T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İÇME SULARINDA TERMOFİLİK CAMPYLOBACTER TÜRLERİNİN ARAŞTIRILMASI

MÜJDAT ÖZGÜR

DOKTORA TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ece ŞEN

EDİRNE-2020

Müjdat ÖZGÜR'ün hazırladığı "İÇME SULARINDA TERMOFİLİK CAMPYLOBACTER TÜRLERİNİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Unvan, Ad, Soyad):	İmza
Prof. Dr. Ece ŞEN	……
Prof. Dr. Dumrul GÜLEN	……
Doç. Dr. Süleyman KÖK	……
Doç. Dr. Mesut BOZ	……
Doç. Dr. Ahmet Şükrü DEMİRCİ	……

Tez Savunma Tarihi: 25/12/2020

Bu tezin Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylıyorum.

İmza

Prof. Dr. Ece ŞEN …….

Tez Danışmanı

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

…….

Doç. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

25/12/2020

Müjdat ÖZGÜR

Doktora Tezi

İçme Sularında Termofilik *Campylobacter* Türlerinin Araştırılması

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

*Campylobacter'*ler hem ishal, hem de sistemik hastalıklara yol açan ve dünyada en yaygın enfeksiyon etkenleri arasındadır. Termofilik *Campylobacter* türlerinin sebep olduğu gastroenteritlerin genellikle gıda kaynaklı olduğu bildirilmesine rağmen son yıllarda su kaynaklı olgular da bildirilmiştir.

Bu çalışmanın amacı, Edirne il merkezi, ilçe merkezleri ve kırsal bölgelerdeki (köy, belde ve özel işletmeler) içme sularından termofilik *Campylobacter*'lerin (*C. jejuni, C. coli* ve *C. lari*) tespit edilmesidir. Ayrıca tespit edilen termofilik *Campylobacter*'lerin mevsimlere ve su kaynaklarına göre değişkenliklerinin saptanmasıdır. Bunun için toplanan örneklerden, önce ISO 9308-1: 2014 standardına göre membran süzme yöntemiyle fekal kirliliğin kesin bir göstergesi olan *Escherichia coli*'nin araştırılması ve sayımı yapılmıştır. Daha sonra sadece *E. coli*'nin tespit edildiği örneklerden iki farklı ticari kit ile termofilik *Campylobacter* türlerinin qPCR analizleri yapılmıştır.

Çalışmamızda, 455 farklı istasyondan alınan 1644 su örneğinin 67 tanesinde *E. coli* tespit edilmiştir. *E. coli* tespit edilen örneklerin tamamının yer altı suyu olduğu, herhangi bir arıtma işleminden geçirilmediği ve sadece 1 su örneğinde 0,3 ppm olup geri kalanların serbest klor miktarlarının 0 ppm olduğu görülmüştür.

Mericon Campylobacter Triple Kit ile multipleks qPCR analizinde 67 su örneğinin 32 tanesinde termofilik *Campylobacter* (*C. jejuni, C. coli* ve *C. lari*) tespit edilmiştir. Ancak Mericon Campylobacter Triple Kit ile üç türden hangisine ya da hangilerine ait olduğu saptanamadığından görülme ihtimali en fazla olan *C. jejuni*'nin tespiti için *C. jejuni* Standart Kit kullanılmıştır. *C. jejuni* Standart Kit ile qPCR analizinde 67 su örneğinin 5 tanesi pozitif tespit edilmiştir.

Bölgemizde ve Türkiye'de ilk kez yapılan bu çalışmada, Edirne'nin bütün bölgelerindeki içme sularında termofilik *Campylobacter*'lerin bulunabileceğini ve içme suyu olarak kullanılan suyun arıtımı, depolanması ve dağıtımında meydana gelen aksaklıkların muhtemel termofilik *Campylobacter* salgınlarına sebep olabileceğini göstermektedir.

Yıl: 2020

Sayfa Sayısı: 92

Anahtar Kelimeler: Edirne, *Escherichia coli*, termofilik *Campylobacter*, qPCR

PhD Thesis

Trakya University Institute of Natural and Applied Sciences

Department of Biotechnology and Genetic

ABSTRACT

Campylobacters are among the most common infectious agents in the world that cause both diarrhea and systemic diseases. Although gastroenteritis caused by thermophilic *Campylobacter* species has been reported due to food consumption, water-borne cases have also been reported in recent years.

The aim of this study is to determine the presence of thermophilic *Campylobacter* (*C. jejuni, C.coli and C. lari*) in drinking water sampled from Edirne city center, district centers and rural areas (villages, towns and private enterprises). We also aimed to determine the variations in the distribution of thermophilic *Campylobacter* according to the seasons and water resources. For this purpose, *Escherichia coli*, which is a definite indicator of fecal pollution, was investigated and counted by membrane filtration method according to ISO 9308-1: 2014 Standard. Then, qPCR analyses of thermophilic *Campylobacter* species were performed by using two different commercial kits for *E. coli* detected samples.

In our study, *E. coli* was detected in 67 out of 1644 water samples taken from 455 different stations. It was observed that all of the samples contaminated with *E. coli* were groundwater samples, which were not subjected to any treatment process, and only 1 water sample contained 0,3 ppm of chlorine. The free chlorine amount was 0 ppm in the rest of the samples

Thermophilic *Campylobacter* (*C. jejuni, C. coli* and *C. lari*) was detected in 32 out of 67 water samples by multiplex qPCR analysis using Mericon Campylobacter Triple Kit. However, since the Mericon Campylobacter Triple Kit could not determine the bacterial species, *C. jejuni* Standard Kit was used to detect the *C. jejuni* which is the most likely species to be seen. In qPCR analysis by using the *C. jejuni* Standard Kit, 5 of 67 water samples were positive.

This study, which was carried out for the first time in our region, and in Turkey, shows that thermophilic *Campylobacter* can be found in drinking water in all regions of Edirne, and disruptions in the treatment, storage and distribution of water may cause possible thermophilic *Campylobacter* epidemics.

Year: 2020

Number of Pages: 92

Keywords: Edirne, *Escherichia coli*, thermophilic *Campylobacter*, qPCR

TEŞEKKÜR

Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yapmış olduğum doktora tezim için eğitimim süresince bilgi, destek ve deneyimleri ile yanımda olan tez danışmanım Prof. Dr. Ece ŞEN'e,

Örneklerin toplanmasında ve kültür çalışmalarındaki katkılarından dolayı mesai arkadaşım Biyolog İsmail BENDER'e

DNA izolasyonu, PCR çalışmaları ve tez yazımındaki katkılarından dolayı Öğretim Görevlisi Dr. Deniz ŞUMNULU'ya (Trakya Üniversitesi, Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi),

Finansal olarak desteklerinden dolayı Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (Proje Numarası: 2018/208),

Bu zorlu süreçte sabır ve desteği ile yanımda olan eşim Meral KUTLU ÖZGÜR'e, kızlarım Şebnem'e ve Mine'ye teşekkür ederim.

Müjdat ÖZGÜR

Edirne, Aralık 2020

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET iv

ABSTRACT vi

TEŞEKKÜR viii

İÇİNDEKİLER DİZİNİ ix

SİMGELER DİZİNİ xii

KISALTMALAR DİZİNİ xiv

ŞEKİLLER DİZİNİ xvi

ÇİZELGELER DİZİNİ xviii

BÖLÜM 1 1

GİRİŞ 1

BÖLÜM 2 4

KAYNAK ARAŞTIRMASI 4

2.1. Tarihçe ve sınıflandırma 5

2.2. Genel Özellikler 6

2.2.1. Termofilik *Campylobacter* Türleri 7

2.2.1.1. *Campylobacter jejuni* 7

2.2.1.2. *Campylobacter coli* 8

2.2.1.3. *Campylobacter lari* 9

2.2.1.4. *Campylobacter upsaliensis* 9

2.3. Genomik Özellikler 10

2.4. Yaptığı Hastalıklar 10
2.5. Tanı 11
2.6. Patogenez 13
2.7. Epidemiyoloji 14
2.8. Tedavi 18
2.9. Korunma 18
BÖLÜM 3 20
GEREÇ VE YÖNTEM 20
3.1. Örneklerin Alınması ve Taşınması 20
3.2. Serbest Klor Ölçümü 20
3.2.1. Kullanılan Ekipman ve Reaktifler 20
3.2.2. Yöntem 20
3.3. Alınan Örneklerden Membran Filtrasyon Yöntemiyle *Escherichia coli'*nin Araştırılması ve Sayımı 21
3.3.1. Kullanılan Ekipman 21
3.3.2. Kullanılan Besiyeri, Seyreltici ve Reaktifler 21
3.3.2.1. Kromojenik Koliform Besiyeri 21
3.3.2.2. Tuzlu Peptonlu Su 21
3.3.2.3. Triptofan Sıvı Besiyeri 22
3.3.2.4. Kovac's Reaktifi 22
3.3.3. Yöntem 22
3.4. Termofilik *Campylobacter* Türlerinin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) ile Analizi 25
3.4.1. Kullanılan Ekipman ve Malzemeler 26
3.4.2. DNA İzolasyonu 26
3.4.3. Multiplex qPCR 27

3.4.4. *C. jejuni* Standart Kit ile qPCR 29

BÖLÜM 4 31

SONUÇLAR 31

4.1. *E. coli'*nin Tespiti 33

4.2. Pozitif Kontrollerin Miktarlarının Hesaplanması 38

4.3. Multiplex qPCR Sonuçları 39

4.4. *C. jejuni* PCR Sonuçları 46

4.5. Multiplex qPCR ve *C. jejuni* PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması 53

BÖLÜM 5 57

TARTIŞMA 57

KAYNAKLAR 63

ÖZGEÇMİŞ 73

SİMGELER DİZİNİ

CO_2	: Karbondioksit
°C	: Santigrat Derece
Cm^2	: Santimetre Kare
dH_2O	: Saf Su
flaA	: Flagellin A geni
g	: Relatif Santrifüj Kuvveti
Gr	: Gram
H_2	: Hidrojen
Kb	: Kilobaz
Mb	: Megabaz
Mg	: Miligram
$MgCl_2$	: Magnezyum Klorür
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
µm	: Mikrometre
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
N_2	: Azot
NaCl	: Sodyum Klorür
O_2	: Oksijen

UV : Ultraviyole

U : Ünite

KISALTMALAR DİZİNİ

A.B.D.	: Amerika Birleşik Devletleri
ATCC	: Amerikan Tip Kültür Kolleksiyonu (AmericanType Culture Collection)
Atm	: Atmosfer
bp	: Baz Çifti
CadF	: Fibronektine Bağlı Dış Zar Proteini
CAT	: Cefoperazone Amphotericin Teicoplanin
CCDA	: Charcoal Cefaperazone Deoxycolate Agar
CDC	: Amerikan Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
Cia	: *Campylobacter* İstila Antijenleri
CSM	: Charcoal-based Selective Medium
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dATP	: Deoksiadenozintrifosfat
dCTP	: Deoksisitozintrifosfat
dGTP	: Deoksiguanozintrifosfat
dNTP	: Deoksinükleozidtrifosfat
dTTP	: Deoksitimidintrifosfat
EDTA	: Etilendiamintetra-asetik Asit
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
EPS	: Ekstraselüler Polisakkarit
FAM	: 6- karboksiflorosein

GBS : Guillain-Barré Sendromu

hipO : Hippurikaz Geni

ISO : International Organization for Standardization

Kob : Koloni Oluşturan Birim

LPS : Lipopolisakkarit

MFS : Miller Fisher Sendromu

mRNA : Haberci Ribonükleik Asit

MLTS : Multilocus Sequence Typing

ORF : Open Reading Frame (Açık Okuma Alanı)

