



Broiler Karkaslarından İzole Edilen *Campylobacter jejuni* İzolatlarının Makrolid, Kinolon ve Tetrasiklin Grubu Antibiyotiklere Karşı Direnç Durumu*

Harun HIZLISOY¹, Hüseyin KILIÇ²

¹Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Melikgazi, 38039, Kayseri-TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Melikgazi, 38039, Kayseri-TÜRKİYE

Özet: Çalışmada Haziran 2012 ve Ocak 2013 dönemlerinde, Kayseri şehir merkezinde bulunan farklı satış noktalarında tüketime sunulan toplam 200 broiler karkasından *Campylobacter jejuni* izolasyonu ve izolatların makrolid, kinolon ve tetrasiklin antibiyotiklerine karşı direnç durumlarının fenotipik ve genotipik yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada but, göğüs, kanat ve bütün tavuk olmak üzere toplam 200 örnek incelendi. Örneklerden elde edilen izolatların identifikasyonu, fenotipik testler ve multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu (mPZR) ile gerçekleştirildi. *C. jejuni*'lerin antibiyotiklere direnç durumları disk difüzyon testi ile; MLK dağılımları ise E test ile saptandı. Aynı zamanda antibiyotiklere dirençlilikleri; PZR ve sekans analizi gibi moleküler yöntemlerle test edildi.

Haziran döneminde toplanan 100 örneğin 81'i, Ocak döneminde ise 100 örneğin 77'si *Campylobacter* spp. yönünden pozitif bulundu. mPZR testi sonucunda Haziran dönemindeki 124 izolatın 88'i; Ocak dönemindeki 109 izolatın 68'i *C. jejuni* olarak tespit edildi. Disk difüzyon testinde en yüksek direnç oranları, Haziran ve Ocak dönemleri için sırasıyla nalidiksik asit (%78.4-%92.6), siprofloksasin (%67.1-%86.7) ve tetrasikline (%55.6-%64.7) karşı, en düşük oranlar ise azitromisin (%1.1-%4.4), doksisiklin (%2.2-%1.4) ve eritromisine (%11.3-%4.4) karşı bulundu. E test sonuçları ile disk difüzyon testi sonuçlarının uyumlu olduğu belirlendi. Tetrasiklin direnci yönünden genomik tetO geni; Haziran ve Ocak döneminde sırasıyla %88 ve %85.7'inde gösterilirken; plazmid aracılı tetO geni izolatların %93.7 ve %85.7'sinde tespit edildi. Makrolid direncinde A2074C mutasyonuna izolatların hiçbirinde rastlanmazken; A2075G mutasyonuna Haziran ve Ocak dönemlerinde %18.4 ve %14.8 oranında rastlandı. Genomik kinolon direncinde gyrA geni üzerindeki mutasyonlar, Haziran ve Ocak dönemlerinde, izolatların %83.5 ve %81.8'inde tespit edilirken; plazmid aracılı kinolon direnci amacıyla incelenen qnr geni, izolatların hiçbirinde bulunmadı. PZR ile saptanan kinolon ve makrolid direnci, sekans analizi ile doğrulandı. Sekans analizinde kinolon dirençli izolatlarda Tre-86-ile mutasyonuna rastlanırken; duyarlı izolatlarda bu mutasyona rastlanmadı. Ayrıca, makrolid dirençli izolatlarda A2075G mutasyonu tespit edildi. Ancak, hiçbir izolatta A2074C mutasyonuna rastlanmadı. Duyarlı izolatların hiçbirinde de bu iki mutasyon görülmedi. Sonuç olarak; tavuk etindeki antibiyotiklere dirençli *C. jejuni* varlığı nedeniyle koruyucu tedbirlerin alınması, dar spektrumlu antibiyotik kullanımının tercih edilmesi ve antibiyotiklerin organizmadan atılma süreleri tamamlanmadan hayvanların kesilip tüketime sunulmaması, ayrıca tedavide ilk olarak tercih edilen eritromisine ilaveten azitromisinin ve doksisiklinin de alternatif olarak kullanılabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Broiler, *Campylobacter jejuni*, kinolon, makrolid, tetrasiklin

The Resistance State of *Campylobacter jejuni* Isolated from Broiler Carcasses Against to Macrolide, Quinolone and Tetracycline Groups of Antibiotics

Summary: In the study, in June 2012 and in January 2013, the isolation of *Campylobacter jejuni* from a total of 200 broiler carcasses in different sales points in the city center of Kayseri and the determination of resistance states to macrolides, quinolone and tetracycline groups of antibiotics by using phenotypical and genotypical methods were aimed.

Two hundred samples including chicken thigh, breast, wings and carcasses were examined in the study. The identification of the isolates obtained from samples were performed by phenotypical tests and multiplex Polymerase Chain Reaction (mPCR)

Geliş Tarihi / Submission Date : 28.08.2014

Kabul Tarihi / Accepted Date : 18.09.2014

* Bu araştırma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSD-12-3898 nolu proje ile doktora tezi olarak desteklenmiştir.

method. The antibiotic resistance and MIC values of *C. jejuni* isolates were detected with disk diffusion and E test method, respectively. In addition, the antibiotic resistances were tested by using of PCR and sequencing. Eighty-one of 100 samples collected in June and 77 of 100 samples in January were found to be positive in terms of *Campylobacter* spp. As a result of mPCR, 88 of 124 and 68 of 109 *Campylobacter* spp. isolates were identified as *C. jejuni* from during June and January terms, respectively. In disk diffusion test, while, the highest resistance rates were observed as nalidixic acid (78.4% - 92.6%), ciprofloxacin (67.1% - 86.7%) and tetracycline (55.6% - 64.7%), the lowest resistance rates as azithromycin (1.1% - 4.4%), doxycycline (2.2% - 1.4%) and erythromycin (11.3% - 4.4%), for the period June and January, were respectively found. It was determined that E test results were compatible with disk diffusion test. Whilst, chromosomal *tetO* gene was shown in June and January isolates at 88 % and 85.7 % rates, plasmid mediated *tetO* gene was found at 93.7% and 85.7% rates, respectively. In macrolide resistance, while A2075G mutation was detected in 23SrRNA at rates 18.4% and 14.8% of June and January isolates, A2074C mutation was not observed at any of June or January isolates, respectively. When, in chromosomal quinolone resistance, the mutations in *gyrA* gene were detected at rates of 83.5% and 81.8% in June and January isolates, respectively, *qnr* gene examined for plasmid mediated quinolone resistance was found in none of *C. jejuni* isolates. Quinolone and macrolide resistances detected by PCR were confirmed by DNA sequencing. While, Tre-86-Ile mutation was found in quinolone resistant isolates with sequencing, but these mutations were not detected in susceptible isolates. Additionally, A2075G mutation was detected in macrolide resistant isolates. However, A2074C mutation was observed in any isolates by using sequencing. It was not observed that none of the macrolide susceptible isolates had any of these two mutations. In conclusion, due to the presence of antibiotic resistant *C. jejuni* detected in chicken meat, protective measures should be taken for, the using of narrow-spectrum antibiotics may be preferred, animals treated with antibiotics, before the completion of withdrawal period of antibiotics from organisms, animals may not be slaughtered or supplied for consumption. Besides, it is considered that in the treatment, azythromycin and doxycycline may be used as alternate to erythromycin in the drug of choice.

