter ishalleri, antibiyotik kullanılmadan da kendi kendini sınırlayan tablolar olmakla birlikte, bazı durumlarda antibiyotik tedavisi gerekmektedir. Son yıllarda, tedavide ilk seçenek olarak tercih edilen antibiyotiklere, özellikle de florokinolonlara, direncin arttığı bildirilmektedir (67). Ülkemizde bu açıdan da veri yok denecek kadar azdır. Bu nedenle bu çalışmadaki izolatların antibiyotik duyarlılıkları da değerlendirilmiştir.

CLSI *Campylobacter spp.*'de antibiyotik duyarlılığı için referans yöntem olarak taze koyun kanlı agar da agar dilüsyon yöntemini önermektedir. Ancak yapılmış çok sayıda çalışmada E-Test yöntemi ile MİK bakılmasının agar dilüsyon yöntemi ile uyumlu sonuçlar verdiği yönünde sonuçlar vermiştir (69,70,89,114,115). Çok sayıda araştırmacı antibiyotik duyarlılığında standardize olmamasına rağmen disk difüzyon yöntemini kullanmıştır (72,73,93). Disk difüzyon yönteminin güvenilir, kolay ve ucuz bir yöntem olduğundan dolayı *C. jejuni* için eritromisin ve siprofloksasin duyarlılığında standart bir yöntem haline gelene kadar bir tarama yöntemi olarak kullanılmasını öneren çalışmacılar da mevcuttur (71).

Çalışmamızda antibiyotik duyarlılıklarını değerlendirmek için CLSI standartları doğrultusunda taze koyun kanlı Mueller Hinton besiyeri kullanılmış ve E-Test ile toplam 97 *Campylobacter spp.*'nin meropenem, siprofloksasin, eritromisin, gentamisin ve doksisisiklin olmak üzere beş antibiyotik için duyarlılık durumunu değerlendirilmiştir. *Campylobacter jejuni*'de (n=85) suşların tamamının meropeneme duyarlı olduğu görülmüştür. Öte yandan, eritromisine % 11.8, gentamisine % 4.7, doksisisikline % 11.8 ve siprofloksasine %51.8 oranında direnç olduğu belirlenmiştir. *Campylobacter coli*'de (n=12) de suşların tamamını meropenem, gentamisin ve doksisisikline duyarlı bulunmuştur. Bu izolatlarda eritromisin direncinin % 17 ve siprofloksasin direncinin ise % 50 oranında olduğu izlenmiştir. Dünyada saptanmış ve giderek artış gösteren siprofloksasin direncinin bizim çalışmamızda da yüksek bulunması dikkat çekici bir bulgudur.

Ülkemizde yapılmış diğer çalışmalarda; Öngen ve arkadaşları (93), 2000- 2004 yılları arasında izole ettikleri toplam 82 (% 1.2) *Campylobacter spp.*'den 22'sinin antibiyogramını yapmış ve kinolonlara %59 oranında direnç saptamışlardır. Aşçı ve arkadaşları (125), *C. jejuni*'de eritromisine direnç saptanmazken gentamisine dirençli 12, tetrasikline dirençli bir, ofloksasine dirençli bir suş tespit etmişlerdir. Akan ve arkadaşlarının *Campylobacter* türlerinin antibiyotik duyarlılıklarını disk difüzyon yöntemi ile araştırdıkları çalışmalarında (147), trimetoprim-sülfoksazole % 90.8, ampisiline % 23.5, kloramfenikole % 6.7 oranında direnç tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada tetrasiklin ve amoksisilin-klavulanik asite direnç saptanmazken ofloksasin, eritromisin, roksitromisin ve azitromisine % 1'den az oranda direnç saptanmıştır.

Arap yarımadasında yapılan ve *Campylobacter spp.*'nin antibiyotik duyarlılıklarına bakılan çalışmada hem insan hem de tavuk izolatları kullanılmıştır. Agar dilusyon, disk difüzyon ve E-Test yöntemleri ile yapılan çalışmada, insan ve tavuk izolatlarında % 80'in üzerinde siprofloksasin direnci tespit edilirken insan izolatlarında %32.6 oranında tetrasiklin direncine karşın tavuk izolatlarında %70'in üzerinde tetrasiklin direnci saptanmıştır. Eritromisine insan izolatlarında %1.7 oranında direnç tespit edilirken tavuk izolatlarında ise dirençli suş saptanmamıştır. Her üç yöntem arasında tetrasiklin dışında diğer antibiyotiklerin duyarlılığında bire bir uyum saptanmıştır. Tavuklarda saptanan yüksek tetrasiklin direnç oranının bu antibiyotiğin düzenli bir şekilde profilaktik olarak kümes hayvanlarına verilmesinden kaynaklanmış olabileceği belirtilmiştir. Siprofloksasin direncinin her iki türde de yüksek olmasının nedeni olarak yine kaynak kümes hayvanlarında direncin mevcut oluşu ve bunların tüketimi düşünülmüştür (89).

Campylobacter spp.'deki tek veya çoklu ilaç direncinin araştırıldığı 1998- 2001 yılları arasındaki çalışmada siprofloksasin ve siprofloksasin ile tetrasikline birlikte direnç artışı anlamlı bulunmuştur (75).

Gaudreau ve arkadaşları 10 yıllık çalışmalarında *C. jejuni* suşlarında eritromisin, tetrasiklin, nalidiksik asit ve siprofloksasin duyarlılıkları çalışmış ve özellikle çalışmanın son son üç yılında tetrasiklin, nalidiksik asit ve siprofloksasine dirençte anlamlı bir artış tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada eritromisine dirençli suş ise tespit edilmemiştir (77).

Kinolon direncinin hayvanlarda kinolon kullanımının yaygınlığı ile ilişkili olduğunu ancak Avrupa'da insanlardan izole edilen dirençli *Campylobacter* suşların ise daha çok Avrupa dışı yabancı ülkelere ziyaretler ile ilişkili olduğunu vurgulayan araştırmacılar da vardır (21).