PEB1 : *Campylobacter jejuni* Yüzey Antijeni

PBS : Fosfat Tampon Tuzu

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PFGE : Pulsedfield Jel Elektroforezi (Değişken Alanlı Jel Elektroforezi)

qPCR : Quantitative PCR (Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

qmPCR : Quantitative Multiplex PCR

RNA : Ribonükleik Asit

rRNA : Ribozomal Ribonükleik Asit

RQ : Bağıl Kantitasyon

VBNC : Viable But Not Culturable (Yaşayabilir Ancak Kültürü Yapılamaz)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Seyreltme serilerinin hazırlanması (Berberoğlu, 2012). 24

Şekil 3.2. Seyreltme serilerinden membran filtrasyon işleminin yapılması (Berberoğlu, 2012) 25

Şekil 4.1. İçme ve kullanma amacıyla su örneklerinin toplandığı bölgeler (https://webdosya.csb.gov.tr).…….. 32

Şekil 4.2. Chromogenic Coliform besiyerinde 36°C'de görülen sayılabilir mavi mor renkte *E. coli* kolonileri. Görüntü 17 numaralı örnekten yapılan ekimden alınmıştır.… 37

Şekil 4.3. Chromogenic Coliform besiyerinde 36°C'de görülen 100'den fazla mavi mor renkte *E. coli* koloni örneği. Görüntü 58 numaralı örnekten yapılan ekimden alınmıştır…. 37

Şekil 4.4. *C. jejuni* Standart Kit (Genesig, ABD) Pozitif kontrolün beş nokta seyreltme serisi ve *Mericon* Campylobacter Triple Kit (Qiagen, Almanya) pozitif kontrolün çoğalma eğrisi 39

Şekil 4.5. Multiplex qPCR ile pozitif kontrol, negatif kontrol, *Campylobacter spp*. (C (+)) ve 1- 22 numaralı örneklerin çoğalma eğrisi 41

Şekil 4.6. Multiplex qPCR ile pozitif kontrol, negatif kontrol ve 23-43 numaralı örneklerin çoğalma eğrisi 43

Şekil 4.7. Multiplex qPCR ile pozitif kontrol, negatif kontrol ve 44-63 numaralı örneklerin çoğalma eğrisi. 45

Şekil 4.8. Multiplex qPCR ile pozitif kontrol, negatif kontrol ve 64-67 numaralı örneklerin çoğalma eğrisi 46

Şekil 4.9. *C. jejuni* pozitif kontrol, negatif kontrol, *Campylobacter spp*. (C (+)) ve 1-22 numaralı örneklerin çoğalma eğrisi. 48

Şekil 4.10. *C. jejuni* pozitif kontrol, negatif kontrol ve 23-43 numaralı örneklerin çoğalma eğrisi. 50

Şekil 4.11. *C. jejuni* pozitif kontrol, negatif kontrol ve 44-63 numaralı örneklerin çoğalma eğrisi. 52

Şekil 4.12. *C. jejuni* pozitif kontrol, negatif kontrol ve 64-67 numaralı örneklerin çoğalma eğrisi. 53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. *Mericon* Campylobacter Triple Kit (Qiagen, Almanya) Reaksiyon Karışımı 28

Çizelge 3.2. Multiplex qPCR'da Isı Döngü Programı 29

Çizelge 3.3. *C. jejuni* Standart Kit (Genesig, ABD) Reaksiyon Karışımı 29

Çizelge 3.4. *C. jejuni* Standart Kit (Genesig, ABD) Isı Döngü Programı 30

Çizelge 4.1. Ocak-Aralık 2019 tarihleri arasında, Edirne il merkezi, ilçeleri ve köylerinden içme ve kullanma amacıyla kurulmuş şebekeden alınan su örnekleri. 33

Çizelge 4.2. *E. coli* tespit edilen örneklerin bölgelere göre dağılımı. 34

Çizelge 4.3. *E. coli* tespit edilen örnekler 35

Çizelge 4.3. *E. coli* tespit edilen örnekler (devamı).....36

Çizelge 4.4. *C. jejuni* Standart Kit (Genesig, ABD) pozitif kontrol (PK1, PK2, PK3, PK4, PK5) 5 nokta standart seyreltme serisi ile *Mericon* Campylobacter Triple Kitin (Qiagen, Almanya) pozitif kontrol (PKM) kritik eşik değerleri ve kopya sayıları. 38

Çizelge 4.5. Multiplex qPCR ile pozitif kontrol, negatif kontrol, *Campylobacter spp*. (C (+)) ve 1-22 numaralı örneklerin kritik eşik döngü sayısı (C_T) ile sonuçları. 40

Çizelge 4.6. Multiplex qPCR ile pozitif kontrol ve 23- 43 numaralı örneklerin kritik eşik döngü sayıları (C_T) ile sonuçları 42

Çizelge 4.7. Multiplex qPCR ile pozitif kontrol ve 44-63 numaralı örneklerin kritik eşik döngü sayıları (C_T) ile sonuçları 44

Çizelge 4.8. Multiplex qPCR ile pozitif kontrol ve 64-67 numaralı örneklerin kritik eşik döngü sayıları (C_T) ile sonuçları 45

Çizelge 4.9. *C. jejuni* PCR pozitif kontroller, *Campylobacter spp*. (C (+)) ve 1-22 numaralı örneklerin kritik eşik (C_T) değerleri ile kopya sayıları (RQ) 47

Çizelge 4.10. *C. jejuni* pozitif kontrol ve 23-43 numaralı örneklerin kritik eşik (C_T) değerleri ile kopya sayıları (RQ).....49

Çizelge 4.11. *C. jejuni* pozitif kontroller ve 44-63 numaralı örneklerin kritik eşik (C_T) değerleri ile kopya sayıları (RQ).....51

Çizelge 4.12. *C. jejuni* pozitif kontrol ve 64-67 numaralı örneklerin kritik eşik (C_T) değerleri ile kopya sayıları (RQ).....52

Çizelge 4.13. İki kitin pozitif örnek sayısının aylara göre dağılıımı.....54

Çizelge 4.14. Multiplex qPCR ve *C. jejuni* PCR Sonuçları.....55

Çizelge 4.14. Multiplex qPCR ve *C. jejuni* PCR Sonuçları (devamı) 56

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Campylobacter'ler hem ishal, hem de sistemik hastalıklara yol açan ve dünyada en yaygın enfeksiyon etkenleri arasındadır (National Institute of Health and Welfare vd., 2019; Paruch vd., 2020; Van Dyke vd., 2010). *Campylobacter* enfeksiyonları mücadeleye rağmen hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde artmaya devam etmektedir (Mandal vd., 2017). İnsan enfeksiyonunun en yaygın nedeni *Campylobacter jejuni*'dir ve bunu *C. coli* takip etmektedir, ancak *C. lari*, *C. fetus* ve *C.upsaliensis*'in de insan enfeksiyonlarına neden olduğu bildirilmiştir (Whiley vd., 2013). Hastalık çok çeşitli semptomlar üretebilir, ancak mortalite düşüktür. Diğer bakteriyel patojenlerle karşılaştırıldığında, enfektif doz nispeten düşüktür ve 1000 organizmanın altında olabilir (World Health Organization, 2017). Genellikle kümes hayvanları ve evcil hayvanlarda flora bakterisi yada enfeksiyon etkeni olarak bulunup hayvanlardan insanlara bulaşarak enfeksiyon oluştururlar (Banting vd., 2016; World Health Organization, 2017).

Güvenli içme suyu insan sağlığı için önemlidir. Tüm dünyada içme suyunun fekal kirliliği ve su kaynaklı gastrointestinal enfeksyon salgınları büyük bir halk sağlığı sorunudur. Güvenli içme suyunun sağlanması için alınan tüm önlemlere rağmen su kaynaklı salgınlar gelişmiş ülkelerde bile meydana gelmektedir (Pitkänen, 2010). Termofilik *Campylobacter* türlerinin sebep olduğu gastroenteritlerin genellikle gıda orjinli olduğu bildirilmesine rağmen su kaynaklı olgular da bildirilmiştir (Ferguson vd., 2013; World Health Organization, 2017). Son yıllarda *Campylobacter* enteriti, gıda zehirlenmesinden çok, su ve gıda kaynaklı bulaş gösteren bir hastalık olarak ele alınmaktadır (Pitkänen, 2013). Rapor edilmiş *Campylobacter* salgınlarının çoğunluğu

su kaynaklıdır ve su kaynaklı *Campylobacter* salgınları içme suyu dağıtım şebekesi yoluyla binlerce insanı etkileyebilir (Pitkänen, 2010). Su kaynaklı *Campylobacter* salgını ilk defa 1978 yılında 3000 kişinin etkilendiği ABD'nin Vermont eyaletinde meydana gelmiştir (Ferguson vd., 2013). O tarihten sonra aynı anda binlerce kişiyi etkileyen peş peşe birçok su kaynaklı *Campylobacter* salgınları rapor edilmiştir. Ancak pek çok ülkede bu salgınlar tespit etme yetersizlikleri sebebiyle raporlanamamıştır (National Institute of Health and Welfare vd., 2019).

İçme yada rekreasyon sularının analizindeki amaç zararlı mikroorganizmaların olup olmadığını tespit etmek ve halk sağlığı riskini en aza indirmektir. Mevcut su kalitesi için uygulanan yöntemler zahmetli ve zaman alıcı olabilir (Pitkänen, 2013; Tanchou vd., 2014). Ayrıca gösterge mikroorganizmalar olmadan da su kaynaklı gastrointestinal hastalıklarla ilişkili salgınlar rapor edilmiştir. Dolayısıyla halk sağlığını korumak amacıyla sadece gösterge mikroorganizmaların sayımı yetersiz kalıp suda spesifik patojenlerin analizi gerekli olabilir (Pitkänen, 2013).

Farklı su kaynakları *Campylobacter* enfeksiyonlarının geçişinde önemli rol oynamaktadır. Pek çok vaka içme suyuna atık su alt yapısından çapraz geçişi ile ilişkilendirilmiştir (Pitkänen, 2013). Halk sağlığı riskleri açısından bilgi sağlamanın en iyi yolu su kaynaklarındaki patojen mikroorganizmaların doğrudan gösterilmesidir (Fittipaldi vd., 2011). Ancak düşük metabolik aktivitelerinden dolayı in vitro şartlarda üretilmeleri ve fenotipik yöntemlerle identifikasyonları, uygun alt yapı ve tecrübeli personele sahip laboratuvarlarda bile son derece düşük duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. Ayrıca uygulanması zor, pahalı ve zaman alıcıdır. Geleneksel tanı yöntemlerinde yaşanan ve bakteriden kaynaklanan bu olumsuzlukların aşılması amacı ile alternatif yöntemler, özellikle PCR gibi nükleik asit çoğaltma yöntemleri birçok araştırmacı tarafından denenmiştir (Ahmed vd., 2009; Banting vd., 2016; Fermér & Engvall, 1999; Pitkänen vd., 2009; Pitkänen, 2013). Yaşayabilir fakat kültüre edilemez (VBNC) *Campylobacter* varyantları ortaya çıkması nedeniyle sudan *Campylobacter* tespiti için yalnızca geleneksel kültür yöntemiyle tespitine güvenmek pratik değildir. Bu formdaki bakteriler metabolik aktivite sergilerler, patojenik özelliklerini korurlar, konvansiyonel bakteriyolojik besiyerlerinde üremezler ve uygun koşullarda tekrar aktivitelerini kazanırlar (Casey vd., 2017; Vondrakova vd., 2014).

Campylobacter enfeksiyonlarında gelişen antimikrobiyal ilaç direnci ve özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda oluşturacakları enfeksiyonlar, önemli bir tedavi problemi yaratmaktadır (Geissler vd., 2017).