Key Words: Broiler carcass, *Campylobacter jejuni*, macrolide, quinolone, tetracycline

Giriş

Kampilobakter türleri, *Eubacteria* grubuna bağlı *Protobacteria* sınıfındaki rRNA Süperfamilya VI içinde yer alan *Campylobacteriaceae* ailesinin bir üyesidir (37). Termofilik kampilobakterler, bu cins içerisinde yer alan insanlar ve birçok hayvan türünde bulunan mikroorganizmalardır. Bu grup etkenler içerisinde en sık rastlanan tür *Campylobacter jejuni*, daha az olarak *Campylobacter coli* ve en az da *Campylobacter lari*'dir (13). *C. jejuni*, daha çok kuşları, kanatlıları, kedileri ve köpekleri içeren çok sayıda vahşi ve evcil hayvanın barsaklarında komensal olarak bulunmaktadır. Etken, koyunlarda ve sığırlarda steriliteye ve abortlara neden olmaktadır (8, 12). *C.jejuni* insanlarda ise; ishal, ateş ve karın ağrısı v.b. semptomlarla karakterize akut enfeksiyona yol açar. Buna ilaveten *C.jejuni*, reaktif artrit ile Miller-Fisher ve Guillain-Barre sendromlarını da kapsayan nörolojik komplikasyonlara neden olmaktadır (11, 21). Kanatlı etleri, insan enfeksiyonlarının en önemli kaynağını oluşturmaktadır (12).

C. jejuni kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde, eritromisin en çok tercih edilen ilaçtır. Bununla birlikte; siprofloksasin, enterik patojenlere karşı sıklıkla kullanılan ve geniş spektrumlu etki gösteren antibiyotiklerdendir. Sistemik enfeksiyon vakalarında gentamisin ve tetrasiklinler kullanılmaktadır (3, 10). Kampilobakterlerde makrolidlere direnç, 23S rRNA üzerindeki ribozomal proteinlerin modifikasyonu (L4 ve L22) (39) ve bu bölgede şekillenen nokta

mutasyonu (A2074C ve A2075G mutasyonları, *Escherichia coli* numaralandırmasına göre A2058C ve A2059G mutasyonları) sonucu olmaktadır (18, 35). L4 ve L22 ribozomal proteinlerin değişmesi düşük seviyedeki makrolid direnci ile ilişkilidir (39). Makrolidin ribozoma bağlanamaması sonucu yüksek düzeyde direnç ortaya çıkar. Buna neden olan mutasyonlardan kampilobakter türlerinde eritromisin direncinde 23S rRNA geni üzerindeki (*rrnB* operonu) A2075G mutasyonuna daha sık rastlanır (18, 39). *C. jejuni* ve *C. coli* izolatlarında 23SrRNA geninin üç kopyası bulunur. Makrolid dirençli izolatlarda (özellikle eritromisin direncinde) kopyaların her üçü de sıklıkla mutasyona uğrar (39). Düşük makrolid MİK seviyesi bulunan izolatlarda genin etkilenme düzeyine bağlı olarak sadece iki gen kopyası mutasyona uğrayabilmektedir (18).

C. jejuni'deki kinolon direnci *gyrA* genindeki kinolon direncini belirleyen bölge (QRDR)'deki spesifik nokta mutasyonu aracılığıyla gerçekleşir (18). Kampilobakter türlerinde Thr-86-İle, Asp90Asn, Thr86Lys, Thr86Ala, Thr86Val ve Asp90Tyr mutasyonlarına rastlanmaktadır (39). Thr-86-İle (C256T) mutasyonu en sık rastlanan mutasyondur (18). Bu mutasyon yüksek seviyedeki nalidiksik asid ve siprofloksasin direnciyle ilişkilidir (18, 35).

C. jejuni'de tetrasiklin direnci tetrasiklinlerin ribozomlar üzerindeki hedeflerinin değişmesi ve efluks pompası olmak üzere iki şekildedir (18). Tetrasiklin direncine efluks pompası ve ribozomla ilişkili gen-

leri kapsayan, bakteri cinsleri arasında aktarılan bir grup *tet* determinantı aracılık eder. Tetrasiklin efluksunun mekanizmasında bakteri hücrelerinden tetrasiklinleri aktif olarak dışarı atan *tetO* gibi membran proteini görev almaktadır (35).

Bu çalışmada; Haziran 2012 ve Ocak 2013 dönemlerinde, Kayseri Şehir merkezinde bulunan farklı satış noktalarında taze olarak tüketime sunulan broiler karkaslarından *C. jejuni* izolasyonu ve izolatların makrolid, kinolon ve tetrasiklin antibiyotiklerine karşı direnç durumlarının fenotipik (Disk difüzyon testi ve E test) ve genotipik yöntemler ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışmada, 2012 yılı Haziran ayında Kayseri ilindeki 24 farklı market ve tavuk satış yerlerinden 100 paket (25'er paket tüm karkas, but, kanat ve göğüs eti) ve 2013 yılı Ocak ayında Kayseri ilindeki 21 farklı market ve tavuk satış yerlerinden 100 paket (25'er paket tüm karkas, but, kanat ve göğüs eti) olmak üzere iki dönem içerisinde alınan toplam 200 paket tavuk eti örneği *Campylobacter* spp. izolasyonu amacıyla kullanıldı.

1. *Campylobacter* spp. İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Tavuk eti örneklerinden kampilobakter türlerinin izolasyonunda ISO (ISO, 10272) (19) yönteminden yararlanıldı. *Campylobacter* spp. izolatlarının identifikasyonunda Wang ve ark. (38)'nin bildirdiği PZR koşulları ve primerler kullanıldı. Bu yöntemde *Campylobacter fetus* ve *Campylobacter upsaliensis* primerleri çıkarılarak bazı modifikasyonlar yapıldı. İdentifikasyonda *C. jejuni* için *hipO*, *C. coli* ve *C. lari* için *glyA* ve internal kontrol için 23S rRNA gibi sadece dört çift primer kullanıldı (Tablo 1). Çalışmada *C. jejuni* identifikasyonu ve izolatlarının antibiyotik dirençlerinin moleküler yöntemle araştırılmasında kullanılan primerler (Sentromer, İstanbul), Tablo 1'de verildi. Çalışmada kullanılan plazmid ve kromozomal DNA'lar ise plazmid DNA ekstraksiyon kiti (Genedirex MiniPrep Plazmid Ekstraksiyon kiti, 100 test Nevada, ABD) ve kromozomal DNA (UltraClean DNA extraction kit, 50 test Mobio 12224-50, ABD) ekstraksiyon kiti kullanılarak üretici firmaların direktifleri doğrultusunda çıkarıldı.

Makrolid Direnci Sekans Sonuçları
Sekans analiz sonuçları, Sequencing Analysis version