Danimarka'da enterik patojenler için ulusal sörveyans sistemi dahilinde Ocak 1996 - Aralık 2000 arasında kültürle doğrulanmış 14.443 *Campylobacter* enfeksiyonu rapor edilmiştir. Bunları 3541'ine (% 24.5) antimikrobial duyarlılık testi uygulanmış ve *Campylobacter* izolatlarının % 72.2'si kinolon ve eritromisine duyarlı, % 21.9'u kinolona dirençli, % 3.1'i eritromisine dirençli ve % 2.8'i hem kinolon hem de eritromisine dirençli

olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada hastalar, örnek alındıktan 90 gün sonrasına kadar takip edilmiş ve 22 hastada (% 0.63) bu süre içinde yan etki, invaziv hastalık veya ölüm geliştiği saptanmıştır. Kinolon dirençli *Campylobacter* ile infekte hastaların ilk 30 gün içinde yan etki gelişimi açısından kinolon ve eritromisine duyarlı hastalardan 6 kat daha fazla riske sahip oldukları ve bu riskin sadece eritromisin dirençli hastalarda ise 90 gün içinde 5 kat daha fazla olduğu rapor edilmiştir (137).

Smith ve arkadaşlarının çalışmalarında altı önemli konuya vurgu yapılmıştır (76). Bunlar:

1. İnsan kaynaklı *C. jejuni* izolatlarında kinolon direncinde artış tespit edilmiş olup 1992'de % 1.3 iken 1998'de % 10.2'ye yükselmiştir.
2. Kış aylarında yabancı ülkelere ziyaret ile ilişkili olarak kinolon direncinde mevsimsel pik görülmüştür.
3. Yerel dirençli enfeksiyon oranlarında 1996'dan 1998'e kadar önemli bir artış tespit edilmiştir.
4. Perakende satılan kümes hayvanı ürünlerinde 1997'de yüksek oranda siprofloksasin dirençli *C. jejuni* ile kontaminasyon saptanmıştır.
5. İnsan ve hayvan izolatlarından elde edilen kinolon dirençli *C. jejuni* izolatlarının moleküler alt tipleri araştırılmış. Kümes hayvanlarının insanlar için *Campylobacter* enfeksiyonlarında potansiyel gıda rezervuarı oldukları ve kinolon dirençli enfeksiyonlarda da önemli bir kaynak oluşturdukları görülmüştür.
6. Kültür öncesi kinolon kullanımının dirençli *Campylobacter* seçimine neden olduğu ve bu çalışmadaki dirençli suşların %15'inin bu yolla ortaya çıktığını tespiti ile bunun dirençli suşların artışı ile doğrudan ilişkili olabileceği vurgulanmıştır.

İnsan, tavuk ve domuz izolatları ile yapılan çalışmada, *C. jejuni* ve *C. coli*'de eritromisin direncine bakılmıştır. *Campylobacter spp.* bulaşımın yaz aylarında daha çok mangal alışkanlığı nedeniyle tavuklardan ve domuzların artıkları ile kirlenmiş su ve çevresel faktörlerden kaynaklandığı ve domuz izolatlarında eritromisin direncinin daha belirgin olduğu görülmüştür (138).

Campylobacter spp.'deki tetrasiklin, makrolid ve florokinolon direncinin hayvan yemlerine katılan antibiyotiklerden, hayvanlara profilaktik antibiyotik verilmesinden veya

insanlarda gereksiz antibiyotik kullanımının yaygınlığından kaynaklanabileceği bildirilmektedir (139,140). Çiftliklerde profilaktik antibiyotik kullanımı ile hayvanların hastalanmaları engellenerek büyümelerinin devamının sağlanması için uygulanmaktadır. Profilaktik antibiyotik verilmezse bir hayvandaki hastalığın çok kısa sürede tüm çiftliğe yayılması riski söz konusudur. Gerek büyümenin devamı gerekse de hastalığın önlenmesi açısından hayvanlara düşük dozda antibiyotik verilmesi, sağlıklı hayvanın normal florasının antibiyotiğe maruziyeti anlamına gelir. Bu karşılaşma hayvanların normal floralarında dirençli suş seçimini hızlandırır. “Food and Drug Administration” (FDA) hayvanlarda büyümeyi teşvik için kullanımına izin verdiği ilaçlar arasında basitrasın, klortetrasiklin, eritromisin, linkomisin, oksitetrasiklin, penisilin, sülfonamidler, tilosin ve virjinamisin sayılabilir (141). Ancak sonraki yıllarda, FDA’ya bağlı “Center for Veterinary Medicine Institute” raporunda, 1977’de *Campylobacter spp.*’de florokinolon direnci % 12.9 iken, 1999’da *C. jejuni*’de %17.6’ya, *C. coli*’de %30’a yükselmiş olduğu rapor edilmiştir. Bunun sonucunda, florokinolonların kümes hayvanlarında kullanımına dair onay, Ekim 2002’de aşağıdaki nedenlerden dolayı geri çekilmiştir (142):

- Florokinolonların kümes hayvanlarında kullanılmalarından dolayı, insan ve kümes hayvanlarında patojen *Campylobacter spp.*’de florokinolon direnci gelişimi;
- Bu florokinolon dirençli *Campylobacter spp.*’nin insanlara transfer edilmesi ve insanlarda florokinolon dirençli *Campylobacter* enfeksiyonları gelişiminin önemli bir sebebi olması;
- İnsan sağlığı için florokinolon dirençli *Campylobacter* enfeksiyonları tehlike oluşturması.

Hayvan yemlerine farklı nedenlerle çeşitli antibiyotik maddelerin katılması, başta hayvan izolatları olmak üzere insan izolatlarında da hızla gelişen antibiyotik direncinden dolayı bir alarm durumuna neden olmuştur.