Bütün bu gerekçeler *Campylobacter* enfeksiyonlarının önemini arttırmakta ve enfeksiyonları daha duyarlı ve özgül mikrobiyolojik tanıyı gerekli kılmaktadır (Pitkänen, 2010).

İlimizde içme suyunda *Campylobacter* türlerinin tespitine ve sayımına yönelik bir araştırma yapılmamıştır. Bu bakımdan çalışmamızda, ilimizde *C. jejunu, C. coli ve C. lari*'nin içme suyunda var olup olmadığı, hangi bölgede görüldüğü ve mevsimsel fark olup olmadığı açıklığa kavuşmuştur.

Bu çalışmada;

1- Edirne il merkezi, ilçe merkezleri ve kırsal bölgelerdeki (köy, belde ve özel işletmeler) içme sularından termofilik *Campylobacter*'lerin (*C. jejuni, C. coli* ve *C. lari*) tespit edilmesi,

2- Tespit edilen termofilik *Campylobacter*'lerin mevsimlere ve su kaynaklarına göre değişkenliklerinin saptanması amaçlanmıştır.

Bunun için toplanan örneklerden, önce ISO 9308-1: 2014 standardına göre membran süzme yöntemiyle fekal kirliliğin kesin bir göstergesi olan *Escherichia coli*'nin tespit edildiği örneklerden iki farklı ticari kit ile termofilik *Campylobacter* türlerinin qPCR analizleri yapılmıştır.

BÖLÜM 2

KAYNAK ARAŞTIRMASI

Campylobacter, ishal hastalıklarının dört küresel ajanından biridir (World Health Organization, 2017). ABD'de 2004-2012 yılları arasında bildirildiği gibi insan gastroenteritine neden olan en yaygın bakteriyel patojen olarak kabul edilmiştir, yılda 1.3 milyon hastalığa, 13.240 hastaneye kabul ve 119 ölüme neden olmuştur (Geissler vd., 2017). Kampilobakteriyoz, Avrupa'da da en sık bildirilen gıda kaynaklı hastalık olarak bildirilmiştir (Ferrari vd., 2019; Isabel, 2019). Latin Amerika'da *C. jejuni* ve *C. coli*, ishal vakalarının % 25'ine kadar enfeksiyon nedenidir ve asemptomatik taşıyıcı durumu yaygındır. Asya ve Orta Doğuda, kampilobakteriyozun, özellikle çocuklarda endemik olduğu gösterilmiştir (Kaakoush vd., 2015). Bununla birlikte, salgınların yarısında, enfektif ajan saptanamamıştır. Enfeksiyonların kaynağını saptamaya yönelik bu tür bir zorluk, *C. jejuni* ve *C. coli*'nin farklı konakçılar arasında hızlı bir şekilde iletilmesinden ötürü, belirgin zayıf konakçı birliği ile ilişkili olabilir (Dearlove ve ark., 2016).

C. jejuni enfeksiyonları hakkındaki mevcut bilgimiz son yıllarda giderek artmıştır. *C. jejuni* enfeksiyonu, bazen *Salmonella, Shigella* ve *E. coli*'ye bağlı diğer enfeksiyonlardan daha yaygın aşan bakteriyel gastroenterit nedenidir. Enfeksiyonların çoğu, çiğ veya az pişmiş kümes hayvanları, pastörize edilmemiş süt ve kontamine su tüketimi nedeniyle edinilir. *C. jejuni*'yi tespit etmek için teşhis yöntemleri geliştirildiğinden beri, enfeksiyonu belirleme olasılığı artmıştır (Nyati & Nyati, 2013).

2.1. Tarihçe ve Sınıflandırma

Campylobacter türü bakteriler ilk olarak 1886 yılında Theodor Escherich tarafından "cholerae infantum"dan ölen çocukların kolonlarından spiral bakteri olarak tanımlanmış, fakat bakteri kültürde üretilememiştir. Takip eden yıllarda gastrointestinal sistemde spiral morfolojide bakteriler tanımlanmışsa da kültürlerin başarısız olması, bu mikroorganizmalara duyulan ilginin azalmasına sebep olmuştur (Topçu vd., 2008). Enfeksiyon etkeni olarak *Campylobacter* türlerinin insanda izolasyonu 1947'de Vincent ve arkadaşları tarafından bir septik abortus olgusundan kanda *Vibrio fetus*'un üretilmesiyle gerçekleşmiş, 1963'de ise Sebald ve Veron bu grup bakterileri kıvrık basil anlamına gelen "*Campylobacter"* adını vererek gerçek *Vibrio*'lardan ayırmıştır. 1972 yılında Butzler sağlıklı genç bir kadında görülen akut febril gastroenterit olgusunda, kan ve dışkıdan *Campylobacter* türünü izole etmiş ve bu bakterilerin insanda enterite neden olduğu kesinlik kazanmıştır. 1979 yılında ise insanlardaki *Campylobacter* türlerinin tüm özellikleri tanımlanmıştır (Topçu vd., 2008). Ülkemizde *Campylobacter* enfeksiyonlarıyla ilk defa Tezcan ve arkadaşları tarafından 1984 yılında yapılmıştır. O tarihten günümüze kadar konuyla ilgili birçok araştırma yapılmıştır (Kayman vd., 2016).

Campylobacteriaceae ailesindeki bakterilerin sınıflandırılması ilk keşfedildikleri günden günümüze kadar sürekli değişiklik göstermiştir. Mikroaerofilik olmaları, nonfermentatif metabolizmaya ve düşük DNA Guanin + Sitozin (G+S) baz kompozisyonuna sahip olmaları (%27-47) nedeniyle *Vibrio* cinsinden ayrılmıştır (Topçu vd., 2008). Moleküler yöntemlerle hücre duvarı proteinleri ve lipidlerinin tespiti, serolojik ve biyokimyasal araştırmalarla karışıklıklar çözülmüştür (Bui, 2012; Kaakoush vd., 2015; Murray vd., 2010).

Campylobacteraceae ailesi *Arcobacter, Sulfurospirillum, Dehalospirillum* ve *Campylobacter* cinslerini içerir ve Gram-negatif, genellikle düşük G + C içeriği ve nispeten küçük bir genomu olan mikroaerofilik organizmalardır. Günümüzde *Campylobacter* cinsinde 29 tür ve 12 alttür sınıflandırılmıştır. Bunların yedi türü ve bir alt türü 2009'dan sonra tanımlanmıştır (National Institute of Health and Welfare vd., 2019).

İnsan gastroenteritindeki en önemli *Campylobacter* türü, bildirilen tüm kampilobakteriyoz vakalarının % 90 ila 95'ini oluşturan *C. jejuni*'dir. Kalan vakaların çoğuna *C. coli* neden olur, ancak enterik bir patojen olarak *C. coli*'nin önemi bölgelere göre değişir. Diğer bazı türlerin (*C. lari, C. upsaliensis, C. concisus*) rolü iyi tanımlanmamıştır. Deneysel enfeksiyonların verilerine dayanarak ve dolaylı olarak su kaynaklı salgınlardan yola çıkılarak, sadece birkaç yüz bakteriye maruz kalmanın hastalığa neden olabileceği bilinmektedir. Su kaynaklı maruziyetlerde tipik olarak düşük dozlarda doz yanıt ilişkisinin tahmin edilmesindeki belirsizlikler nedeniyle, *C. jejuni* maruziyetleri için risk tahminleri oldukça belirsizdir ve *C. coli* veya diğer *Campylobacter* türleri için doz yanıt verilerinin yokluğunda, doğrudan mümkün değildir (National Institute of Health and Welfare vd., 2019; Özkuyumcu, 2009).

2.2. Genel Özellikler

Campylobacter türleri genelikle 0.2-0.8 µm genişliğinde, 0.5-5 µm uzunluğunda kıvrık, spiral morfolojiye sahip veya S şeklinde, sporsuz, Gram negatif, mikroaerofilik basillerdir. Eski kültürlerde veya oksijenle fazla temas ettiğinde olduğunda yuvarlak, kokoid forma dönüşürler. Yapılan çalışmalar kokoid formdaki bakterilerin canlılığını yitirmiş olduğunu az miktarda nüklek asit ve peptid içerdiğini göstermiştir. Çoğu *Campylobacter* türleri bir ucunda veya her iki ucunda tek polar kamçısı sayesinde hareketli (*C. gracilis ve C. hominis* hariç) bakterilerdir. Bu bakteriler kamçıları sayesinde tirbüşon benzeri ani ve ileriye doğru dönerek hareket ederler. Hızlı hareketlerinden ve küçük boyutlarından dolayı diğer enterik bakterilerin aksine 0.45 ve 0.65 µm por çapına sahip membran filtrelerden geçebilme özelliğine sahiptirler. Bu hareketleri sayesinde intestinal kolonizasyonda önemli rol oynamaktadırlar. Oksidaz aktiviteleri ve katalaz reaksiyonları pozitiftir (Ferguson vd., 2013; Fittipaldi vd., 2011).

Ülkemizde enfeksiyonların mevsimsel dağılımının, yaz aylarında arttış göstermekle birlikte sonbahar ve kış aylarında da görülmeye devam ettiği belirlenmiştir. *Campylobacter* enfeksiyonlarının genellikle çocuk ve genç yetişkinler ile erkeklerde daha sık görüldüğü bildirilmektedir (Kayman vd., 2016).

Campylobacter'ler soğuk suda (4°C) birkaç hafta, ancak ılık suda sadece birkaç gün (25°C) yaşayabilir (Cook ve Bolster, 2007; González ve Hänninen, 2012). Donma, *Campylobacter*'leri derhal inaktive etmez, ancak yoğunluğunu azaltabilir (Solow ve

diğerleri, 2003). Etkili pastorizasyon ve suyun klorlanması bakterinin ölmesini sağlamaktadır (Topçu vd., 2008). *Campylobacter*'ler, 5 ila 10 saat arasında yavaş ölümlerine neden olan % 2 NaCl'den daha yüksek tuz oranına duyarlıdır. Askorbik ve laktik asitler bu organizmaların büyümesini inhibe edebilir (Hudson vd., 2007). *Campylobacter*'ler ayrıca radyasyona karşı hassastır. *C. jejuni ve C. coli*, UV radyasyona örneğin *E. coli*'den daha duyarlıdır (Hudson vd., 2007). *C. jejuni*, çevresel stres ve elverişsiz büyüme koşulları altında canlı fakat kültüre edilemeyen (VBNC) bir forma dönüşebilir. Bununla birlikte, *C. jejuni*'nin VBNC formunun kampilobakteriyozdaki rolü olup olmadığı konusu çelişkilidir (Hudson vd., 2007). *Campylobacter* türleri kuruluğa 8-10 saat dayanabilmektedir. Toprak, saman ve gübrede ısı ve neme bağlı olarak 10-20 gün canlı kalabilirler. pH 4.5 altındaki ve pH 9 üzerindeki değerlerde yaşayamazlar, bu nedenle mide asitini nötralize eden veya mideden geçişi hızlandırarak mikroorganizmayı koruyan yağlı gıdalar ve süt gibi besinler enfeksiyon gelişimini kolaylaştırmaktadır (Hudson vd., 2007).

2.2.1. Termofilik *Campylobacter* türleri

42°C'de üreyebilme özelliğine sahip *Campylobacter* türleri genetik olarak yakın bir grup oluşturur ve termotoleran türler olarak adlandırılmaktadır. Bu grupta yer alan türler 42°C'de üreyebilirlerken 25°C'de üreyemezler. Termotoleran *Campylobacter*'ler arasında insanda enfeksiyona neden olan en önemli türler *C. jejuni*, *C. coli, C. lari* ve *C. upsaliensis*'tir (Fitzgerald, 2015). Hayvan çiftliklerinin olduğu yerlerde, tarım arazilerinde ve nehir havzalarında termofilik *Campylobacter*'ler bulunabilmektedir (Khan vd., 2014).