Tablo 1. PZR yöntemlerinde kullanılan primerler ve beklenen baz büyüklükleri

Primer	Baz dizilimi 5'-3'	Baz büyüklüğü (bp)	Kaynak
Primer-I (CJF)	5'- ACTTCTTTATTGCTTGCTGC - 3'	323 bp	39
Primer-II (CJR)	5'- GCCACAACAAGTAAAGAAGC - 3'	323 bp	39
Primer-I (CCF)	5'- GTAAAACCAAAGCTTATCGTG -3'	126 bp	39
Primer-II (CCR)	5'- TCCAGCAATGTGTGCAATG -3'	126 bp	39
Primer-I (CLF)	5'- TAGAGAGATAGCAAAAAGAGA -3'	251 bp	39
Primer-II (CLR)	5'- TACACATAATAATCCCACCC -3'	251 bp	39
23SrRNA-F	5'- TATACCGGTAAGGAGTGCTGGAG-3'	650 bp	39
23SrRNA-R	5'- ATCAATTAACCTTCGAGCACCG -3'	650 bp	39
DMT1 (TetOF)	5'- GGCGTTTTGTTTATGTGCG-3'	559 bp	14
DMT2 (TetOR)	5'- ATGGACAACCCGACAGAAGC-3'	559 bp	14
23SRNA-F	5'-TTAGCTAATGTTGCCCGTACCG-3'	697 bp	4
23SRNA-R	5'-AGCCAACCTTTGTAAGCCTCCG-3'	697 bp	4
ERY2074-R	5'-AGTAAAGGTCCACGGGGTCTGG -3'	485 bp	4
ERY2075-R	5'-TAGTAAAGGTCCACGGGGTCTGC-3'	485 bp	4
GZgyrA5	5'-ATTTTTAGCAAAGATTCTGAT- 3'	673 bp	44
GZgyrA6	5'-CCATAAATTATCCACCTGT-3'	673 bp	44
CampyMAMAgyrA1-F	5'-TTT TTAGCAAAGATTCTG AT- 3'	265 bp	44
CampyMAMAgyrA5 R	5'-CAAAGC ATCATAAACTGC AA- 3'	265 bp	44
QP1	5'-GATAAAGTTTTTCAGCAAGAGG-3'	593 bp	20
QP2	5'- ATCCAGATCGGCAAGGTTA-3'	593 bp	20
GZgyrA7	5'- TTATTATAGGTCTGCTTTG-3'	Sekans	44
GZgyrA8	5'- TAGAAGGTAAAACATCAGTT-3'	Sekans	44
23SRNA-F	5'-TTAGCTAATGTTGCCCGTACCG-3'	Sekans	4
23SRNA-R	5'-AGCCAACCTTTGTAAGCCTCCG-3'	Sekans	4

2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Disk Difüzyon Testi

İzolasyon ve identifikasyon testleri sonunda *C. jejuni* olarak identifiye edilmiş izolatlarının eritromisin (15 µg), azitromisin (15 µg), tilosin (30 µg), enrofloksasin (5 µg), nalidiksik asit (30 µg), levofloksasin (5 µg), siprofloksasin (5 µg), tetrasiklin (30 µg), oksitetrasiklin (30 µg) ve doksisisiklin (30 µg) (Bioanalyse, Türkiye) antibiyotiklerine duyarlılıkları, disk difüzyon testi ile belirlendi (7). Test sonunda oluşan inhibisyon zon çapları ölçülerek CLSI 2010 (9) kriterlerine göre değerlendirildi.

E test

C. jejuni izolatlarının eritromisin, azitromisin, enrofloksasin, nalidiksik asit, levofloksasin, siprofloksasin, tetrasiklin, oksitetrasiklin ve doksisisiklin (Liofilchem, İtalya) antibiyotiklerine karşı MİK değerleri E test yöntemi ile belirlendi. Test sonunda belirlenen değerler kaydedildi. Sonuçların değerlendirilmesinde CLSI 2010 (9) esas alındı.

3. Antibiyotik direncinin moleküler yöntemlerle gösterilmesi

Genomik ve plazmid kaynaklı tetrasiklin direncinin incelenmesi amacıyla *tetO* geninin tespitinde Gibreel ve ark.(14), makrolid direncinin incelenmesinde ERY2074 ve ERY2075 mutasyonlarının tespiti için Alonso ve ark.(4)'nın bildirdiği PZR reaksiyonları uygulandı. Kinolon direncinin ortaya çıkarılmasında ilk olarak *gyrA* geninin bulunduğu QRDR (Quinolone Resistance Determining Region, Kinolon direncini belirleyen bölge) gösterildi. Daha sonra genomik kinolon direncinin incelenmesinde *C. jejuni*'nin *gyrA* genindeki mutasyonların tespiti için çeşitli modifikasyonlar yapılarak (43), MAMA-PZR reaksiyonu uygulandı. *C. jejuni* izolatlarında plazmid ile taşınan kinolon direnç geni (*qnr*) PZR yöntemine göre araştırıldı (20).

4. Sekans Analizi

C. jejuni izolatlarının sekans analizi Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı tarafından yapıldı. Tüm sekans sonuçları, Sequencing Analysis version 5.3 ile analiz edildi ve BLAST ile GenBank'da referans sekanslarla karşılaştırıldı.

5. İstatistiksel Analiz

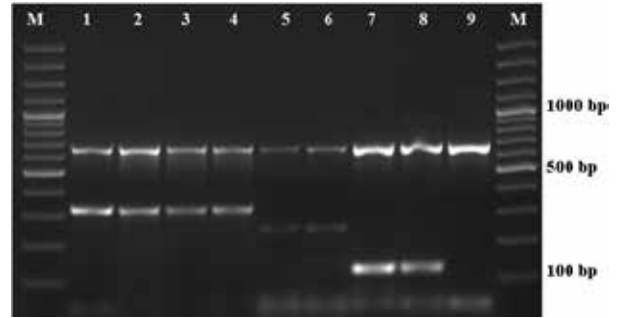
Çalışmada istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences for Windows) 14.01 (Serial: 9869264) paket programı kullanıldı. Haziran ve Ocak dönemlerine göre elde edilen niteliksel verilerin istatistiksel karşılaştırmasında Ki-kare (X^2) testi kullanıldı (34).

Bulgular

1. İzolasyon ve İdentifikasyon bulguları

Haziran 2012 döneminde alınan 100 adet örneğin 81'i (%81) fenotipik testlerle *Campylobacter* spp. yönünden pozitif olarak tespit edildi. Bu 81 pozitif örnekten 124 adet *Campylobacter* spp. izolatu elde edildi. Ocak 2013 döneminde 100 adet örneğin 77'si (%77) *Campylobacter* spp. yönünden pozitif bulundu. Bu 77 örnekten 109 adet *Campylobacter* spp. izolatu elde edildi. Haziran ve Ocak dönemlerinde *Campylobacter* spp. görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmadı (X^2 : 0.482; $P>0.05$).

Yapılan mPZR testleri (Şekil 1.) sonunda Haziran dönemine ait 124 izolatu, 88 (%70.9)'i *C. jejuni*, 36 (%29.1)'si *C.coli* olarak tespit edilirken, Ocak dönemine ait 109 izolatu, 68 (%62.4)'i *C. jejuni*, 39 (%35.8)'u *C. coli* ve 2 (%1.8)'si de *C.lari* olarak tespit edildi. Haziran ve Ocak aylarında *Campylobacter* spp. izolatları arasında *C. jejuni* görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmadı (X^2 : 1.93; $P>0.05$).



Şekil 1. *Campylobacter* spp. izolatlarının mPZR sonuçlarının %1.5'lik agaroz jeldeki görüntüsü. M:100 bp plus DNA ladder, 1, 2, 3, 4: *C. jejuni* izolatları (323 bp), 5,6: *C. lari* izolatları (251 bp), 7,8: *C. coli* izolatları (126 bp), 9: Genus pozitif tür negatif örnek (650 bp).

2. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları

Haziran dönemine ait 88 ve Ocak dönemine ait 68 *C. jejuni* izolatının disk difüzyon testi sonuçları Tablo 2.'de gösterildi.