1940’lı yıllardan itibaren antibiyotikler, genellikle sindirim kanalı içerisindeki patojen ve patojen olmayan enterik mikroorganizmaların olumsuz etkilerinden kanatlıları korumak için yem katkı maddesi olarak karma yemlerde kullanılmaya başlanmıştır. Antibiyotiklerin etlik piliçlerin ve hindilerin yemden yararlanmasını ve büyümesini sağladıkları bildirilmiştir.

Kanatlı ve diğerk hayvanların karma yemlerinde büyümeyi teşvik edici olarak kullanılan antibiyotiklerin, uzun dönemde kullanımları sonucunda antibiyotiğe dirençli patojen mikroorganizmaların ortaya çıkmasına neden olur. Bu nedenle Avrupa Birliğı kanatlı hayvanların karma yemlerinde büyümeyi uyarıcı olarak kullanılan avoparsin'in vankomisin-dirençli *E.faecium* oluşumunda artışa neden olduğunu belirterek avoparsin, tilosin fosfat, virjinamisin, basitrasin ve spiramisin gibi antibiyotiklerin kullanımını yasaklamıştır. Ülkemizde Tarım Bakanlığı tarafından 10.06.1996'da yayınlanan "Yemlik Preparat ve Mineral Yemlerin Satış ve Tescil İşlemlerinde Uyulması Gereken Hususlar Hakkındaki Tebliğ" in 14. Maddesine istinaden 30.06.1996'dan itibaren virjinamisin, avoparsin, basitrasin, tilosin fosfat, spiramisin ve karbadoks büyütme faktörleri listesinden çıkarılmıştır (143).

Bu tez çalışmasının ikinci hedefi verotoksijenik *E.coli* O157: H7'nin, *stx* genlerinin saptanması ile gösterilmesidir. Çalışmamızda bu amaçla 171 kanlı dışkı örneğı incelenmiş, sorbitollü MacConkey agarda renksiz koloni oluşturan ve *E. coli* O157:H7 antiserumu ile reaksiyon veren sadece beş *E. coli* suşu tespit edilebilmiştir. Ancak çalışmanın moleküler ayağında bu 171 suştan hiç birinde *stx-1* ve *stx-2* saptanmamıştır.

Yurtdışında ise *E. coli* O157:H7 suşu genellikle gıda kaynaklı salgınlarda karşımıza çıkmaktadır. Özellikle kanlı diyarelerde dışkı örneklerinin *E. coli* O157:H7 aranması amacı ile sorbitollü Mac-Conkey agara ekilmesi ve üremenin sorbitol negatifliği açısından değerlendirilmesi önerilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde *E. coli* O157:H7 kaynaklı sporadik veya salgınla ilişkili olmak üzere yılda yaklaşık olarak 21.000 diyare vakası olduğu ve bunların 250'sinin ölümle sonuçlandığı tahmin edilmektedir (144).

Finlandiya'da 1990-1997 yılları arasında diyare etkeni olarak *E. coli stx-1*, *stx-2* ve *eaeA* geninin araştırıldığı çalışmada suşlarda *stx-2* pozitifliğinin fazlalığı göze çarpmaktadır. Aynı çalışmada, Türkiye kaynaklı iki *E. coli* suşundan biri *E. coli* O157:H7 (*eaeA* ve *stx-2* pozitif) ve diğeri O91:H40 (*eaeA* ve *stx-2* pozitif) olarak identifiye edilmiştir (145).

Ülkemizde yapılmış *E. coli* O157:H7 suşunun saptanmasına yönelik çalışmalarda, *E. coli* O157:H7 suşu ya hiç bulunmamış ya da çok az sayıda tespit edilebilmiştir (146,147,148).

Tolun ve arkadaşları, diyareli hastalardan PZR yöntemi ile Verotoksijenik *E. coli* araştırdıkları çalışmalarında 511 örnekten ancak dokuzunda pozitiflik saptamışlardır (149).

Ekşi ve arkadaşları ishal şikayeti ile başvuran 0-5 yaş grubu çocuklarda *E. coli* O157:H7 araştırdıkları çalışmalarında *E. coli* O157:H7 suşu tespit edememişlerdir (147).

Çalışmamızda da EHEC saptanamaması ya bölgemizdeki prevalansın az olması ya da kullandığımız yöntemin duyarlılığının düşük olmasından kaynaklanabilir. Bir başka gerekçe de O157:H7 dışındaki EHEC izolatlarının sorbitollü MacConkey'de yapılan ilk tarama sırasında gözardı edilmesidir. Bu nedenlerle, gelecek çalışmalarda doğrudan dışkı örneklerinden *stx1/stx2* PZR yapılan yöntemlerin kullanılması düşünülmektedir.

Sonuç olarak; bu tez çalışması ile *Campylobacter spp.* izolasyonu için kültür yöntemi rutin laboratuvar için standardize edilmiş ve kullanıma girmiştir. Böylelikle bu patojenlerle ilgili bölgemize ait sağlıklı veriler, ulusal veri tabanlarına ulaştırılabilecektir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bölgemizde diyare etkenleri arasında termofilik *Campylobacter* türlerinin azımsanmayacak bir oranda olduğu bu çalışma ile ortaya konmuştur. Dolayısı ile laboratuvarlarda rutinde *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* yanısıra Enterohemorajik *Escherichia coli* ve *Campylobacter spp.*'ye yönelik olarak gerek kültür gerekse de antimikrobiyal duyarlılık işlemlerinin de yapılması yerinde olacaktır. Böylece diyare etkenlerinin gerçek sıklığı ve antibiyotiklere duyarlılık durumu daha net bir şekilde gösterilebilecektir. Özellikle çocukluk dönemi dizanterik formda seyreden ishallerde termofilik *Campylobacter* türlerinin mutlaka araştırılması gerektiği ve laboratuvar imkanlarının uygun olması halinde yüksek duyarlılıkta sonuç veren API Campy yönteminin tanı amacı ile kullanılmasının uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