Termofilik *Campylobacter*'ler zor üreyen organizmalardır ve çevresel strese duyarlıdır. Bağırsak sisteminin dışında çoğalamazlar. İkisi de enfeksiyon kaynağı olarak işlev görebilen yiyecek veya su içinde çoğalamazlar (Khan vd., 2009).

2.2.1.1. *Campylobacter jejuni*

Bir insan patojeni olarak *C. jejuni*, su ve çeşitli hayvanlarda rezervuarları olan tesadüfi bir enfeksiyon etkenidir. Su kaynaklı enfeksiyonun daha az olduğu gelişmiş ülkelerde hayvanlar ve insanlarda enfeksiyonun (kampilobakteriyoz olarak adlandırılır) birincil kaynağıdır (National Institute of Health and Welfare vd., 2019). *C. jejuni*

enfeksiyonları, gelişmiş ülkelerde diyare, karın ağrısı ve ateş ile karakterize akut gastrointestinal enfeksiyonlara neden olmaktadır. Enterit etkeni olan *Campylobacter* türlerinin hepsi benzer klinik tabloya neden olmaktadırlar. İshal, karın ağrısı ve ateş en sık görülen klinik semptomlardır. (Topçu vd., 2008). *C. jejuni* akut enterit dışında ülseratif kolit veya Crohn hastalığına benzer akut kolite, septik düşüklere, yaşlılarda bakteriyemiye, menenjit, endokardit, nadir olarak kolesistit, pankreatit ve sistite neden olmaktadır (Topçu vd., 2008).

Hastalık sıklıkla işleme sırasında kontamine olmuş tavuk ürünlerinin tüketilmesinden sonra ortaya çıkar. *C. jejuni*, tavukların ve diğer kanatlı türlerinin kommensal bir organizması olarak kabul edilir. Deneysel olarak *C. jejuni* enfeksiyonu tavuklarda diyareye neden olsa da, bu durum tipik değildir ve *C. jejuni* enfeksiyonu insanda kanatlılardan daha şiddetlidir. Bu durum, sığırların ortak bir kolonizörü olan ve sığır eti ve sığır dışkısı ile temas yoluyla kontamine olan diğer gıdaların yutulması yoluyla insanda enfeksiyona neden olan enterohemorajik *Escherichia coli* ile benzerdir (National Institute of Health and Welfare vd., 2019).

C. jejuni ayrıca iki alt tür içerir: *C. jejuni subsp. jejuni* ve *C. jejuni subsp. doylei*. Birinci alt tür sığırların bağırsak içeriğinden izole edilmiştir. 1970 yılında, insanlarda gastroenterite neden olduğu bulunmuştur. Gastritin yanı sıra, *C. jejuni subsp. jejuni* insanlarda septisemiye ve nörolojik bozukluklara yol açabilir. Hayvanlarda ise saprofittir; tavuklar, sığırlar, domuzlar, koyunlar, köpekler ve devekuşlarından izole edilmiştir (Dingle ve diğerleri, 2001). *C. jejuni subsp. doylei, subsp. jejuni*'den bulaşma, dağılım ve biyolojik özellikleri bakımından önemli ölçüde farklıdır. Hayvanların konakçı olduğuna dair bir kanıt yoktur. Enterit, gastrit ve septisemi olan insanlardan izole edilmiştir. *C. jejuni,* 42°C'de 37°C'den daha iyi ürer (Yenen, 2010)**.**

2.2.1.2. *Campylobacter coli*

C. coli, dizanterili domuzlardan ve sığır, kümes hayvanları, deve kuşları ve köpeklerden izole edilmiştir. İnsanlarda *C. coli* gastrointestinal hastalığın *C. jejuni*'den sonra ikinci nedenidir (Debruyne vd., 2016; Snezana Ivanovic, 2012). *C. jejuni* ile en yakın genetik ilişkiye sahip olmasına rağmen, ishalli domuzlarda *C. jejuni*'den daha hafif semptomlara neden olur (Snezana Ivanovic, 2012).

C. coli, biyokimyasal olarak *C. jejuni* ile yüksek oranda benzerlik göstermekle birlikte hippuratı hidrolize edememesi ile *C. jejuni*'den ayrılır. Ancak, genotipik olarak hippurat hidrolizinden sorumlu olan hip O genine sahip olup da fenotipik olarak hippuratı hidrolize edemeyen *C. jejuni* türlerinin varlığından dolayı ve atipik özellik gösteren bu suşlarla *C. coli* türlerinin ayırımında kullanılabilecek başka bir biyokimyasal test bulunmamasından dolayı, bu iki türün ayırt edilmesinde daha güvenilir olan moleküler yöntemlerin kullanılması önerilmektedir (Debruyne vd., 2016).

2.2.1.3. *Campylobacter lari*

C. lari ilk olarak martılardan izole edildi ve ekolojik, genetik ve fenotipik olarak *C. jejuni* ve *C. coli* türlerinden farklılaştı. Yabani kuşların, kümes hayvanlarının, sığır etlerinin ve kabuklu deniz hayvanlarının sindirim sisteminden ve atık sulardan izole edilmiştir (Lastovica vd., 2014; Snezana Ivanovic, 2012).

Önceki yıllarda "nalidiksik asite dirençli termoleran *Campylobacter*" olarak adlandırılan *C. lari*, nalidiksik aside dirençli olması ile *C. jejuni* ve *C. coli*'den ayırt edilmekteydi. Ancak, son yıllarda bu tür içerisinde nalidiksik asite duyarlı varyantların bulunduğunun saptanması ve *C. jejuni* ve *C. coli*'de kinolon grubu antibiyotik direncinin artmasıyla birlikte nalidiksik asite dayalı tür ayırımı önemini kaybetmiştir. *C. lari*, indoksil asetatı hidrolize etmemesiyle *C. jejuni* ve *C. coli*'den ayırt edilebilir. *C. lari*'nin bazı varyantları üreaz enzimi oluşturmaktadır ve bu varyantlar "üreaz pozitif *Campylobacter*'ler" olarak isimlendirilmektedir (Debruyne vd., 2016).

Son yıllarda yapılan filogenetik çalışmalarla bu tür içerisinde *C. lari subsp. concheus* ve *C. lari subsp. lari* olmak üzere iki alt türün bulunduğu gösterilmiştir. *C. lari* insandan hastalık etkeni olarak izole edilen *Campylobacter* türlerinin % 0.1'ini oluşturmaktadır (Vandenberg vd., 2010).

2.2.1.4. *Campylobacter upsaliensis*

C. upsaliensis önce köpek dışkısından izole edildi. İnsanlarda sporadik gastroenterit vakalarında soyutlandı (Snezana Ivanovic, 2012). *C. upsaliensis*'in bazı bölgelerde *C. jejuni*'den sonra en sık rastlanan *Campylobacter* türü olduğu ve son yıllarda *Campylobacter* türleri arasında öneminin giderek arttığı bildirilmektedir. *C.*

upsaliensis'in katalaz reaksiyonu diğer termotoleran *Campylobacter*'lerden farklı olarak negatif veya zayıf pozitiftir (Debruyne vd., 2016). *C. upsaliensis*, *Campylobacter* cinsi bakterilerin izolasyonu için kullanılan selektif besiyerlerinin çoğunda bulunan sefalotine duyarlıdır. Bu nedenle, *C. jejuni subsp. doylei*'de olduğu gibi bu bakterilerin izolasyonunda da filtrasyon yönteminin tercih edilmesi önerilmektedir (Vandenberg vd., 2010).

2.3. Genomik Özellikler

İlk olarak Parkhil ve arkdaşları tarafından, 2000 yılında, *C. jejuni* NCTC 11168 suşunun ardından da RM 12-21 ve *C. jejuni* 81-176 suşlarının tam genom analizleri yapılmıştır (Lastovica vd., 2014). Daha kolay ve daha hızlı sonuç üreten DNA sekans analiz tekniklerinin ve multilocus sequence typing (MLTS) gibi çok sayıda gen bölgesini aynı anda belirleyebilen, yeni tekniklerin kullanılmaya başlaması ile klinik ve çevresel örneklerden edilen çok sayıda izolatın genomik farklılıklarının ortaya konması mümkün olmuştur. Bu çalışmalar *Campylobacter* genomunun, lateral gen transferleri ve homolog rekombinasyonlar sebebi ile son derece dinamik bir yapıya sahip olduğunu göstermiştir (Ketley & Konkel, 2005). Oldukça kompleks ve diğer bakteri türlerine kıyasla küçük genomik bir yapıya sahip olduğu belirlenen *C. jejuni*'nin NCTC 11168' suşunun genomu 1,641,481 bp' uzunluğundadır ve 1654 açık okuma bölgesi (ORF) içermektedir. Genomun G+C ortalaması % 29±47'dir. Lipooligoosakkarit ve ekstraselüler polisakkarit (EPS) sentezinden sorumlu gen bölgelerinin G+C oranı ise nisbeten daha düşüktür (Parkhill vd., 2000). Bu *Campylobacter* suşları tarafından kodlanan proteinler 1.580 ila 2.092 arasındadır. Plazmidler, tam genom dizili *Campylobacter* türlerinde tanımlanmıştır. Bununla birlikte, tüm *C. jejuni* suşları bir plazmid içermez (Lastovica vd., 2014).

2.4. Yaptığı Hastalıklar

Campylobacter enfeksiyonları çoğunlukla gastrointestinal sistem enfeksiyonları şeklinde görülmektedir. *Campylobacter* ile ilişkili salgınlar ise diğer enterik patojenlerin neden olduğu salgınlara göre daha nadir görülmekle birlikte dünyanın çeşitli bölgelerinden bu bakteri ile ilişkili salgınlar bildirilmektedir (Igwaran & Okoh, 2019; Pitkänen, 2013; World Health Organization, 2017). Yaygın olarak bildirilen

kampilobakteriyoz semptomları 2-5 günlük bir kuluçka döneminden sonra kanlı ishal, karın ağrısı, ateş, halsizlik ve baş ağrısıdır. Hastalığın doruk noktasında olduğu günlerde dışkılama sayısında artış gözlenmektedir. Günlük dışkılama Genel olarak kendi kendini sınırlayıcı olmasına rağmen, laboratuvar onaylı vakaların yaklaşık onda biri hastaneye yatmayı gerektirir (Isabel, 2019; Murray vd., 2010; Whiley vd., 2013). *Campylobacter* enfeksiyonlarına bağlı ölüm oranları düşüktür (Bui, 2012).

Bazı durumlarda, gastrointestinal sistemin enfeksiyonu hayatı tehdit eden ekstragastrointestinal hastalıklara ilerleyebilir (Man, 2011). Kampilobakteriyoz nadiren bakteriyemiye (<% 1 intestinal enfeksiyon vakalarında) neden olur, çoğu durumda *C. jejuni ve C. coli* etkendir. Bununla birlikte, bazı çalışmalara göre, *Campylobacte*r bakteriyemisi tarihsel olarak *C. fetus* ile ilişkilidir ve daha az sıklıkla enterit ile görülür. Vakaların % 93 kadarı, ileri yaş, kronik karaciğer hastalığı, insan immün yetmezlik virüsü enfeksiyonu, malignite ve humoral immün yetmezlik gibi iyi bilinen risk faktörleri ile ilişkilidir ve ölüm oranı % 4-% 16 arasındadır (Igwaran & Okoh, 2019; Isabel, 2019).