Tablo 2. Antibiyotik duyarlılık test sonuçları ve dönemlere göre istatistik karşılaştırmaları

Antibiyotik	Dönemler	S (%)	I (%)	R (%)	Ki kare	İstatistik
					(χ^2)	önem
					değeri	kontrolü
Eritromisin	Haziran*	58 (65.9)	20 (22.7)	10 (11.4)	2.893	P>0.05
	Ocak**	45 (66.2)	20 (29.4)	3 (4.4)		
Azitromisin	Haziran*	87 (98.9)	0 (0)	1 (1.1)	1.647	P>0.05
	Ocak**	65 (95.6)	0 (0)	3 (4.4)		
Tilosin	Haziran*	4 (4.5)	48 (54.5)	36 (40.9)	2.262	P>0.05
	Ocak**	6 (8.8)	30 (44.1)	32 (47.1)		
Enrofloksasin	Haziran*	19 (21.6)	18 (20.5)	51 (58.0)	6.816	P<0.05
	Ocak**	5 (7.4)	21 (30.9)	42 (61.8)		
Nalidiksik asit	Haziran*	17 (19.3)	2 (2.3)	69 (78.4)	7.634	P<0.05
	Ocak**	3 (4.4)	2 (2.9)	63 (92.6)		
Levofloksasin	Haziran*	31 (35.2)	9 (10.2)	48 (54.5)	2.497	P>0.05
	Ocak**	16 (23.5)	8 (11.8)	44 (64.7)		
Siprofloksasin	Haziran*	23 (26.1)	6 (6.8)	59 (67.0)	9.565	P<0.01
	Ocak**	5 (7.4)	4 (5.9)	59 (86.8)		
Tetrasiklin	Haziran*	38 (43.1)	1 (1.1)	49 (55.6)	6.817	P<0.05
	Ocak**	19 (27.9)	5 (7.3)	44 (64.7)		
Oksitetrasiklin	Haziran*	40 (45.5)	12 (13.6)	36 (40.9)	0.894	P>0.05
	Ocak**	28 (41.2)	13 (19.1)	27 (39.7)		
Doksisiklin	Haziran*	76 (86.4)	10 (11.4)	2 (2.3)	0.870	P>0.05
	Ocak**	62 (91.2)	5 (7.4)	1 (1.5)		

*: n= 88, **: n=68, **S:** Duyarlı, **I:** Orta duyarlı, **R:** Dirençli

Haziran ve Ocak dönemlerine ait *C. jejuni* izolatları arasında test edilen antibiyotiklerden eritromisin, azitromisin, tilosin, levofloksasin, oksitetrasiklin ve doksisikline karşı duyarlılık açısından fark istatistiksel olarak önemli bulunmadı (P>0.05). Ancak Haziran dönemine ait *C. jejuni* izolatlarının Ocak dönemindeki izolatlara göre enrofloksasin, nalidiksik

asit, tetrasiklin (P<0.05) ve siprofloksasin (P<0.01) antibiyotiklerine karşı istatistiksel olarak önemli derecede duyarlı oldukları tespit edildi.

Haziran ve Ocak dönemi izolatlarına ait Mik dağılımlarını belirlemek üzere yapılan E test sonuçlarının disk difüzyon testi sonuçları ile uyumlu olduğu ortaya çıktı. E test sonunda, disk difüzyon testi ile

dirençli olarak bulunan izolatların tamamı aynı şekilde dirençli olarak bulundu.

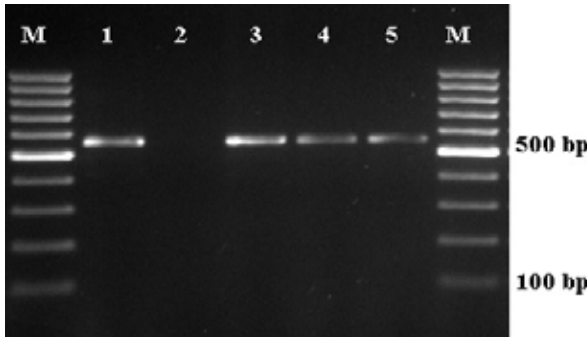
Tetrasiklin Direnç Durumunun İncelenmesi

C. jejuni'nin genomik tetrasiklin direnci ilgili PZR

(Şekil 2.) sonuçları Tablo 3.'de gösterildi. Haziran ve Ocak dönemlerine ait *C. jejuni* izolatları arasında genomik *tetO* geni bulunma oranları arasındaki fark önemli bulunmadı (Genomik direnç için: X^2 : 0.113; $P>0.05$; Plazmid direnci için: X^2 : 0.958; $P>0.05$).

Tablo 3. Haziran 2012 ve Ocak 2013 dönemlerine ait genomik *tetO* geni PZR sonuçları

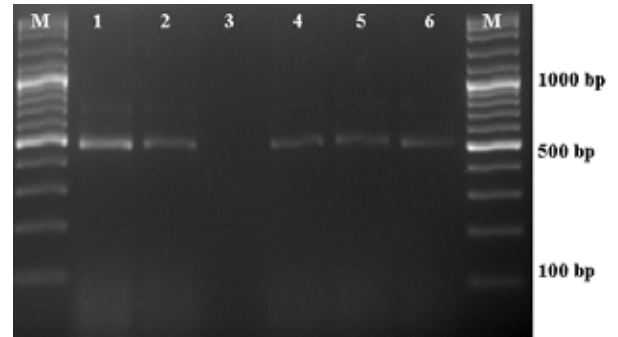
Dönemler	Direncin kaynağı	Numune Sayısı	Pozitif sonuç (%)	Negatif sonuç (%)
Haziran 2012	Genomik	50	44 (88)	6 (12)
	Plazmid	32	30 (93.7)	2 (6.2)
Ocak 2013	Genomik	49	42 (85.7)	7 (14.2)
	Plazmid	21	18 (85.7)	3 (14.2)



Şekil 2. Tetrasiklin direncinin %1.5'lik agaroz jeldeki görüntüsü. M:100 bp DNA ladder, 2: Negatif kontrol (steril distile su), 1, 3, 4, 5: Pozitif örnekler (559 bp).

Makrolid Direnç Durumunun İncelenmesi

C. jejuni'nin makrolid direnci ile ilgili her iki döneme ait *C. jejuni* izolatlarında A2074C mutasyonuna rastlanmazken; Haziran dönemine ait 7 (%18.4) ve Ocak dönemine ait 4 (%14.8) izolatta A2075G mutasyonu (Şekil 3.) tespit edildi. Haziran ve Ocak dönemlerine ait *C. jejuni* izolatları arasında A2075G mutasyonu bulunma oranları arasındaki fark önemli bulunmamıştır (X^2 : 0.146; $P>0.05$).



Şekil 3. Makrolid direncinin %1.5'lik agaroz jeldeki görüntüsü. 1, 2, 4, 5, 6: Pozitif örnek (485 bp). M:100 bp DNA ladder. 3: Negatif kontrol (steril distile su).

Kinolon Direnç Durumunun İncelenmesi

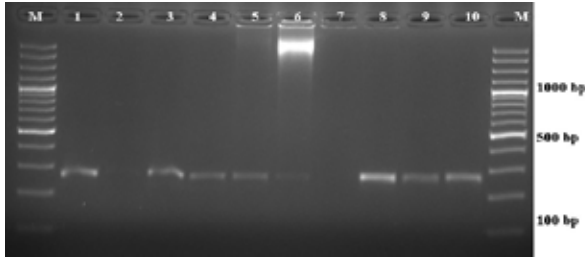
İlk olarak *C. jejuni* izolatlarına ait QRDR'si PZR ile gösterildi. PZR testleri sonunda Haziran 2012 dönemine ait 64 (%87.6) ve Ocak 2013 dönemine ait 60 (%90.9) izolatın QRDR varlığı yönünden pozitif olduğu saptandı (X^2 : 0.377; $P>0.05$).

Genomik Kinolon Direncinin İncelenmesi

Genomik kinolon direnci ile ilgili PZR (Şekil 4.) sonuçları Tablo 4.'de gösterildi (X^2 : 0.074; $P>0.05$).