Diyareye neden olan Enterohemorajik *Escherichia coli* suşları sadece O157:H7 serotipinden kaynaklanmayabilir ve diğer serotiplerin de araştırılması gerekir. Bu yönde yapılacak çalışmalar ile bölgemizde ağırlıkta hangi serotipin/serotiplerin daha çok diyareye neden olduğu tespit edilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. T.C. Sağlık Bakanlığı, Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi. Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi-2004
2. E. Akbaş, V. Buyurgan. Bildirimi Zorunlu Bulaşıcı Hastalıklar İçin Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarlarının TanıKapasitelerinin Değerlendirilmesi: Bir Anket Çalışması. Mikrobiyoloji. 2006; 2(4): 4-7
3. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/index.html>
4. Foodborne diseases, emerging, WHO.Revised January 2002
5. MMWR, April 13, 2007 / 56(14);336-339
6. Foodborne diseases, emerging, WHO.Revised May 2005
7. B. Öngen. Türkiye'de İshal Etkenleri. ANKEM Derg 2006;20(Ek 2):122-134
8. C. Eroglu. Akut Ishalli Hastaya Yaklaşım. Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlara Pratik Yaklaşımlar Sempozyum Dizisi No:61 Şubat 2008;171-178
9. www.who.int/water_sanitation_health/diseases/diarrhoea/en/
10. E.A. Goddard, A.J. Lastovica, A.C. Argent. *Campylobacter* 0:41 isolation in Guillain-Barré syndrome. Archives of Disease in Childhood 1997;76:526–528
11. Prepared for World Water Day. Reviewed by staff and experts from the cluster on Communicable Diseases (CDS) and the Water, Sanitation and Health unit (WSH), World Health Organization (WHO).
12. J. P. Butzler, P. Dekeyser, AND T. Lafontaine. Susceptibility of Related *Vibrios* and *Vibrio fetus* to Twelve Antibiotics J Antimicrob Chemother , Jan. 1974, p. 86-89
13. E. Crushell, S. Harty, F. Sharif et al. Enteric *Campylobacter*: Purging Its Secrets? Pediatric Research 2004;55:3-12
14. D.E. Taylor, M. Eaton, W. Yan et al. N. Genome maps of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J Bacteriol 1992; 174: 2332±2337
15. A.J. Lawson, S.L. On, J.M. Logan, J. Stanley. 2001; *Campylobacter hominis* sp. Nov., from the hominis gastrointestinal tract. Int J Syst Evol Microbiol 51:651- 660
16. S.L.W. On. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. J Appl Microbiology. 2001; 90: 1-15.
17. B. Bourke, V... Chan, P. Sherman. *Campylobacter upsaliensis*: Waiting in the Wings. Clin Microbil Rev. 1998; 11: 440-449

18. D.E. Taylor, M. Eaton, W. Yan et al. Genome Maps of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J Bacteriol 1992;174:2332-2337
19. D.M. Rollins, R.R. Colwell. Viable but non-culturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in the natural aquatic environment. Appl Environ Microbiol 1986;52:531±538
20. Report on *Campylobacter*. Trends and sources of zoonotic agents in the European Union and Norway, 2001
21. J. Takkinen, A. Ammon, O. Robstad et al. European Survey on *Campylobacter* surveillance and diagnosis 2001. Euro Surveill 2003;8:207-226
22. P. Guerry, S.M. Logan, S. Thornton et al. Genomic Organization and Expression of *Campylobacter* Flagellin Genes. Journal of Bacteriology. 1990; 1853-1860
23. P. Guerry, S.M. Logan, S. Thornton et al. Genomic Organization and Expression of *Campylobacter* Flagellin Genes. J Bacteriol 1990;172:1853-1860
24. P. Guerry, R.A. Alm, M.E. Power et al. Role of Two Flagellin Genes in *Campylobacter* Motility. J Bacteriol 1991;173:4757-4764
25. T. Takata, S. Fujimoto and K. Amako. Isolation of nonchemotactic mutants of *Campylobacter jejuni* and their colonization of the mouse intestinal tract. Infection and Immunity. 1992; 60:3596-3600
26. M.B. Hugdahl, J.T. Beery and M.P. Doyle. Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*. Infection and Immunity. 1988; 56: 1560-1566
27. T.E. Hickey, S. Baqar, A.L. Bourgeois, C.P. Ewing et al. *Campylobacter jejuni*-stimulated secretion of interleukin-8 by INT407 cells. Infection and Immunity 1999; 67: 88±93
28. M.A. Jones, S. Töttemeyer, D.J. Maskell et al. Induction of Proinflammatory Responses in the Human Monocytic Cell Line THP-1 by *Campylobacter jejuni*. Infect Immun 2003;71: 2626–2633
29. R. Yao, D.H. Burr, P. Doig et al. Isolation of motile and non-motile insertional mutants of *Campylobacter jejuni*: the role of motility in adherence and invasion of eukaryotic cells. Molecular Microbiology 1994;14: 883±893.
30. T.M. Wassenaar. Toxin production by *Campylobacter*. Clinical Microbiology Reviews 1997; 10: 466-476.
31. C.L. Pickett, E.C. Pesci, D.L. Cottle et al.. Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter sp. cdtB* gene. Infection and Immunity 1996; 64: 2070-2078.