Campylobacter enfeksiyonlarından sonra bazı komplikasyonlar da gelişebilmektedir. *C. jejuni* enfeksiyonu, Guillain-Barré sendromu (GBS) ve Miller Fisher (MFS) sendromu olarak bilinen otoimmün hastalıklara neden olabilir (Kaakoush vd., 2015; Nyati & Nyati, 2013; Özkuyumcu, 2009). Özellikle *C. jejuni* serotip O19 ile ilişkili akut veya subakut simetrik yükselen motor güçsüzlük, reflekslerin yokluğu ve hafif ila orta derecede duyusal anormalliklerle karakterize periferik sinir sisteminin immün aracılı bir demiyelinizan polinöropatisidir. Ölüm oranı % 8 civarında kalır ve hastaların yaklaşık % 20'sinin sinir sisteminde sekeller kalmaktadır (Nyati & Nyati, 2013; Özkuyumcu, 2009). MFS, oftalmopleji (göz kası zayıflığı), hiporefleksi (reflekslerin yokluğu) ve ataksi (anormal kas koordinasyonu) ile karakterize edilen bir GBS varyantı olarak tanımlanır. MFS insidansı batıdaki tüm GBS vakalarının % 5'ine kadar, Asya'da % 26'ya kadar tahmin edilmektedir (Ono vd., 2015).

2.5. Tanı

Campylobacter infeksiyonlarının rutin tanısında kültür altın standart yöntem olarak yerini korumaktadır. Kültür yönteminin diğer yöntemlere göre en önemli avantajı enfeksiyon etkeni olarak izole edilen suşun antibiyotik duyarlılıklarının

belirlenebilmesidir. Kültür yöntemi ayrıca izole edilen suşların tiplendirilmesine olanak sağlayarak salgın şüphesinin olduğu durumlarda salgının varlığının saptanıp kaynağının belirlenebilmesine zemin hazırlar (Nachamkin vd., 2008). Tanımlamada, hareketliliği ve morfolojiyi tespit etmek için karanlık alan mikroskopisi, Gram boyama, şeker, oksidaz ve katalaz üretimini tespit etmek için biyokimyasal yöntemler, üçlü şeker üzerinde sodyum sülfat üretimi gibi fenotipik yöntemler kullanılarak doğrulanır. % 1 sistein hidroklorür varlığında demir agar ve 25°C ve 42°C'de inkübe edilen beyin kalp infüzyon agar plakaları üzerinde üreme saptanabilir (Isabel, 2019; Kayman vd., 2013). *Campylobacter* türlerini üretmek için % 5-10 O_2, % 5-10 CO_2, % 10 H_2 ve % 75 N_2 gerekmektedir. *C. concisus, C. mucosalis ve C. hyointestinalis* gibi bazı türler üremeleri için artmış hidrojen derişimine gereksinim duyarlar; *C. sputorum* ve *C. gracilis* gibi bazı türler ise anaerop ortamda da üreyebilme özelliğine sahiptirler. Bu bakteriler karbonhidratları fermente etmezler ve ayrıca oksidatif olmayan bir metabolizmaya sahiptirler. Bu bakterilerin hepsi 37°C'de üremelerine rağmen, *C. jejuni, C. coli* ve *C. lari* en iyi 42°C'de üremektedir. *Campylobacter* türleri kan ve antibiyotik içeren selektif besiyerlerinde (Skirrow, Butzler, Blaser) ve kan içermeyen selektif besiyerlerinde üretilmektedir. Son yıllarda *Campylobacter* türlerinin üretilmesinde kullanılan at kanının standardizasyon güçlüğü ve kontaminasyon olasılığını ortadan kaldırmak için de bakteriyolojik kömür, aerotoleransı artırmak için ferröz sülfat ve sodyum piruvat içeren CCDA (Charcoal Cefaperazone Deoxycolate Agar), CAT (Cefperazone Amphotericin Teicoplanin) ve CSM (Charcoal-based Selective Medium) kulanılması önerilmektedir (Özkuyumcu, 2009; Topçu vd., 2008). *Campylobacter*'ler genel olarak ortalama % 5 O_2, % 10 CO_2 ve % 85 N_2 içeren mikroaerobik atmosferde üreme özelliği göstermekle birlikte; *Campylobacter* türleri selektif besiyelerinde düz, gri, irregüler, mukoid veya kuru, yuvarlak veya konveks, yayılmaya eğilimli koloniler oluştururlar. Şüpheli kolonilerden alınan bakteriler Gram boyası ile boyandıklarında tipik martı kanadı veya uzun spiraller şeklinde görülürler. Eski kültürlerde veya oksijenle fazla teması olan bakteriler kokoid şeklinde saptanırlar. Katalaz ve oksidaz testleri pozitif (*C. jejuni, C. coli* ve *C. lari*) olan bu bakteriler hippurat testi, sefalotin ve nalidiksik asit duyarlılıklarına göre biyokimyasal olarak ayırt edilebilirler (Topçu vd., 2008).

Biyokimyasal aktivitelerinin zayıf olmasından dolayı tür düzeyinde doğru tanımlama için fenotipik testler her zaman yeterli olmamakta ve moleküler analize

ihtiyaç duyulmaktadır (Kayman vd., 2016). Su kalitesi araştırmalarındaki son gelişmeler, gösterge organizmalarının yaşayabilirliğine, kültüre edilebilirliğine ve metabolik aktivitesine dayanarak tatlı su içindeki patojenlerin insidansını doğru bir şekilde tahmin etmede zorlukları vurgulamıştır. qPCR güdümlü testler, standart kültüre dayalı yöntemlerin yerini almaya adaydır, ancak rutin kullanıma uygun protokoller henüz yeterince doğrulanmamıştır (Clark vd., 2011). Bir çalışmada, gerçek zamanlı PCR testinin, *C. jejuni*'nin kantitatif tespiti için spesifik, hassas ve hızlı bir yöntem sağladığını göstermiştir (Yang vd., 2003). Başka bir çalışmada da *C. jejuni, C. coli ve C. lari*'yi hedefleyen kantitatif PCR deneyi, nehir suyu örneklerinde *Campylobacter* tespit sıklığının, kültüre dayalı yönteme kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür (Van Dyke vd., 2010). Multipleks PCR testi, insanlarda gastroenterit ve/veya septisemi ile yaygın olarak ilişkili altı *Campylobacter* taksonun tanımlanması için hızlı, basit ve pratik bir araçtır ve geleneksel biyokimyasal bazlı testlere etkili bir alternatif sunar (Yamazaki-Matsune vd., 2007). Multipleks qPCR (qmPCR) *C. jejuni* ve *C. coli*'nin güvenilir, ayrıca takip eden devamındaki validasyon çalışmaları için uygulanabilir (El-Adawy vd., 2012; Frasao vd., 2017; Wiemer vd., 2011). Multipleks qPCR monoplex PCR'a göre avantajlıdır, birden farklı DNA hedefini tek bir reaksiyonda çoğaltabilmektedir (Toplak vd., 2012). Multiplex PCR, *Campylobacter* kontaminasyonunun teşhisi için hızlı, hassas ve ucuz bir araç olduğunu kanıtlanmıştır (El-Adawy vd., 2012). Ayrıca ön zenginleştirme ile qPCR birleştirilince daha başarılı sonuçlar alındığı görülmüştür (Pitkänen vd., 2009).

2.6. Patogenez

Campylobacter'lerin yüksek çeşitliliği nedeniyle, klinik semptomlara neden olan patojenik mekanizmalar hala çok iyi anlaşılamamıştır (Redondo vd., 2019). *Campylobacter*'lerde bulunan virülans özellikleri arasında, kamçının sağladığı motilite, bağırsak mukozasına yapışması ve kolonizasyonu, invazyon yetenekleri ile sitotoksin üretimi yer alır (Redondo vd., 2019). İnsanlarda *C. jejuni*'nin neden olduğu hastalığı taklit eden iyi bir hayvan modelinin bulunmaması, *C. jejuni* patojenitesi ve enfeksiyona konakçı yanıtı konusundaki anlayışımızı açıkça sınırlamıştır (Young vd., 2007).

Campylobacter patojenitesi, virülans faktörlerine dayanmaktadır ve bu virülans faktörleri, doğaları gereği çok faktörlüdür ve bu bakterilerin hayatta kalma ve fizyolojik

strese direnme yetenekleri de patojenitesine katkıda bulunur. *Campylobacter* türleri tarafından sergilenen çeşitli virülansla ilgili mekanizmalar, invazif özellikleri, oksidatif stres savunmasını, toksin üretimini, demir alımını ve bunun yaşayabilir ancak kültürlenemez durumda kalma yeteneğini içerir. *Campylobacter* istilası, yapışması ve kolonizasyonu da bu bakteri gruplarının patojenitesine katkıda bulunur. *Campylobacter*'in diğer hastalık oluşturma faktörleri arasında; bazı protein setlerinin salgılanması, translokasyon yetenekleri ve flagella aracılı motilite yer alır (Igwaran vd., 2019).

Mide asitine duyarlı olduklarından kolayca imha olmaktadırlar. Ancak mide asitinin az olduğu durumlarda (ilaç, gıda vb. alımı ya da mide sekresyonunun azlığında) enfeksiyonun ortaya çıkması kolaylaşmaktadır (Murray vd., 2010).

Düşük bir enfektif dozun yutulmasından sonra, yaklaşık 500 organizma *Campylobacter, Campylobacter* istila antijenleri (Cia) adlı invaziv antijenleri de salgılayan kamçı yardımıyla bağırsak mukozasına yapışmaya ve kolonileşmeye başlar. *Campylobacter* türleri, fibronektine bağlanan dış zar proteini CadF salgılanarak bağırsak epitel hücrelerine yapışabilir. Çoğu bakterinin aksine, *C. jejuni* birçok klasik virülans faktörüne sahip değildir, ancak aderans, kolonizasyon ve istila ile bağlantılı 30'dan fazla proteinin N bağlı glikozilasyonunu gerçekleştiren tek patojendir (Dasti vd., 2010).

2.7. Epidemiyoloji

Dünya çapında bakteriyel kaynaklı gastroenterit nedeniyle, *Campylobacter* insan sağlığı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Gelişmiş ülkelerde, çoğu kampilobakteriyoz vakası az pişmiş, kontamine kümes hayvanlarının tüketimine bağlanır; bununla birlikte *Campylobacter*'lerin kontamine su, sığır eti ve süt gibi diğer yiyecekler yoluyla insanlara bulaşabileceği gösterilmiştir (Kelley vd., 2018).

Son on yılda kampylobakteriyoz insidansı incelenmiştir; Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya'da kampilobakteriyoz vakalarının sayısı artmıştır. Afrika, Asya ve Orta Doğu'dan gelen epidemiyolojik veriler hala eksiktir. Aynı ülke içerisindeki farklı bölgelerden rapor edilen insidans ve vaka sayısı arasındaki fark büyük ölçüde değişebilir. Biraz değişkenlik, kısmen, tespit metodolojilerinin ve alanın, popülasyonun

duyarlılığındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Ayrıca, bildirilen *C. jejuni ve C. coli* enfeksiyonu vakalarının, düşük raporlamaya bağlı olarak buzdağının sadece ucunu temsil etmesi muhtemeldir (Kaakoush vd., 2015). Aynı ülke içindeki farklı ülkelerden veya bölgelerden bildirilen vakaların görülme sıklığı ve sayısı önemli ölçüde değişebilir (Kaakoush vd., 2015).