Tablo 4. Haziran 2012 ve Ocak 2013 dönemlerine ait genomik kinolon direnci PZR sonuçları

Dönemler	Numune Sayısı	Pozitif sonuç (%)	Negatif sonuç (%)
Haziran 2012	73	61 (83.5)	12 (16.4)
Ocak 2013	66	54 (81.8)	12 (18.1)
Toplam	139	115 (82.7)	24 (17.3)



Şekil 4. Genomik kinolon direncinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. M:100 bp DNA ladder, 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10: Pozitif örnek (265 bp), 2: Negatif kontrol (steril distile su), 7: Negatif örnek.

Plazmid Aracılı Kinolon Direncinin İncelenmesi

Çalışmada plazmid aracılı kinolon direncini

belirleyen *qnr* geni, *C. jejuni* izolatlarının hiçbirinde bulunmadı.

3. DNA Sekans Analizi Sonuçları

Kinolon Direnci Sekans Sonuçları

Sekans analiz sonuçları, Sequencing Analysis version 5.3 ile analiz edildi ve BLAST ile GenBank'da referans sekanslarla karşılaştırıldı. Analiz edilen 8 izolata ait sekans aralıkları ve mutasyonlar Tablo 5.'de verildi. Sekans analizi sonunda dirençli izolatlarda öncelikle 86. aminoasitte treonin, izolösün (C-T) mutasyonuna rastlanırken, 3 duyarlı izolatta bu mutasyona rastlanmadı. Ayrıca dirençli ve duyarlı izolatlarda diğer aminoasitlerde (81., 119., 120. ve 121.) mutasyonların varlığı tespit edildi.

Tablo 5. Kinolon dirençli izolatlardaki sekans analizinin değerlendirme tablosu

SEKANS ARALIĞI	ÖRNEK NO	SEKANS	MUTASYON
76-91	5	GTTATAGGTCGTTATCA <u>T</u> CCACATGGAGATA <u>T</u> AGCAGTTTATGATGCTTT	81= CAC-CAT, 86=ACA-ATA
	16	GTTATAGGTCGTTATCA <u>T</u> CCACATGGAGATA <u>T</u> AGCAGTTTATGATGCTTT	81= CAC-CAT, 86=ACA-ATA
	19	GTTATAGGTCGTTATCACCCACATGGAGATA <u>T</u> AGCAGTTTATGATGCTTT	86=ACA-ATA
	24	GTTATAGGTCGTTATCA <u>T</u> CCACATGGAGATA <u>T</u> AGCAGTTTATGATGCTTT	81= CAC-CAT, 86=ACA-ATA
	31	GTTATAGGTCGTTATCA <u>T</u> CCACATGGAGATA <u>T</u> AGCAGTTTATGATGCTTT	81= CAC-CAT, 86=ACA-ATA
	34	GTTATAGGTCGTTATCACCCACATGGAGATACAGCAGTTTATGATGCTTT	YOK
	39	GTTATAGGTCGTTATCA <u>T</u> CCACATGGAGATACAGCAGTTTATGATGCTTT	81= CAC-CAT
	40	GTTATAGGTCGTTATCACCCACATGGAGATACAGCAGTTTATGATGCTTT	YOK
110-125	5	AAGGCAACTTTGGATCTATAGATGGTGATAG <u>C</u> G <u>C</u> IGCTGCGATGCGTTAT	119:AGT-AGC 120:GCC-GCT
	16	AAGGCAACTTTGGATCTATAGATGGTGATAG <u>C</u> G <u>C</u> IGCTGCGATGCGTTAT	119:AGT-AGC 120:GCC-GCT
	19	AAGGCAACTTTGGATCTATAGATGGTGATAGTCCGCTGCGATGCGTTAT	YOK
	24	AAGGCAACTTTGGATCTATAGATGGTGATAG <u>C</u> G <u>C</u> IGCTGCGATGCGTTAT	119:AGT-AGC 120:GCC-GCT
	31	AAGGCAACTTTGGATCTATAGATGGTGATAG <u>C</u> G <u>C</u> IG <u>C</u> CGCGATGCGTTAT	119:AGT-AGC 120:GCC-GCT 121: GCT-GCC
	34	AAGGCAACTTTGGATCTATAGATGGTGATAGTCCGCTGCGATGCGTTAT	YOK
	39	AAGGCAACTTTGGATCTATAGATGGTGATAG <u>C</u> G <u>C</u> IGCTGCGATGCGTTAT	119:AGT-AGC 120:GCC-GCT
	40	AAGGCAACTTTGGATCTATAGATGGTGATAG <u>C</u> GCCGCTGCGATGCGTTAT	119:AGT-AGC

Makrolid Direnci Sekans Sonuçları

Sekans analiz sonuçları, Sequencing Analysis version 5.3 ile analiz edildi ve BLAST ile GenBank'da referans sekanslarla karşılaştırıldı. Analiz sonucu 13 izolata ait sekans aralıkları ve mutasyonlar Tablo 6.'da gösterildi. Sekans analizi

sonucunda test edilen dirençli izolatlar arasında A2075G (A-G) mutasyonu tespit edilirken hiçbir izolatta A2074C (A-C) mutasyonuna rastlanmadı. Duyarlı izolatların hiçbirinde de bu iki mutasyona rastlanmadı. Ayrıca bir izolatta C2066A ve G2086C mutasyonları tespit edildi.

Tablo 6. Makrolid dirençli izolatlardaki sekans analizinin değerlendirme tablosu

ÖRNEK NO	SEKANS ARALIĞI 2036-2105bp	MUTASYON
1	AGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAGAGACCCCGTGG ACCTTTACTACAGCTTGAC	2075
3	AGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAGAGACCCCGTGG ACCTTTACTACAGCTTGAC	2075
4	AGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGAAGACGGAAAGACCCCGTGG ACCTTTACTACAGCTTGAC	2066 - 2086
11	AGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAAGACCCCGTGG ACCTTTACTACAGCTTGAC	YOK
12	AGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAGAGACCCCGTGG ACCTTTACTACAGCTTGAC	2075
14	AGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAGAGACCCCGTGG ACCTTTACTACAGCTTGAC	2075
15	AGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAAGACCCCGTGG ACCTTTACTACAGCTTGAC	YOK
16	AGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAAGACCCCGTGG ACCTTTACTACAGCTTGAC	YOK
17	AGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAGAGACCCCGTGG ACCTTTACTACAGCTTGAC	2075
18	AGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAAGACCCCGTGG ACCTTTACTACAGCTTGAC	YOK
19	AGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAAGACCCCGTGG ACCTTTACTACAGCTTGAC	YOK
20	AGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAAGACCCCGTGG ACCTTTACTACAGCTTGAC	YOK
21	AGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAAGACCCCGTGG ACCTTTACTACAGCTTGAC	YOK

Tartışma ve Sonuç

Campylobacter jejuni, kanatlı hayvanların bağırsak normal flora üyesidir. Mezbahada kesim sırasında kanatlı karkasları bu bakteri ile kontamine olmakta ve kontamine karkasların tüketimi sonucunda insanlarda çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır (6). Bu hastalıkların tedavisinde çok sayıda antibiyotik kullanılmaktadır. Son yıllarda, özellikle gelişmiş ülkelerde olmak üzere *C. jejuni*'nin, birden çok antibiyotiğe karşı direnç geliştirdiği gözlenmektedir (3).