32. K.A. Grant, I.U. Belandia, N. Dekker et al. Molecular characterization of *pldA*, the structural gene for a phospholipase A from *Campylobacter coli*, and its contribution to cell-associated hemolysis. *Infection and Immunity* 1997; 65:1172-1180.
33. L.H. Field, V.L. Headley, S.M. Payne et al. Influence of iron on growth, morphology, outer membrane protein composition, and synthesis of siderophores in *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity* 1986; 54: 126-132.
34. C.L. Pickett, T. Auffenberg, E.C. Pesci et al. Iron acquisition and hemolysin production by *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity* 1992; 60: 3872-3877
35. T. Avril, E.R. Wagner, H.J. Willison et al. Sialic Acid-Binding Immunoglobulin-Like Lectin 7 Mediates Selective Recognition of Sialylated Glycans Expressed on *Campylobacter jejuni* Lipooligosaccharide. *Infect Immun*, 2006;74: 4133–4141
36. S. Kuroki, T. Saida, M. Nukina et al. *Campylobacter jejuni* strains from patients with Guillain-Barre syndrome belong mostly to Penner serogroup 19 and contain beta-N-acetylglucosamine residues. *Annals of Neurology* 1993; 33: 243-247
37. I. Nachamkin, B.M. Allos. And T. Ho. *Campylobacter* species and Guillain-Barre syndrome. *Clinical Microbiology Reviews* 1998; 11: 555-567
38. G. Storz and J.A. Imlay. Oxidative stress. *Current Opinions in Microbiology* 1999; 2: 188±194
39. F.L. Thies, H. Karch, H.P. Hartung et al. The ClpB protein from *Campylobacter jejuni*: molecular characterization of the encoding gene and antigenicity of the recombinant protein. *Gene*.1999a; 230: 61-67.
40. R.I. Walker, M. Blake Caldwell, E.C. Lee et al. Pathophysiology of *Campylobacter* Enteritis. *Microbiol Reviews*, 1986;50:81-94
41. T. Hannu, L. Matilla, H. Rautelin et al. *Campylobacter*-triggered reactive arthritis: a population-based study. *Rheumatology (Oxford)*. 2002;41(3):312-318.
42. G. Uşak Halaç, G. Somay, D. Karahan ve ark. Miller Fisher Sendromu: Bickerstaff Ensefaliti ile Karışan Bir Olgu Sunumu. *T Nörol Derg* 2004;10:527-530
43. Ö. Yavaşcan, S. Sütçüoğlu, G. Dizdärer ve ark. Miller-Fisher sendromu İki vaka takdimi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2004;47:283-286
44. T.C. Quinn, S.E. Goodell, C. Fennel et al. Infections with *Campylobacter jejuni* and *campylobacter*-like organisms in homosexual men. 1984;101: 187-192

45. J. Engberg, P. Garner-Smidt, S.L.W. On SLW et al.. Efficient isolation of *Campylobacteria* from stools. Letter, reply. J Clin Microbiol 2000b;38:2798-2799
46. J. Engberg, S. L. W. On, C. S. Harrington, et al. Prevalence of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, and *Sutterella spp.* in human fecal samples as estimated by a reevaluation of isolation methods for *campylobacters*. J. Clin. Microbiol. 2000;38:286–291.
47. F.L. Bolton, D.N. Hutchinson, G. Parker. Reassessment of selective agars and filtration techniques for isolation of *Campylobacter* species from faeces. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1988;7: 155-160
48. O. Vandenberg, A. Dediste, K. Houf et al. *Arcobacter* Species in Humans. Emerg Infect Dis 2004;10:1863-1867
49. G.A. Hebert, J.L. Penner, J.N. Hennessy et al. Correlation of an Expanded Direct Fluorescent-Antibody System with an Established Passive Hemagglutination System for Serogrouping Strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J Clin Microbiol. 1983; 18: 1064-1069
50. J. L. Penner and J. N. Hennessy. Passive Hemagglutination Technique for Serotyping *Campylobacter fetus subsp. jejuni* on the Basis of Soluble Heat-Stable Antigens. J Clin Microbiol 1980; 12: 732-737
51. H. Lior, D. L. Woodward, J. A. Edgar et al. Serotyping of *Campylobacter jejuni* by Slide Agglutination Based on Heat-Labile Antigenic Factors. J Clin Microbiol 1982;15:761-768
52. R. Tolcin, M.M. Lasalvia, B. A. Kirkley et al. Evaluation of the Alexon-Trend ProSpecT *Campylobacter* Microplate Assay. J Clin Microbiol, 2000;38:3853–3855
53. M. Hindiyeh, S. Jense, S. Hohmann. Rapid Detection of *Campylobacter jejuni* in Stool Specimens by an Enzyme Immunoassay and Surveillance for *Campylobacter upsaliensis* in the Greater Salt Lake City Area. J Clin Microbiol, 2000;38:3076–3079
54. M. Lund, A. Wedderkopp, M. Wainø et al. Evaluation of PCR for detection of *Campylobacter* in a national broiler surveillance programme in Denmark. J Appl Microbiol 2003;94:929–935
55. D. Linton, A. J. Lawson, R. J. Owen, et al. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. J. Clin. Microbiol. 1997;35(10): 2568–2572

56. A.J. Lawson, J.M.J. Logan, G.L. O'Neill et al. Large-Scale Survey of *Campylobacter* Species in Human Gastroenteritis by PCR and PCR–Enzyme-Linked Immunosorbent Assay J Clin Microbiol 1999;37:3860–3864
57. L.A. Metherell, J. M. Logan, and J. Stanley. PCR–enzyme-linked immunosorbent assay for detection and identification of *Campylobacter* species: application to isolates and stool samples. J Clin Microbiol. 1999;37:433–435.
58. A. Dediste, O. Vandenberg, L. Vlaes et al. Evaluation of the ProSpecT microplate Assay for detection of *Campylobacter*: a routine laboratory perspective. Clin Microbiol Infect. 2003;9:1085-1090
59. M.B. Huysmans, J.D. Turnidge and J.H. Williams. Evaluation of API Campy in Comparison with Conventional Methods for Identification of Thermophilic *Campylobacters*. J Clin Microbiol. 1995;33:3345–3346
60. L. Öztürk, K. Midilli, K. Okyay ve ark. Çocuk ve erişkin yaş grubu sürgün olgularında *C. jejuni* ve *C. coli* sıklığının araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 1994; 24: 42-5
61. S.L.W. On and P. J. Jordan. Evaluation of 11 PCR Assays for species-Level Identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J Clin Microbiol 2003;41:330-336
62. G. Gorkiewicz, G. Feierl, C. Schober et al. Species-Specific Identification of *Campylobacters* by Partial 16S rRNA Gene Sequencing. J Clin Microbiol 2003;41:2537–2546
63. P.T. Richardson and S.F. Park. Molecular characterization of a strain-specific sequence in *Campylobacter jejuni*. Letters in Appl Microbiol 1998;26:113–117
64. R. I. Karenlampi, T. P. Tolvanen, and M.-L. Hanninen. Phylogenetic Analysis and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Identification of *Campylobacter* Species Based on Partial groEL Gene Sequences. J Clin Microbiol 2004;42:5731–5738
65. B. L. Siemer, E. M. Nielsen, and S. L. W. On Identification and Molecular Epidemiology of *Campylobacter coli* Isolates from Human Gastroenteritis, Food, and Animal Sources by Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis and Penner Serotyping. Appl Environ Microbiol 2005;71:1953–1958
66. S.L.W. On. Identification Methods for *Campylobacters*, *Helicobacters*, and Related Organisms. Clin Microbiol Reviews 1996;9:405–422
67. Luangtongkum T, Jeon B, Han J, Plummer P, Logue CM, Zhang Q. Future Microbiol 2009; 4: 189-200