Genel olarak, kampilobakteriyoz, önümüzdeki yıllarda küresel sağlıkta problem yaratabilecek en önemli bulaşıcı hastalıklardan biridir. Su kaynaklı hastalık salgınlarında, içme suyu ile ilgili ikna edici epidemiyolojik veriler olmasına rağmen *Campylobacter* nadiren şüpheli bir kaynaktan doğrudan tespit edilir. Bu durum, muhtemelen maruziyet ve semptomatik hastaların ortaya çıkışı arasındaki uzun gecikme ve bir kaynak aramak için mikrobiyolojik çalışmalara başlama kararı sebebiyledir. Başka bir neden, *Campylobacter* hücrelerinin örnekleme sırasında hala suda mevcut olmaları, ancak laboratuvar analizinden önce yaşayabilir ancak kültür edilemeyen forma girmeleri olabilir (Kaakoush vd., 2015; Pitkänen vd., 2008).

Su, *Campylobacter* türlerinin insanlara ve hayvanlara bulaşmasında etkili bir araçtır ve kirli su, farklı ülkelerdeki bir dizi salgından sorumludur. Dezenfekte edilmemiş su içmek, kampilobakteriyoz için önemli bir risk faktörüdür. Birçok çalışma, farklı su kaynaklarındaki *Campylobacter* türlerinin yaygınlığını değerlendirmiştir. İçme suyu kaynağı olarak belediye yüzey suyu sistemlerinden ziyade özel kuyuları kullanan bireyler, diğer raporlanabilir enterik hastalıklardan daha fazla kampilobakteriyoz riski altındadır. Bir su kaynağı olarak özel su kaynakları kullanan çiftliklerin sığırlarında *Campylobacter* olma olasılığı daha yüksektir, bu da kirlenmiş su kanalının *Campylobacter*'in evcil hayvanlara bulaşma aracı olduğunu gösterir. Gerçekten de, su oluklarının daha düzenli olarak boşaltılması ve temizlenmesi, sığırların *Campylobacter* tarafından kolonizasyon riskini azalttığını göstermiştir. Ayrıca, su kaynağının göl suyu olduğu ilkbaharda açık bir otlatma döneminden sonra sığırların *Campylobacter* için pozitif olma olasılıklarının, kışın içeride su kaynağının belediye klorlu musluk suyu olduğu zamana göre daha fazla olduğu bildirilmiştir. Açık su kirliliğine neden olan diğer kaynaklar yabani kuş dışkısı ve evcil hayvan atıklarıdır. Kirlenmiş suyun, *Campylobacter*lerin farklı konakçılara bulaşmasında yaygın bir faktör olabileceği göz önüne alınmalıdır (Kaakoush vd., 2015).

Campylobacter, birçok evcil veya vahşi hayvanın bağırsak mikrobiyotasının ortak bir üyesidir. Dolayısıyla, su kaynaklı kampilobakteriyoz salgınları fekal su kontaminasyonu ile yakından ilişkilidir (Chukwu vd., 2019; Pedati vd., 2019). Bu nedenle, dışkı kirliliğinin kaynağı en şüpheli enfeksiyon kaynağını temsil eder (Bartholomew vd., 2014).

İçme suyu bir takım kampylobakteriyoz sporadik salgınlarında rol oynamıştır. Ağırlıklı olarak salgınlar, arıtılmamış veya kontamine su tüketiminin bir sonucudur (St-Pierre vd., 2009a).

2000-2014 yılları arasında mikrobiyolojik açıdan güvenli suyun üretimi ve dağıtımı perspektifiyle içme suyu kaynaklı salgınlar üzerine yapılan bir derlemede, salgınlar ham su kontaminasyonu, arıtma eksiklikleri ve dağıtım şebekesi arızaları olarak kategorize edilir. Kontaminasyonun ana nedenleri şunlardır: yeraltı suyu, hayvan dışkısının veya şiddetli yağmurun karıştığı atık su, atık suyun su kaynağına deşarjı, artan bulanıklık ve renk, arıtma tesislerinde dezenfeksiyon ekipmanının arızalanması, dağıtım sistemlerinin, çapraz bağlantıların bozulması, boru kopmaları ve atık suların ağa girmesidir. (Moreira & Bondelind, 2017).

Kontamine olmuş içme suyu, kampilobakteriyoz salgınlarının önemli bir nedeni olarak tanımlanmıştır. Su kaynaklı salgınların ve vakaların tespiti artmaktadır. Bu salgınlardaki vaka sayısı, klorsuz veya yetersiz klorlu yüzey su kaynakları ve yabani kuşların su depolama rezervuarlarındaki fekal kontaminasyonu gibi nedenlerle birkaç ila birkaç bin arasında değişmektedir. Su kaynaklı bulaşma, aynı suşların hastalardan izole edilmesi ve tükettikleri içme suyuyla doğrulanmıştır (World Health Organization, 2017).

Campylobacter'lerin su kaynaklarında hayatta kalabileceği bilinmesine rağmen, organizmanın değişen çevresel koşullar altında bunu nasıl yapabileceği iyi anlaşılamamıştır. Gelişmekte olan ülkelerde birçok insan enfeksiyonu kirli sudan kaynaklanır ve gelişmiş ülkelerde da ortaya çıkabilir. Bu nedenlerden dolayı, *Campylobacter*'i su örneklerinden izole etmek, *Campylobacter*'in çeşitli çevresel kaynaklardan bulaşını izlemek için önemlidir. Bu, *Campylobacter*'i izole etmek için su örneklerinin vakumla filtrelenmesi ve seçici besiyeri kullanılarak yapılır. Bu yöntem

ayrıca çeşitli su kaynaklarının *Campylobacter* yükünü ölçmek için bir seyreltme algoritması kullanır (Kelley vd., 2018).

İçme suyu kontaminasyonu bazı kampylobakteriyoz sporadik salgınlarında gösterilmiştir. Ağırlıklı olarak salgınlar, arıtılmamış veya kontamine su tüketiminin bir sonucudur (Whiley vd., 2013).

Campylobacter spp. atık su arıtma tesislerinden deşarj, yağmur sonrası meralardan akıntı, enfekte hayvan veya insanlardan dışkı ile doğrudan kontaminasyon nedeniyle dereler, nehirler ve göller gibi doğal sularda yaygındır. *Campylobacter*'lerin neden olduğu su kaynaklı salgınlar, özellikle içme suyu temini için yaygın olarak kullanılan yeraltı suyu kaynaklarının klorlanmadığı ülkelerde bildirilmektedir (Ferrari vd., 2019).

Dünya çapında güvenli içme suyuna erişim hedeflerden biridir, ancak su örneklerinin düzenli analizinden elde edilen rapor, güvenli olmayan içme suyunun insan hastalığı için sekiz numaralı risk faktörü olarak kaldığını göstermiştir. Çalışmalar ayrıca ev muslukları, sondaj kuyuları ve iyileştirilmiş su kaynaklarının tamamen dışkı kontaminasyonundan arınmış olmadığını göstermiştir. Yüksek gelirli ülkelerde, su bazen hatalı pompalar ve borularla kirlenirken, düşük gelirli ülkelerde insanların çoğu genellikle yiyecek hazırlama, çamaşır yıkama, içme suları için genellikle akarsulara, göllere ve diğer yüzey suyu kaynaklarına güvenmektedir. Su kaynaklı enfeksiyon olasılığını arttıran insan veya hayvan dışkısıdır. Bununla birlikte, rekreasyon amaçlı kullanılan bazı çevresel kaynaklar genellikle hastalık bulaşma yolu olarak göz ardı edilmektedir. Su, *Campylobacter*'lerin insanlara bulaşmasının, ayrıca kontamine gıda/musluk suyu tüketimi yoluyla ve kuyu suyu dahil diğer su kaynaklarının *Campylobacte*r salgınlarına neden olduğu bildirilmiştir. Plaj ve nehirden alınan su örneklerinde tespit edilen patojenik *Campylobacter* türlerinden bazıları *C. coli, C. jejuni* ve *C. lari*'dir. Bu bakterilerin izole edildiği diğer su kaynakları arasında göletler, akarsular, göller, çocuk çocuk havuzu, yeraltı suyu ve deniz suyu bulunmaktadır (Igwaran & Okoh, 2019).

2.8. Tedavi

Campylobacter gastroenteriti vakalarının çoğu kendi kendini sınırlar ve antibakteriyel tedavi gerektirmeden çoğu vaka iyileşmektedir. (Özkuyumcu, 2009). Bununla birlikte, immün sistemi baskılanmış hastalarda, semptomları şiddetli veya kalıcı olan hastalarda ve ekstraintestinal enfeksiyonları olanlarda antibiyotikler kullanılmaktadır (Kaakoush vd., 2015). Bir florokinolon olan siprofloksasin, özellikle seyahatle ilgili vakalarda gastroenteritin ampirik tedavisi için sıklıkla kullanılır. Bununla birlikte, kampilobakteriyoz durumunda, makrolidler tercih edilen tedavi seçeneğidir. Ancak hayvancılık sektöründe ve klinikte yoğun kullanımı nedeniyle makrolidlere karşı direnç gelişmektedir. İnsanlarda şiddetli *Campylobacter* enfeksiyonu durumunda, aminoglikositlerle (örneğin gentamisin veya kanamisin) tedavi yaygın olarak kullanılmaktadır (Kaakoush vd., 2015).

2.9. Korunma

Bir su güvenliği planı dahilinde, *Campylobacter'*lerden kaynaklanabilecek potansiyel riski yönetmek için uygulanabilecek kontrol önlemleri, ham su kaynaklarının insanlardan ve hayvanlardan gelen atıklardan korunması, içme suyu üretimini daha az maliyetli su arıtımı gerektiren bir şekilde yapılması alınacak ilk önlemlerden biridir. Birçok *C. jejuni* enfeksiyonları vakaları, atık su altyapısı ile içme suyu çapraz bağlantısı ile ilişkilidir (Pitkänen, 2013). Herhangi bir dışkı kontaminasyon kaynağının kuyuya yakın olmaması ve yüzey suyunun kuyuyu kirletmemesi (örn. şiddetli yağmur/selden sonra) önemlidir. Arıtılmış ve dezenfekte edilmiş su depoları kuş dışkısından korunmalıdır. *Campylobacter'*ler dışkı yoluyla taşınan patojenlerdir ve dezenfeksiyona karşı dirençli değildir. Bu nedenle, içme suyu kaynaklarında *E. coli* (veya termotoleran koliformlar) saptanması *Campylobacter* türlerinin varlığı için uygun bir göstergedir. Dağıtılan içme suyundaki kalıntı klor konsantrasyonunun korunması, merkezi su kaynakları ve dağıtımı olan bölgelerde su kaynaklı *Campylobacter* enfeksiyonlarının sayısını azaltmak için kritik kontrol tedbirleridir (World Health Organization, 2017).

Campylobacter'lerin yükünü azaltmak için gıda zinciri boyunca genel olarak kabul edilen iyi hijyen uygulamaları izlenmelidir. Hijyenik gıda hazırlama için uygun el yıkama tesisleri, tuvaletler ve temiz su mevcudiyeti gıda üretiminde ve ilgili işleme

alanlarında (gıda işleme yüzeylerinin ve aletlerinin, ellerin vb. temizlenmesi için) yüksek kalitede su gerektirir. Ayrıca, mutfağın temiz tutulması, yiyeceklerin iyice pişirilmesi ve güvenli sıcaklıklarda muhafaza edilmesi gerekir (National Institute of Health and Welfare vd., 2019; Topçu vd., 2008).

Doğal konakçıların bakteriyel kolonizasyonunu azaltmaya yönelik çalışmalar, kontrol önlemleri daha başarılı olabilir (National Institute of Health and Welfare vd., 2019).