Bu çalışmada, Haziran dönemine ait 124 izolatın %70.9'u, Ocak dönemine ait 109 izolatın %62.4'ü *C. jejuni* olarak tespit edildi. *C. jejuni*'nin prevalansına ilişkin Williams ve Oyarzabal (40), 2005 ile 2011 yılları arasında gıda satış yerlerinden toplanan 755 broiler et örneklerinden elde edilen izolatların %66'sını *C. jejuni* olarak tanımlamışlardır. Mansouri-najand ve ark. (25), 90 tavuktan alınan örneklerin 68 (%75,6)'i *Campylobacter* spp. yönünden pozitif bulmuşlardır. Çalışmada, 41 (%60,3) *C. jejuni* izolatı tespit etmişlerdir. Yıldırım ve ark. (42)'nin bildirdiği çalışmada broiler dışkı örneklerinden ve

karkaslarından elde edilen izolatların %92.2'sinin *C. jejuni* olduğu rapor edilmiştir. Çalışmamızdaki izolasyon ve identifikasyon oranlarından düşük (40), sonuçlarımızla uyumlu (26) ve sonuçlarımızdan yüksek sonuç veren çalışmalar (42) bulunmaktadır. Bu çalışmalar arasındaki farklılıklar mevsimsel aktivite (33), seçilen izolasyon yöntemi (16), izolasyonda kullanılan besiyeri (5), izole edilen hayvanların durumu (33), identifikasyon yönteminin seçimi (24), bölgesel farklılıklar (32) ve işletmeler arasındaki hijyen farklılığından (27) kaynaklanıyor olabilir.

Bu çalışmada Haziran ve Ocak dönemlerine ait izolatların, enrofloksasin (%58-%61.8), nalidiksik asit (%78.4-%92.6), levofloksasin (%54.5-%64.7) ve siprofloksasin (%67-%86.8) antibiyotiklerine karşı direnç gösterdiği tespit edilmiştir. *C. jejuni* izolatlarının kinolon grubu antibiyotik direncine ilişkin, Rahimi ve Ameri (31), *C. jejuni* izolatlarında % 54 oranında nalidiksik aside, %49.7 oranında siprofloksasine ve %11.8 oranında enrofloksasine karşı direnç tespit etmişlerdir. Rodrigo ve ark. (32), kampilobakter izolatlarının siprofloksasine karşı %86.6 oranında direnç gösterdiğini bildirmişlerdir. Yurdumuzdan Gür ve ark.(15)'nin çalışmalarında kampilobakter izolatlarının tümü kinolonlara duyarlı bulunurken, Akan ve ark. (2), 119 kampilobakter izolatının sadece birinde kinolon direnci saptamıştır. Abay ve ark. (1), insan ve kanatlılardan izole edilen *C. jejuni* izolatlarının nalidiksik asit, siprofloksasin ve enrofloksasin antibiyotiklerine dirençlerini sırasıyla %84-95, %81-93 ve %85-88 oranlarında tespit etmişlerdir.

Sunulan bu çalışmada kinolon grubu antibiyotikler açısından E test sonuçlarının disk difüzyon testi sonuçları ile uyumlu olduğu ortaya çıkmıştır. Uzunovic-Kamberovic ve ark. (36), siprofloksasin direnci insanlarda, kanatlı etlerinde ve kanatlılarda yüksek oranlarda (%32.1, %23.5, %26.7) saptanmıştır. Siprofloksasin dirençli *C. jejuni* izolatlarının tamamında MİK değeri, ≥ 32 µg/ml olarak bulunmuştur. Yıldırım ve ark. (42)'nin çalışmalarında izole edilen 60 *C. jejuni* izolatının E test yöntemine göre %78.8'i siprofloksasine, %49.4'ü enrofloksasine dirençli olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda olduğu gibi bu çalışmada da disk difüzyon ve E test yöntemleri arasında büyük bir uyum bulunmaktadır.

Çalışmada genomik kinolon direnci sonuçları Haziran döneminde %83.5, Ocak döneminde ise %81.8 olarak tespit edildi. Plazmid aracılı kinolon direnci amacıyla *qnr* geni, *C. jejuni* izolatlarının hiç birinde bulunamadı. Sekans analizi sonunda dirençli izolatlarda öncelikle 86. aminoasitte treonin (ACA), izölösün (ATA) mutasyonuna rastlanırken üç duyarlı izolatta bu mutasyona rastlanmadı. Ayrıca dirençli ve duyarlı izolatlarda diğer aminoasitlerde

(81., 119., 120. ve 121.) mutasyonların varlığı tespit edildi.

Zirnstein ve ark. (43), siprofloksasin dirençli 13 ve duyarlı 20 *C. jejuni* izolatında QRDR'nin varlığını PZR ile, bu bölgede yer alan *gyrA* bölgesindeki mutasyonları MAMA-PZR ile incelemiştir. Mutasyonların doğrulanması amacıyla DNA sekans analizi yapmışlardır. Testler sonucunda siprofloksasin dirençli izolatların çoğunda Treonin-86-İzölösün (Tre-86-İzo) mutasyonu bulunduğunu bildirmişlerdir. Yurdumuzda *Campylobacter* spp.'lerde kinolon direncinin moleküler yöntemle araştırıldığı bir poster bildirisi dışında (22) herhangi bir çalışma mevcut değildir. Çalışma sonuçlarına uyumlu (14) ya da farklı oranlara sahip çalışmalar (26, 29) bulunmaktadır. Bu farklılıkların, kullanılan yöntem ya da mikroorganizmada kinolon direncine neden olan mekanizmanın farklı olmasına bağlı olduğu düşünülmektedir (18).

Bu çalışmada Haziran ve Ocak döneminde ait izolatların; eritromisin (%11.4-%4.4), azitromisin (%1.1-%4.4) ve tilosin (%40.9-%47.1) antibiyotiklerine karşı direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Rahimi ve Ameri (31) izole edilen *C. jejuni*'lerin %1.2'sinin eritromisine dirençli olduğunu bildirmiştir. Haruna ve ark. (17), *C. jejuni* izolatlarının tamamının eritromisine duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir. Luber ve ark. (23) eritromisin direncini %6,1 oranında bulmuşlardır. Ülkemizden Öztürk ve ark. (30) %5.2 oranında, Abay ve ark. (1), insan ve kanatlı orijinli *C. jejuni* izolatlarında eritromisin direncini sırasıyla %6 ve %7 oranında tespit etmişlerdir. Mevcut farklılıkların test edilen mikroorganizmanın fenotipik ve genotipik özelliklerine (41) bağlı olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada makrolid grubu antibiyotikler açısından E test sonuçlarının disk difüzyon testi sonuçları ile uyumlu olduğu ortaya çıkmıştır. Uzunovic-Kamberovic ve ark. (36) tarafından insan, kanatlı eti ve kanatlılardan izole edilen kampilobakterlerin eritromisine dirençleri sırasıyla %26.4, %35.3, %26.7 olarak belirlenmiştir. Eritromisin dirençli *C. jejuni* izolatlarının %94.4'ünde MİK değerleri, ≥ 128 µg/ml olarak bulunmuştur (36).

Haziran ve Ocak dönemlerine ait *C. jejuni* izolatlarında A2074C mutasyonuna rastlanmazken; Haziran 2012 dönemine ait yedi (%18.4) ve Ocak 2013 dönemine ait dört (%14.8) izolatta A2075G mutasyonu tespit edilmiştir. Mutasyonların doğrulanması amacıyla makrolidlere dirençli 6 ve duyarlı 7 toplam 13 izolata DNA sekans analizi yaptırılmıştır. Sekans analizi sonucunda test edilen dirençli izolatlar arasında A2075G mutasyonu tespit edilirken; PZR testleriyle uyumlu olarak hiçbir izolatın sekans analizinde A2074C mutasyonuna rastlanmamıştır. Keza; duyarlı izolatların hiçbirinde de bu iki mutasyona rastlanmamıştır. Alonso ve ark.