68. Taylor D, Courvalin P. Mechanism of antibiotic resistance in *Campylobacter* species. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 1107-1112
69. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing for infrequently-isolated or fastidious bacteria; approved guideline. Publication no. M45-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
70. P.F. McDermott, S.M. Bodeis-Jones, T.R. Fritsche et al. Broth Microdilution Susceptibility Testing of *Campylobacter jejuni* and the Determination of Quality Control Ranges for Fourteen Antimicrobial Agents. *J Clin Microbiol*. 2005;43:6136–6138
71. C. Gaudreau, Y. Girouard, L. Ringuette et al. Comparison of Disk Diffusion and Agar Dilution Methods for Erythromycin and Ciprofloxacin Susceptibility Testing of *Campylobacter jejuni subsp. jejuni*. *Antimicrob Agents And Chemother*. 2007; 51: 1524–1526
72. T. Luangtongkum, T.Y. Morishita, A.B. El-Tayeb et al. Comparison of Antimicrobial Susceptibility Testing of *Campylobacter spp.* by the Agar Dilution and the Agar Disk Diffusion Methods. *J Clin Microbiol*. 2007;45:590–594
73. C. Tremblay and C. Gaudreau. Antimicrobial Susceptibility Testing of 59 Strains of *Campylobacter fetus subsp. fetus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998; 42: 1847–1849
74. U. Ledergerber, G. Regula, R. Stephan et al Risk factors for antibiotic resistance in *Campylobacter spp.* isolated from raw poultry meat in Switzerland. *BMC Public Health* 2003; 39(3): 1-9
75. C. Gaudreau and H. Gilbert. Antimicrobial Resistance of *Campylobacter jejuni subsp. jejuni* Strains Isolated from Humans in 1998 to 2001 in Montré'al, Canada. *Antimicrob Agents And Chemother*. 2003;47:2027–2029
76. K.E. Smith, J.M. Besser, M.S. Craig et al. Quinolone-Resistant *Campylobacter jejuni* Infections in Minnesota, 1992–1998. *The New England J Medicine* 1999;340: 1525-1532
77. C. Gaudreau and H. Gilbert. Antimicrobial Resistance of Clinical Strains of *Campylobacter jejuni subsp. jejuni* Isolated from 1985 to 1997 in Quebec, Canada *Antimicrob Agents And Chemother*. 1998;42:2106–2108
78. J.-P. Butzler. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clin Microbiol Infect*, 2004;10:868–876

79. A. Gibreel, V. N. Kos, M. Keelan et al. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: molecular mechanism and stability of the resistance phenotype. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 2753–2759
80. J. Lin, M. Yan, O. Sahin et al. Effect of Macrolide Usage on Emergence of Erythromycin-Resistant *Campylobacter* Isolates in Chickens. *Antimicrob Agents And Chemother.* 2007;51: 1678–1686
81. J. Engberg, F. M. Aarestrup, D. E. Taylor et al. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerg. Infect. Dis.* 2001; 7: 24–34
82. D.E. Taylor and P. Courvalin. Mechanisms of Antibiotic Resistance in *Campylobacter* Species. 1988; 32: 1107-1112
83. M. Yan, O. Sahin, J. Lin et al. Role of the CmeABC efflux pump in the emergence of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* under selection pressure *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 1154–1159
84. C. Cagliero, C. Mouline, S. Payot et al. Involvement of the CmeABC efflux pump in the macrolide resistance of *Campylobacter coli*. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:948–950
85. S. Connell, D. Tracz, K.H. Neirhaus et al. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob Agents and Chemotherapy* 2003; 47: 3675–81
86. D.E. Taylor and A. Chau. Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40: 1–5.
87. A. Pratt and V. Korolik. Tetracycline resistance of Australian *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 452–460
88. D.J. Bacon, R.A. Alm, D.H. Burr. Involvement of a Plasmid in Virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infect Immun*, 2000;68:4384–4390
89. A. Senok, A. Yousif, W. Mazi et al. Pattern of Antibiotic Susceptibility in *Campylobacter jejuni* Isolates of Human and Poultry Origin. 2007; 60: 1-4
90. I. Nachamkin, H. Ung and M. Li. Increasing Fluoroquinolone Resistance in *Campylobacter jejuni*, Pennsylvania, USA, 1982–2001. *Emerg Infect Dis.* 2002;8: 1501-1503
91. L.E. Unicomb, J. Ferguson, R.J. Stafford et al. Low-Level Fluoroquinolone Resistance among *Campylobacter jejuni* Isolates in Australia. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 1368–1374