BÖLÜM 3

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Alınması ve Taşınması

Su örnekleri, 500 ml'lik içine 10 mg sodyum tiyosülfat ilave edilmiş steril, polipropilen (PP) şişelere (Mos Lab, Türkiye) alındı. Örnek alma işleminde tarih, saat ve alınan yer tanımı yapıldı. Numune alırken; filtre ve musluk ağızlığı gibi aparatlar çıkarıldı, musluk ağzı alkol veya alev ile dezenfekte edilip musluk açıldı, 2-3 dk akıtılıp şişe 1/10 boşluk kalacak şekilde doldurulduve dikkatlice kapağı kapatıldı. Ayrıca örneğin alındığı her istasyonun başında serbest klor ölçümü yapıldı. Örnekler alındıktan sonra soğuk zincirde laboratuvara ulaştırmak için buz akülü saklama kabına konuldu. Hemen çalışma imkanı olmayan sular +4°C'de en fazla 24 saat bekletildi.

3.2. Serbest Klor Ölçümü

3.2.1. Kullanılan Ekipman ve Reaktifler

Serbest klor ölçüm cihazı (Permodid Comparator P:777,Türkiye) ve ortotoluidin solüsyonu.

3.2.2. Yöntem

Komperatör tüpünün temizliğini kontrol edildikten sonra içindeki cam tüp üstten 1 cm boşluk kalıncaya kadar su ile doldurulduu. Tüpteki suya 3 damla ortotoluidin solüsyonu damlatıldı ve tüpün ağzını parmakla kapatılarak 5-6 kez çalkalanarak komparatörün yuvasına yerleştirildi. Tüpteki suyun rengi, komparatörün sol tarafında

bulunan renk diskindeki skaladan bulunarak su örneğinin klor miktarı ppm cinsinden gösteren rakam okundu.

3.3. Alınan Örneklerden Membran Filtrasyon Yöntemiyle *Escherichia coli*'nin Araştırılması ve Sayımı

3.3.1. Kullanılan Ekipman

Membran filtrasyon sistemi (Sartorius, Almanya) 36±2°C'ye ayarlanabilen inkübatör (Elektromag M 420 BP, Türkiye), 44±0,5°C'ye ayarlanabilen inkübatör (Nüve N120, Türkiye), otoklav (Tecno-Gaz Andromeda Plus XP, İtalya), sterilizatör (Nüve FN500, Türkiye), 3-3,5 ml'ye ayarlanabilen dozajlı şırınga (NJ Phillips, Avustralya), -20°C'ye ayarlanabilen dondurucu dolap (Fiocchetti Superfreezer 300, İtalya), buzdolabı (Arçelik 3021 EC, Türkiye), hassas terazi (Gibertini EU-250,İtalya), manyetik karıştırıcılı ısıtıcı (Stuart SB162, İngiltere), koloni sayacı (Fisher 133-8001A), Bunzen beki, pH metre (Delta Ohm HD2105.1, İtalya), petri kabı (90 mm), 1ml ve 10 ml'lik cam pipetler, 16x160 mm cam tüpler, öze, mezür (500 ml) ve cam balon (1 lt) çalışmada ekipman olarak kullanıldı.

3.3.2. Kullanılan Besiyeri, Seyreltici ve Reaktifler

3.3.2.1. Kromojenik Koliform Besiyeri

Ticari olarak Chromogenic Coliform (Sartorius 14049) besiyeri, ISO 9308-1: 2014 standardına uygun olarak hazırlanmış, özel bir kartona emdirilmiş, kurutulmuş halde bulunan ve 3-3,5 ml steril su ile ıslatıldığında hazır hale gelen besiyeridir. Ayrıca besiyeriyle birlikte 0,45 µm porları olan 50 mm çapında selüloz nitrat membran filtreleri bulunmaktadır.

3.3.2.2. Tuzlu Peptonlu Su

NaCl	8,5 g
Peptone from meat	1 g
Distile su	1000 ml

Bir seyreltme çözeltisi olan tuzlu peptonlu su, ticari olarak temin edilen Peptone from Meat Pancreatic (Merck 1.07214) 1g ve NaCl (Merck 1.06404) 8,5 g 1000 ml damıtık su içinde eritildi ve tüplere 9 ml dağıtılıp, otoklavda (Tecno-Gaz Andromeda Plus XP, İtalya), 121ºC'da 15 dakika sterilize edildi. Berrak renkteki çözelti kullanılıncaya kadar +4ºC'da muhafaza edildi.

3.3.2.3. Triptofan Sıvı Besiyeri

Peptone from casein	10,0 g
NaCl	5 g
Distile su	1000 ml

Ticari olarak temin edilen Tryptone Water (Merck 1.10859) dehidre besiyeri, 15,0 g/l olacak şekilde damıtık su içinde çözüldü, tüplere 10'ar ml dağıtılıp otoklavda 121ºC'da 15 dakika sterilize edilidi. 25ºC'da pH'sı 7,3±0,2'ye ayarlanıp hazırlanan berrak ve sarımsı besiyeri kullanılıncaya kadar +4ºC'da muhafaza edildi.

3.3.2.4. Kovac's Reaktifi

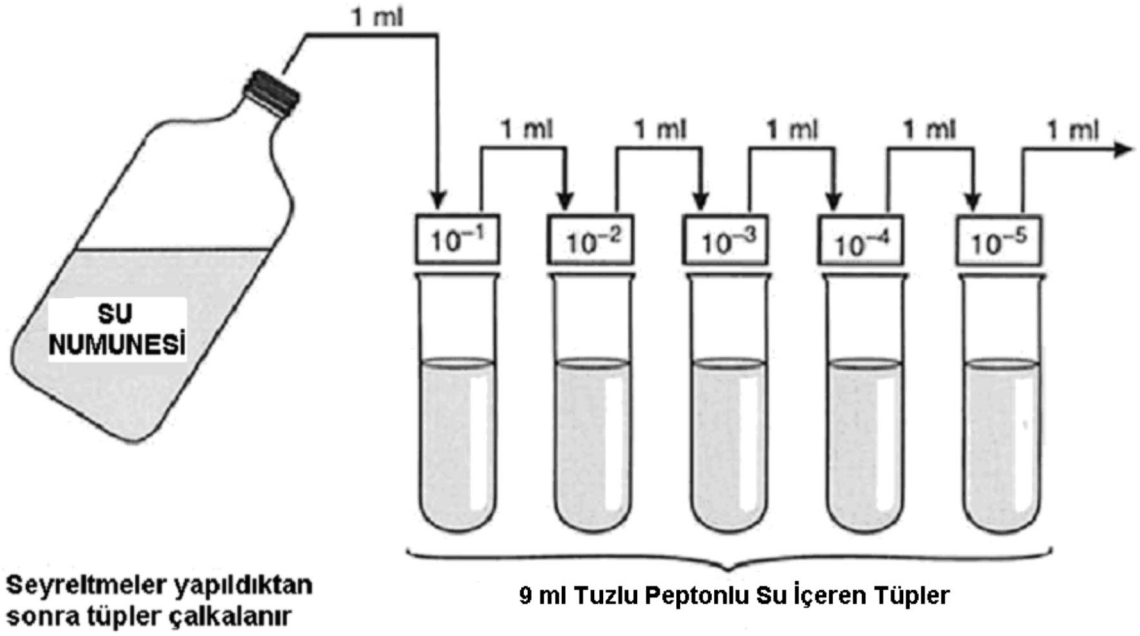
Ticari olarak temin edilen Kovacs' İndol Çözeltisi (Merck 1.09293) (kullanıma hazır, bileşiminde n-Butanol, hydrochloric acid ve 4-dimethylaminobenzaldehyde bulunan) +4ºC'da muhafaza edildi.

3.3.3. Yöntem

Campylobacter cinsi bakteriler suda doğal olarak bulunmayıp insan ve hayvan dışkısından karıştığı için çalışmalarda mikrobiyal kirliliği gösteren bir bakteriye ihtiyaç duyulmuştur (Paruch vd., 2020; World Health Organization, 2017). *C. jejuni, C. coli* ve *C. lari* türlerinin tespit etme ihtimalini artırmak için öncelikle sularda dışkı bulaşının kesin göstergesi olan *Escherichia coli*'nin varlığı araştırıldı. "ISO 9308-1: 2014 *E. coli* ve koliform bakterilerin tespiti ve sayımında düşük bakterili zemin floralı sular için membranla süzme yöntemi" esaslarına göre çalışılmıştır. ISO 9308-1: 2014'ün bu bölümü, *E. coli* ve koliform bakterilerin tayini ve sayımı için bir yöntemi kapsar. Bu yöntem, membranla süzme işlemine, takiben kromojenik bir koliform agar besi yerinde

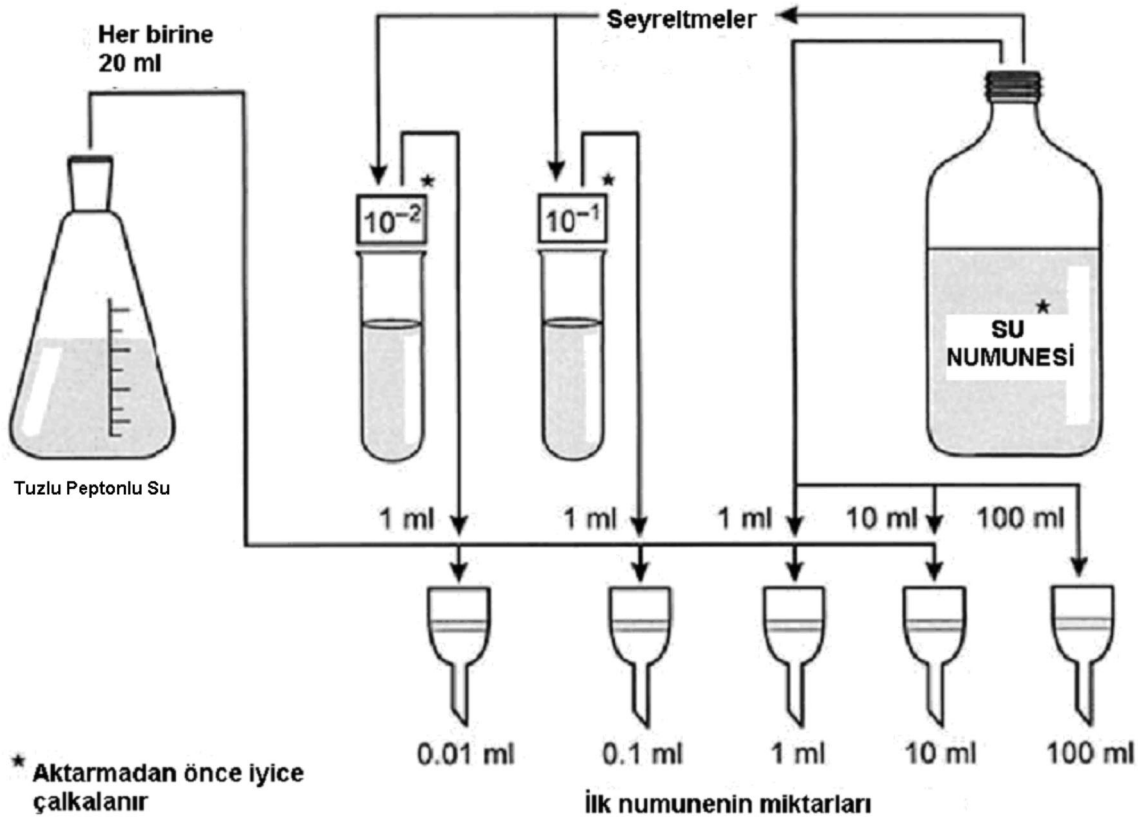
kültür yapılmasına ve numunedeki hedef organizmaların sayısının hesaplanmasına dayanır (ISO 9308-1, 2014).