(4)'nün bildirdiği çalışmada, insan, gıda ve hayvan kaynaklı 20 *C. jejuni* izolatının 17'sinde eritromisin direnci tespit edilmiş, izolatların tamamında A2075G mutasyonu gözlenirken; A2074C mutasyonuna rastlanmamıştır. Ayrıca eritromisine duyarlı izolatların hiçbirinde bu iki mutasyon gözlenmemiştir. Yurdumuzda *Campylobacter* spp.'lerde makrolid direncinin moleküler yöntemle araştırıldığı herhangi bir çalışma mevcut değildir.

Çalışmada Haziran ve Ocak dönemine ait izolatların; tetrasiklin (%55.6- %64.7), oksitetrasiklin (%40.9- %39.7) ve doksisisiklin (%2.3- %1.5) antibiyotiklerine karşı direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Rahimi ve Ameri (31), *C. jejuni* izolatlarında %70.6 oranında tetrasiklin direnci tespit etmişlerdir. Haruna ve ark. (17), *C. jejuni* izolatlarının % 27'sinin oksitetrasikline dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Abay ve ark.(1), insan ve kanatlı orijinli *C. jejuni* izolatlarının tetrasiklin dirençliliklerini sırasıyla %38 ve %56 olarak bildirmişlerdir. Farklı sonuçların sebebinin test edilen mikroorganizmanın fenotipik ve genotipik özelliklerine (41), incelenen materyalin farklılığına (23) bağlı olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada tetrasiklin grubu antibiyotikler açısından E test sonuçlarının disk difüzyon testi sonuçları ile uyumlu olduğu ortaya çıkmıştır. Miflin ve ark. (28), 125 *C. jejuni* izolatının tetrasiklin için MİK değerinin ≥ 16 mg/L olarak bulunduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Yıldırım ve ark. (42)'nin çalışmalarında *C. jejuni* NCTC 11168 ile hindilerden ve tavuklardan izole edilmiş 60 *C. jejuni* izolatı incelenmiştir. Disk difüzyon testine göre izolatların %14.1'i tetrasikline dirençli bulunmuştur. E test yöntemine göre izolatların %12.9'u tetrasikline karşı dirençli olarak belirlenmiştir.

Çalışmada Haziran dönemine ait 50 izolatın 44'ü (%88), Ocak dönemine ait 49 izolatın 42'si (%85.7) genomik *tetO* geni yönünden pozitif bulunmuştur. Haziran dönemine ait 32 izolatın 30'u (%93.7) ve Ocak dönemine ait 21 izolatın 18'i (%85.7) plazmid aracılı *tetO* geninin varlığı yönünden pozitif bulunmuştur. Gibreel ve ark. (14)'nün çalışmalarında yüksek düzeyde tetrasiklin direnci bulunan *C. jejuni* izolatlarının (MİK ≥ 512 µg/ml) %63'ü plazmid ve %37'si ise genomik kökenli *tetO* geni yönünden pozitif bulunmuştur. Yurdumuzda *Campylobacter* spp.'lerde tetrasiklin direncinde rol oynayan *tetO* geninin moleküler yöntemle araştırıldığı herhangi bir çalışma mevcut değildir. Sonuç olarak; çalışmada, Kayseri Şehir merkezinde bulunan farklı satış noktalarında tüketime sunulan broiler karkaslarında *C. jejuni*'lerin yüksek oranlarda bulunduğu tespit edilmiştir. Başlangıçta steril olarak kabul edilen sağlıklı kanatlı etleri kesim, yüzme, parçalama ve depolama sırasında barsak florasında bulunan *C. jejuni*'lerle kontamine olmaktadır. Bu nedenle, tüketicilerin, tavuk et ve et ürünlerini yeterince pişirmeden tüketmemesi,

tavuk ürünlerine elle temas edildikten sonra ellerin mutlaka sabunla yıkanması gibi koruyucu tedbirlerin alınması gerekmektedir.

Çalışma sonunda, *C. jejuni* izolatlarının, azitromisin, doksisisiklin ve eritromisin antibiyotiklere yüksek oranlarda duyarlı oldukları tespit edilmiş; bu nedenle eritromisine ilaveten azitromisin ve doksisisiklin antibiyotiklerinin alternatif tedavi seçeneği olarak kullanılabilceği düşünülmüştür. Kanatlılarda bilinçsiz antibiyotik kullanımıyla birlikte, hayvan orijinli izolatlardan plazmid aracılı antibiyotik direnç genlerinin, insanlarda zoonotik öneme sahip kampilobakter izolatlarına aktarılmasının halk sağlığı açısından önemli risk kaynağı oluşturduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Kampilobakterler arasında artan direnç oranlarını en alt seviyelere indirmek ve dirençli bakteri sayısını azaltmak için tedavide antibiyotik kullanımının bilinçlendirilmesi ve dar spektrumlu antibiyotik kullanımının tercih edilmesi gibi tedbirlerin alınmasının olumlu sonuçlar vereceği söylenebilir.

Teşekkür

Projemizi destekleyen "Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne, çalışmalarımızı yönlendirmemizde ve çalışmanın tüm aşamalarında değerli katkılarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Fuat AYDIN'a ve Sayın Doç. Dr. Seçil ABAY'a ve çalışmanın istatistiksel olarak değerlendirilmesinde yardımcı olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Aytaç AKÇAY'a çok teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Abay S, Kayman T, Otlu B, Hizlisoy H, Aydın F, Ertas N. Genetic diversity and antibiotic resistance profiles of *Campylobacter jejuni* isolates from poultry and humans in Turkey. Int J Food Microbiol 2014; 178: 29-38.
2. Akan ÖA, Haşçelik G, Akyön Y, Yurdakök K. *Campylobacter* türlerinin çeşitli antibiyotiklere in vitro duyarlılığı. Mikrobiyol Bul 1994; 28(2): 122-6.
3. Alfredson DA, Korolik V. Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Fems Microbiol Lett 2007; 277: 123-32.
4. Alonso R, Mateo E, Churrua E, Martinez I, Girbau C, Fernandez-Astorga A. MAMA-PCR assay for the detection of point mutations associated with high-level erythromycin resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains. J Micro Methods 2005; 63: 99-103.