92. R. Öztürk, K. Midilli, K. Okyay ve ark. çocuk ve erişkin yaş grubu sürgün olgularında *C. jejuni* ve *C. coli* sıklığının araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 1994; 24: 42-5
93. B. Öngen, H. Nazik, I. Kaya. Rutin Dışkı Kültürlerinde Üretilen *Campylobacter* Türleri ve Antibiyotik Duyarlılıkları: 5 Yıllık Sonuçların Değerlendirilmesi. ANKEM Derg 2007;21:37-41
94. World Health Organization. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Fact sheet No125. Revised May 2005.
95. M. Starr, V. Bennet-Wodd, A.K. Bigham et al. Hemolytic uremic syndrome following urinary tract infection with Enterphaemorrhagic *Escherichia coli* case report adn review. Clin Infect Dis 1998;27:310-315
96. M. Miedouqe, J. Hacini, F. Grimant et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* urinary tract infection associated with hemolytic-uremic syndrome in an adult and possible adverse effect of ofloxacin therapy. Clin Infect Dis 2000;30:395-396
97. C.S. Wong, S. Jelacic et al. The Risk of The Hemolytic–Uremic Syndrome After Antibiotic Treatment og *Escherichia coli* O157:H7 Infections. The New England Journal of Medicine 2000;342:1930-1937
98. M.A. Karmali. Prospects for Preventing Serious Systemic Toxemic Complications of Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Infections Using Shiga Toxin Receptor Analogues The J Infect Dis 2004;189:355–359
99. W. Winn J.S. Allen, W. Janda et al. The *Enterobacteriaceae*. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Sixth edition. 2005;Chapter 6:235-249
100. M. Eklund, F. Scheutz, A. Siitonen. Clinical isolates of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli*: serotypes, virulance characteristics, and moleculer profiles of strain of the some serotype. J Clin Microbiol. 2001;39:2829-2834
101. R.P. Johson, R.C. Clarke, J.B. Wilson et al. Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes on verotoxigenic *Escherichia coli*. J Food Prot 1996;59:1112-1122
102. K. Ludwig, M. Bitzan, S. Zimmerman et al. Immune response ton on-O157 verotoxin-producing *Escherichia coli* in patients with hemolytic uremic syndrome. J Infect Dis 1996;174:1028-1039.

103. P. Boerlin, S.A. McEwen, F. Boerlin-Petzold et al. Associations between Virulence Factors of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Disease in Humans. *J Clin Microbiol.* 1999; 37:3497–503
104. J.T. Brooks, E.G. Sowers, J.G. Wells et al. Non-O157 Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Infections in the United States, 1983–2002 *J Infect Dis* 2005; 192:1422–1429
105. A. Caprioli, A.E. Tozzi. Epidemiology of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in continental Europe. In: Kapper JB, O'Brien AD, eds. *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E.coli* strains. Washington. DC: American Society for Microbiology Press, 1998:38-48 (google book)
106. S.C Kehl. Role of the Laboratory in the diagnosis of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infections. *J. Clin Microbiol* 2002;40:2711-2715
107. B. Sandra, M. Ratnam, S. Ratnam. Sorbitol-MacConkey Medium for Detection of *Escherichia coli* O157:H7 Associated with Hemorrhagic Colitis *J Clin Microbiol* 1986;23:869-872
108. E. Taş, N. Ardiç. Akut gastroenteritli olgularda termofilik *Campylobacter*, *Escherichia coli* O157:H7 ve Rotavirus sıklığı. *Klimik Dergisi* 2004; 17(3): 186-190
109. K.E. Smith, S.A. Stenzel, J.B. Bender. et al Outbreaks of enteric infections caused by multiple pathogens associated with calves at a farm day camp. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23: 1098–1104
110. D.N. Taylor, P. Echeverria, C. Pitarangsi et al. Influence of strain characteristics and immunity on the epidemiology of *Campylobacter* infections in Thailand. *J Clin Microbiol*, 1988; 26(5): 863-868
111. H.P. Endtz, J.H.M. Ruijs, A.H. Zwinderman et al. Comparison of six media, including a semisolid agar, for the isolation of various *Campylobacter* species from stool specimens. *J Clin Microbiol*, 1991; 29: 1007-1010
112. J.A. Kiehlbauch, D.J. Brenner, M.A. Nicholson et al. *Campylobacter butzleri* sp. nov. isolated from humans and animals with diarrheal illness. *J Clin Microbiol*, 1991; 29(2): 376-385
113. Clinical and Laboratory Standards Institute. Güç üreyen mikroorganizmalarda agar dilüsyon kullanarak minimum inhibitör konsantrasyonlarının (MIC) ($\mu\text{g/ml}$) doğruluğunu

- izlemek için kullanılan kalite kontrol suşları için kabul edilebilir sınırlar. Ocak 2006; 26(3): 150-153
114. P. Luber, E. Bartelt, E. Genschow et al. Comparison of broth microdilution, E Test, and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* J Clin Microbiol, 2003; 41(3): 1062–1068
115. B. Ge, B. Bodeis, R.D. Walker et al Comparison of the Etest and agar dilution for *in vitro* antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter* J Antimicrob Chemother 2002; 50, 487–494
116. U. Ledergerber, G. Regula, R. Stephan et al Risk factors for antibiotic resistance in *Campylobacter spp.* isolated from raw poultry meat in Switzerland. BMC Public Health 2003; 39(3): 1-9
117. Clinical and Laboratory Standards Institute (2004): Performance standarts for antimicrobial susceptibility testing. 15th informational supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
118. C. Zhao, B. Ge, J.D. Villena et al. Prevalence of *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the greater Washington, D.C., area. Appl Environ Microbiol, 2001; 67(12): 5431–5436
119. D. Linton, R.J. Owen, J. Stanley. Rapid identification by PCR of the genus *Campylobacter* and of five *Campylobacter* species enteropathogenic form human and animals. Res. Microbiol. 1996; 147: 707-718
120. www.cdc.gov
121. D. Coşkun, P. Göktaş, N. Ceran ve ark Hitit. Dışkıdan İzole Edilen Patojen Bakteriler ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Değerlendirilmesi. İnf Derg. 1998;12(4):481-484
122. M.Otkun. İzmir Bölgesinde ishallerde Dört Bakteriyel Etken: *Salmonella* türleri, *Shigella* türleri, Enteropatojen *Escherichia coli* ve Isıya Duyarlı Toksin Üreten Enterotoksijenik *Escherichia coli*. İnf Derg 1995;9(4):357-360
123. İ. Kaleli, M. Şengül, N. Özen ve ark. Gastroenteritli Olgularda *Escherichia coli* O157'nin Araştırılması. İnf Derg. 1999;13(2):235-238
124. <http://uepla.rshh.gov.tr>
125. Z. Aşçı, S. S. Kılıç, M. Yılmaz ve ark. Elazığ Yöresinde Diyareli Hastalarda *Campylobacter jejuni*'nin Yaygınlığı Üzerine Bir Araştırma. İnf Derg. 1989;3(4):511-518