5. Atabay HI, Corry JEL. Evaluation of a new arcobacter enrichment medium and comparison with two media developed for enrichment of *Campylobacter* spp. Int J Food Microbiol 1998; 41: 53-8.
6. Bahrani Mougeot FK, Donnenberg, MS. Enteropathogenic bacteria. Schaechter M. Lederberg J. eds. In: The Desk Encyclopedia of Microbiology. USA, Elsevier Ltd, 2004; pp. 403-14.
7. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1966; 45(4):493-6.
8. Carter GR, Wise DJ. Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology. Sixth Edition. Iowa: Iowa State Press, 2004; p.155-9.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility test of infrequently isolated or fastidious bacteria. Approved Guideline. Second Edition. CLSI Document M45-A2, Vol. 30 No.18 Replaces M-45-A Vol. 26 No.19 2010. CLSI, Wayne, PA.
10. Cokal Y, Caner V, Sen A, Cetin C, Karagenc N. *Campylobacter* spp. and their antimicrobial resistance patterns in poultry: an epidemiological survey study in Turkey. Zoonoses Public Hlth 2009; 56: 105-10.
11. Coker AO, Isokpehi RD, Thomas BN, Amisu KO, Obi CL. Human campylobacteriosis in developing countries. Emerg Infect Dis 2002; 8(3): 237-44.
12. Collins CH, Lyne PM, Grange JM, Falkinham JO. Collins&Lyne's Microbiological Methods. Eighth Edition. UK: Arnold Publisher, 2004; 314-6.
13. Diker KS. Gram negatif mikroaerofilik hareketli bakteriler, *Campylobacteriaceae* familyası. Arda M, Mimbay A, Leloğlu N, Aydın N, Kahraman M, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür M, Diker K.S. eds. In: Özel Mikrobiyoloji. Ankara: Medisan Yayınevi, Beşinci Baskı, 1999; pp. 134.
14. Gibreel A, Tracz DM, Nonaka L, Ngo TM, Connell SR, Taylor DE. Incidence of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* isolated in Alberta, Canada, from 1999 to 2002, with special reference to *tet*(O)-mediated tetracycline resistance. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(9): 3442-50.
15. Gür D, Hasçelik G, Akyön Y, Akalın HE, Diker S. *Campylobacter jejuni* ve *Campylobacter coli*'nin quinolone grubu antibiyotiklere in vitro duyarlılıkları. Mikrobiyol Bul 1989; 23(3): 185-9.
16. Habib I, Sampers I, Uyttendaele M, Berkvens D, De Zutter L. Baseline data from a Belgium-wide survey of *Campylobacter* species contamination in chicken meat preparations and considerations for a reliable monitoring program. Appl Environ Microbiol 2008;74(17): 5483-9.
17. Haruna M, Sasaki Y, Murakami M, Ikeda A, Kusakawa M, Tsujiyama Y, Ito K, Asai T, Yamada Y. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* in broiler flocks in Japan. Zoonoses Public Hlth 2012; 59: 241-5.
18. İovine NM. Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. Virulence 2013; 4(3): 230-40.
19. ISO 10272. Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for detection of thermotolerant *Campylobacter*. The International Organization for Standardization 1995.
20. Jacoby GA, Chow N, Waites KB. Prevalence of plasmid-mediated quinolone. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47(2): 559-62.
21. Kayman T, Abay S, Hızlısoy H. *Campylobacter* türlerinin fenotipik yöntemler ve multipleks polimeraz zincir reaksiyonu ile tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıkları. Mikrobiyol Bul 2013; 47(2): 230-9.
22. Kayman T, Abay S, Hızlısoy H, Gödekmerdan A, Aydın F. *Campylobacter jejuni* izolatlarında siprofloksasin direncinin fenotipik ve moleküler yöntemlerle analizi. İkinci Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi. Kasım, 10-13, 2013; ANTALYA.
23. Luber P, Wagner J, Hahn H, Bartelt E. Antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated in 1991 and 2001-2002 from poultry and humans in Berlin, Germany. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47(12): 3825-30.
24. Lucey B, O'Halloran F, Fanning S. Molecular-based identification and typing of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. Methods Mol Biol 2004; 268: 33-47.
25. Mansouri-najand L, Salehe AA, Wai SS. Prevalence of multidrug resistance *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chickens slaughtered in selected markets, Malaysia. Trop Biomed 2012; 29(2): 231-8.

26. Mazi W, Senok A, Al-Mahmeed A, Arzese A, Bindayna K, Botta G. Trends in antibiotic sensitivity pattern and molecular detection of *tet*(O)-mediated tetracycline resistance in *Campylobacter jejuni* isolates from human and poultry sources. *Jpn J Infect Dis* 2008; 61: 82-4.
27. Mead GC, Hudson WR, Hinton MH. Effect of changes in processing to improve hygiene control on contamination of poultry carcasses with *Campylobacter*. *Epidemiol Infect* 1995;115: 495- 500.
28. Mifflin JK, Templeton JM, Blackall PJ. Antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from poultry in the South-East Queensland region. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 775-8.
29. Oyarzabal OA, Backert S, Williams LL, Lastovica AJ, Miller RS, Pierce SJ, Vieira SL, Rebollo-Carrato F. Molecular typing, serotyping and cytotoxicity testing of *Campylobacter jejuni* strains isolated from commercial broilers in Puerto Rico. *J Appl Microbiol* 2008; 105: 800-12.
30. Öztürk R, Midilli K, Okyay K Eroğlu C, Aygün G, Kenani Y, Sarsan A. Çocuk ve erişkin yaş grubu sürgün olgularında *Campylobacter jejuni* ve *Campylobacter coli* sıklığının araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 1994; 24(1): 42-5.
31. Rahimi E, Ameri M. Antimicrobial resistance patterns of *Campylobacter* spp. isolated from raw chicken, turkey, quail, partridge, and ostrich meat in Iran. *Food Control* 2011; 22: 1165-70.
32. Rodrigo S, Adesiyun A, Asgarali Z, Swanston W. Antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated from broilers in small poultry processing operations in Trinidad. *Food Control* 2007; 18: 321-5.
33. Rosenquist H, Boysen L, Krogh AL, Jensen AN, Nauta M. *Campylobacter* contamination and the relative risk of illness from organic broiler meat in comparison with conventional broiler meat. *Int J Food Microbiol* 2013; 162(3): 226-30.
34. SPSS, 2001. SPSS Statistical Package for Windows, Version 14.0.1, (Serial: 9869264). SPSS Inc. Chicago, USA.
35. Taylor DE, Tracz DM. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Campylobacter*. Ketley JM, Konkel ME. eds. In: *Campylobacter* Molecular and Cellular Biology. Norfolk, UK: Horizon Bioscience, 2005; pp.193-204.
36. Uzunovic-Kamberovic S, Zorman T, Berce I, Herman L, Mozine SS. Comparison of the frequency and the occurrence of antimicrobial resistance among *C. jejuni* and *C. coli* isolated from human infections retail poultry meat and poultry in Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina. *Med Glas* 2009; 6(2): 173-80.
37. Vandamme P, De Ley J. Proposal for a new family, *Campylobacteraceae*. *Int J Syst Bacteriol* 1991; 41: 451-5.
38. Wang G, Clifford GC, Tracy MT, Pucknell C, Barton C, Price L, Woodward DL, Rodgers FG. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J Clinical Microbiol* 2002; 40: 4744-7.
39. Wiczorek K, Osek J. Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 340605. doi: 10.1155/2013/340605.
40. Williams A, Oyarzabal OA. Prevalence of *Campylobacter* spp. in skinless, boneless retail broiler meat from 2005 through 2011 in Alabama, USA. *BMC Microbiology* 2012; 184: 1-7.
41. Wirz SE, Overesch G, Kuhnert P, Korczak BM. Genotype and antibiotic resistance analyses of *Campylobacter* isolates from ceca and carcasses of slaughtered broiler flocks. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76(19): 6377-86.
42. Yildirim M, Istanbuluoğlu E, Ayvalı B. Prevalence and antibiotic susceptibility of thermophilic *Campylobacter* species in broiler chickens. *Turk J Vet Anim Sci* 2005; 29: 655-60.
43. Zirnstein G, Li Y, Swaminathan B, Angulo F. Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* isolates: detection of *gyrA* resistance mutations by mismatch amplification mutation assay PCR and DNA sequence analysis. *J Clin Microbiol* 1999; 37(10): 3276-80.

Yazışma Adresi:

Yrd. Doç. Dr. Harun HIZLISOY
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi,
Veteriner Halk Sağlığı Anabilim Dalı
38039, Melikgazi Kayseri, TÜRKİYE
Tel: 0352 207 66 66 / 29881
GSM: 0 505 918 49 44