126. M. Altındış, B. Kenar. Akut Gastroenteritli Olgularda *Campylobacter* Araştırılması. Türk Mikrobiol Cem Derg. 2002;32:43-47
127. G. Hasçelik Y. Akyön, S. Diker ve ark. *Campylobacter* Enteritis Among Turkish Children J Islamic Academy of Sciences 1989; 2(3): 201-203
128. K. Işık, Ş. Köse, N. Esen. Gastroenteritlerde *Campylobacter jejuni* Araştırması. İnf Derg. 1996;10(4):337-38
129. M. S. Yıldırım, Ş. A. Fazlı. Kayseri ve Yöresinde Bakteriyolojik Kültür İçin Gönderilen Dışkı Örneklerinde *Campylobacter*'lerin İzolasyonu ve İdentifikasyonu. İnf Derg. 1998;12(3):317-322
130. A. Gültekin, A. Gökalp, M.Z. Bakıcı ve ark. Sivas Yöresinde İshal Etkenleri. İnf Derg. 1987; 1(4): 239-246
131. O. Aktaş, E. Tuncel. Diyareli Hastalarda *Campylobacter jejuni* Yönünden Bir Araştırma. Mikrobiyol Bült 1987; 21: 79-85
132. Y. Akgün, M.E. Üstünel, T. Bolatlı. Eskişehir Bölgesi'nde *Campylobacter jejuni*'nin Gastroenterit Etiyolojisindeki Yeri. İnf Derg. 1989; 3(3): 365-373
133. E. Taş, N. Ardıç. Akut gastroenteritli olgularda termofilik *Campylobacter*, *Escherichia coli* O157:H7 ve Rotavirus sıklığı. Klimik Dergisi 2004; 17(3): 186-190
134. N. İnan, H. Erdoğan, L.Genç ve ark. Dışkı Örneklerinde Lökosit Varlığı ile Kültür Uyumunun Araştırılması. Klimik Derg 2003; 16(3):126-129
135. M.M. Feizabadi, S Dolatabadi and M.R. Zali. Isolation and Drug-Resistant Patterns of *Campylobacter* strains Cultured from Diarrheic Children in Tehran. Jpn. J.Infect. Dis.2007;60:217-219
136. A. Ateş-Yılmaz H.M. Tuğrul. Edirne'de İshal Etkenleri Arasında *Campylobacter* Türlerinin Yerinin ve Antimikrobiklere Duyarlılıklarının Araştırılması. İnfeksiyon Dergisi 2005;19: 53-59
137. M. Helms, J. Simonsen, K.E.P. Olsen et al. Adverse Health Events Associated with Antimicrobial Drug Resistance in *Campylobacter* Species: A Registry-Based Cohort Study. J Infect Dis2005;191:1050–1055
138. D.G.S. Burch. Risk Assessment – *Campylobacter* Infection Transmission From Pigs to Man Using Erythromycin Resistance as a Marker. The Pig Journal 2002;50:53-58.
139. A.S. Fairchild, J.L. Smith, U. Idris et al. Effects of Orally Administered Tetracycline on the Intestinal Community Structure of Chickens and on tet Determinant Carriage by

- Commensal Bacteria and *Campylobacter jejuni*. Appl Environ Microbiol 2005;71(10):5865-5872.
140. J. Engberg, F. M. Aarestrup, D. E. Taylor et al. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. Emerg. Infect. Dis. 2001;7:24–34
141. K.M. Shea. Antibiotic Resistance: What Is the Impact of Agricultural Uses of Antibiotics on Children's Health? Pediatrics. 2003;112:253-258.
142. FDA Veterinarian. July/August 2001;XVI:IV
143. 10.06.1996 tarih ve 22662 sayılı Resmi Gazete'de yayınlanan yemlik preparat ve mineral yemlerin satış ve tescil işlemlerinde uyulması gereken hususlar hakkındaki Tarım ve Köyşleri Bakanlığı'nın tebliği
144. T.G. Boyce, A.G. Pemberton, J.G. Wells et al. Screening for *Escherichia coli* O157:H7—a Nationwide Survey of Clinical Laboratories. J Clin Microbiol 1995;33(12): 3275–3277
145. M. Keskimaki, M. Saari, T. Heiskanen et al. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Finland from 1990 through 1997: Prevalence and Characteristics of Isolates. J Clin Microbiol.1998;36(12): 3641–3646
146. S. Erensoy, A. Tokbaş. İzmir'deki sürgün olgularında *Escherichia coli* O157:H7 Araştırılması. İnf Derg 1992;6(4): 285-286
147. F. Ekşi, T. Karslıgil, A. Bayram. Çocukluk Yaş Grubu İshallerinde *Escherichia Coli* O157:H7'nin Araştırılması. Van Tıp Derg 2007;14 (1):15-18
148. A. Arslantürk, P. Zarakolu, E. Güvener. Çocuk Yaş Grubu Akut Enterokolit Olgularında Etken Olarak *Escherichia coli* O157:H7 Serotipinin Araştırılması. Klimik Derg 1997; 10(3):122-124
149. V. Tolun, M. Anđ-Küçüker, Ş. Diren ve ark. Diyareli Hastalardan Alınan Dışkı Örneklerinde Verotoksijenik *Escherichia coli* (VTEC)'lerin PCR yöntemi ile Saptanması. Türk Microbiyol Cem Derg 2001;31: 174-177