Bunun için Chromogenic Coliform kullanıma hazır kurutulmuş besiyeri (ped besiyeri), bir dozajlı şırınganın ucuna takılan 0.2 µm por çapındaki sterilizasyon filtresi (Minisart NML 16534-K, Almanya) ile sterilize edilen 3-3,5 ml deiyonize su ile sulandırıldı. Membran filtrasyonla çalışmak üzere membran filtre sistemi hazır hale getirildi. *E. coli*'nin araştırılması ve sayımı için, 500 mililitrelik sodyum tiyosülfatlı plastik şişeler (Mos Lab, Türkiye) iyice çalkalandıktan sonra 100 ml su örneği 0.45 µ porları olan 50 mm çapındaki selüloz nitrat membran filtreden (Sartorius, Almanya) süzüldü. Membran filtre altta hiçbir hava kabarcığı kalmayacak şekilde ve ters çevrilmeden Chromogenic Coliform besiyerine yerleştirildi. Bu şekilde hazırlanmış Petriler 21±3 saat boyunca 36±2°C sıcaklıkta inkübe edildi. Bu besiyerinde 36ºC'deki Petride mavi-mor renk oluşturan tüm koloniler doğrudan *E. coli* olarak sayıldı. Koloni renginde şüpheye düşüldüğü durumlarda indol testi yapıldı. İndol testinde, triptofan içeren sıvı besiyerine tek koloniden ekim yapıldı ve 21±3 saat boyunca 44±0.5°C sıcaklıkta inkübe edildi. Bu sürenin sonunda sıvı besiyerine 0,2-0,3 ml Kovac's reaktifi konarak indol üretimi kontrol edildi. Besiyeri üzerinde pembe-kırmızı halka oluşumu varsa indol (+) olarak değerlendirilirip şüpheli kolonilerin *E.coli* olduğu doğrulandı. Eğer Petrideki mavi-mor ve istenmeyen kolonilerin sayısı 100'den fazla ise koloniler sayılabilecek duruma gelene kadar seyreltme yapılarak işlem tekrarlandı. Seyreltme işlemi için tuzlu peptonlu su kullanarak su örneğinden cam tüplerde bir seri seyreltme hazırlandı (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Seyreltme serilerinin hazırlanması (Berberoğlu, 2012).

Seri seyretmelerden ekim yaparken mikroorganizmaların membran üzerine eşit dağılabilmesi için filtre sistemindeki hunilere 20 ml tuzlu peptonlu su ilave edildi (Şekil 3.2.). Her bir su örneği için ne kadar seyreltmenin yapılacağı ilk ekimden sonraki koloni yoğunluğuna göre karar verildi. Seri seyreltmelerden yapılan ekimlerden koloni sayısı 100'ün altında olan seyreltme faktörü en düşük Petri kabı değerlendirmeye alınarak sayımları yapıldı.



Şekil 3.2. Seyreltme serilerinden membran filtrasyon işleminin yapılması (Berberoğlu, 2012).

3.4. Termofilik *Campylobacter* Türlerinin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) ile Analizi

Bu yöntemle hedef organizmalar olan *E. coli'*nin tespit edildiği örneklerden termofilik *Campylobacter* araştırması için toplanıp en fazla bir ay süreyle -20°C'de derin dondurucuda bekletildi. *Campylobacter* cinsi bakterilerin dondurulduğunda genetik materyalinin 2 ile 5 ay arasında dayanabildiği çalışmalarla gösterilmiştir (Cools vd., 2003). Bu bakterilerdeki sağkalımın, düşük sıcaklıklarda, özellikle 4°C civarında arttığı belirlenmiştir. Suda *C. jejuni* için önceden belirlenmiş hayatta kalma süreleri çok değişkendir, 2- 4 hafta hatta 4 ay olabilmektedir (Bui, 2012).

Bu süre sonunda toplanıp -20°C'de bekletilen örnekler oda ısısında eridikten sonra 250 ml su örneği 0,20 µm por çapında selüloz nitrat membrandan (Sartorius, Almanya) süzülerek yoğunlaştırıldı ve DNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra iki farklı ticari kit ile termofilik *Campylobacter* türleri araştırıldı. Önce *Mericon* Campylobacter Triple Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak multiplex qPCR yöntemi ile *C. jejunu, C.*

coli ve *C. lari*'nin tespiti için çalışıldı. Daha sonra *C. jejuni* Standart Kit (Genesig, ABD) kullanılarak miktarı tespit edildi.

3.4.1. Kullanılan Ekipman ve Malzemeler

DNA izolasyonu için; 15 ml tüp için santrifüj (Hermle Z216M, Almanya) (≤ 4000xg), membran filtrasyon sistemi (Sartorius, Almanya), mikrosantrifüj (Hermle Z216M, Almanya) (13000xg), ayarlanabilen pipetler, vorteks ve vorteks adaptörü (Biobase MX-S, Çin), 0,20 µm selüloz nitrat membran filtre (Sartorius, Almanya) kullanılmıştır. Ayrıca DNeasy Power Water kitinde (Qiagen, Almanya) bulunan 5 ml'lik Power Water DNA tüpü, PW1, PW3 ve PW4 solüsyonu, 2 ml'lik toplama tüpü, IRS solüsyonu, MB Spin Kolon Filtresi, etanol ve elüsyon buffer kullanılmıştır.

Mericon Campylobacter Triple Kit (Qiagen, Almanya) ve *C. jejuni* Standart Kit (Genesig, ABD) kullanımı için; ayarlanabilen pipetler, filtreli pipet uçları, termal döngü için 96'lı PCR plastik plakları ve bu plakları kapatmak için ısıya dayanıklı filmler (Thermo-Fisher, ABD), portüp, mikrosantrifüj, vorteks, soğutmalı yükleme bloğu kullanılmıştır.

3.4.2. DNA İzolasyonu

Su örneklerinden DNeasy Power Water Kiti (Qiagen, Almanya) ile DNA izolasyonu aşağıdaki sıraya göre tamamlandı:

1- 250 ml su örneği vakum kaynağına bağlı bir filtre hunisi (Sartorius, Almanya) kullanılarak 50 mm çapında ve 0.20 µm porları olan selüloz nitrat membrandan (Sartorius, Almanya) filtrelendi. Membran filtrenin üst kısmı içeri doğru bakacak şekilde bir iki steril forseps kullanılarak silindir haline getirilip 5 ml Power Water DNA tüpüne yerleştirildi.

2- Power Water DNA tüpüne 1 ml Solüsyon PW1 eklendi.

3- Tüp yatay olarak vortex adaptörüne sabitlendi ve 5 dk boyunca maksimum hızda vortekslendi.

4- Oda sıcaklığında 1 dakika boyunca ≤ 4000 x g tüpler santrifüjlendi.

5- Süpernatant temiz bir 2 ml toplama tüpüne aktarıldı.

6- Oda sıcaklığında 1 dakika 13.000 x g'de santrifüj edildi.

7- Süpernatant temiz bir 2 ml toplama tüpüne aktarıldı.

8- Solüsyon IRS'den 200 µl eklendi ve karıştırmak için kısaca vortekslendi.

9- 5 dakika boyunca 2–8°C'de inkübe edildi ve 1 dakika boyunca 13,000 x g'de tüpler santrifüjlendi.

10- Süpernatant temiz 2 ml'lik bir toplama tüpüne aktarıldı.

11- Karıştırmak için 650 µl Solüsyon PW3 eklendi ve kısaca vortekslendi.

12- Bir MB Spin kolon üzerine 650 µl süpernatant yüklendi ve 1 dakika boyunca 13.000 x g'de santrifüjlendi. Tüm süpernatant işlenene kadar bu işlem tekrarlandı.

13- MB Spin Kolon Filtresi temiz bir 2 ml toplama tüpüne yerleştirildi.

14- PW4 solüsyonundan 650 µl eklendi ve 1 dakika boyunca 13,000 x g'de santrifüjlendi.

15- Akışkan kısım atılıp 650 µl etanol eklendi 1 dakika 13.000 x g de santrifüjlendi.

16- Akışkan kısım atılıp 2 dakika boyunca tekrar 13,000 x g'de santrifüjlendi.

17- MB Spin kolonu temiz 2 ml'lik bir toplama tüpüne yerleştirildi.

18- Filtre membranın merkezine 20 µl Solüsyon EB eklendi ve 1 dakika boyunca 13,000 x g'de santrifüjlendi.

19- MB Spin kolonu atıldı ve izole edilen DNA qPCR uygulaması yapılana kadar -20°C'da saklandı.

3.4.3. Multiplex qPCR

Campylobacter türlerinin tanımlanması amacıyla ABI 7500 Fast (Apllied Biosystems, ABD) cihazı ve *Mericon* Campylobacter Triple Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak multiplex qPCR yöntemi ile *C. jejunu, C. coli* ve *C. lari'*nin tespiti yapıldı. PCR reaksiyon karışımı son hacim 20 µl olacak şekilde 10,4 µl $MgCl_2$; dATP, dCTP, dGTP ve dTTP'nin içeren dNTP çözeltisi, primerler, HotStarTaq Plus DNA polimeraz ve 9,6 µl örnek DNA kullanılarak hazırlandı. Toplam örnek DNA hacmi 20 µl olduğundan çıkan sonuçlar 20 µl üzerinden hesaplanmıştır. HotStarTaq Plus DNA Polimeraz, Taq DNA Polimeraz'ın modifiye edilmiş bir şeklidir. Ortam sıcaklığında enzimatik aktivitesi yoktur. Böylece reaksiyon kurulumu ve ilk denatürasyon adımı sırasında yanlış primer ürünlerin ve primer dimerlerinin oluşumu önlenir. Ek olarak, ana karışımdaki polimeraz derişimi, her PCR döngüsünün kombine bağlanma/uzama

adımında kısa uzama sürelerine izin verecek şekilde optimize edilmiştir. Ayrıca DNA amplifikasyonunu kolaylaştıran ve inhibitörlerin varlığında multiplex qPCR verimini arttıran 1040 µl Multiplex PCR Master Mix içeriği kullanılmıştır. Bunun haricinde PCR ile ilişkili olmayan floresan sinyalindeki hataları telafi etmek amacıyla 43,3 µl ROX pasif referans boyası kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak DNaz-RNaz içermeyen deiyonize su kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak son hacim 20 µl olacak şekilde 10,4 µl $MgCl_2$; dATP, dCTP, dGTP ve dTTP'nin içeren dNTP çözeltisi, primerler, DNA polimeraz ve 9,6 µl pozitif kontrol DNA kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlanmıştır (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. *Mericon* Campylobacter Triple Kit (Qiagen, Almanya) Reaksiyon Karışımı.

Bileşen	**Örnek**	**Pozitif PCR Kontrol**	**Negatif PCR Kontrol**
Reaksiyon Karışımı	10.4 µl	10.4 µl	10.4 µl
Örnek DNA	9.6 µl	-	-
Pozitif Kontrol DNA	-	9.6 µl	-
Negatif Kontrol	-	-	9.6 µl
Toplam Hacim	20 µl	20 µl	20 µl

Deney için tasarlanan PCR primerleri spesifiktir ve test edilen patojen genomunun biyoinformatik ve deneysel olarak doğrulanmış benzersiz ve korunmuş bir DNA bölgesini hedefler. Çapraz reaktivite biyoinformatik olarak araştırılmış ve her bir PCR testi için seçilen hedeflerden oluşan bir panel ile test edilmiştir. PCR analiz probları, bir florofor ve bir susturucu eklenmiş sekansa özgü oligonükleotitlerdir.

Kurulum sırasında tüm örnekler ve reaksiyon tüpleri buz üzerinde tutularak hazırlanan PCR tüpleri kapatılıp termal döngü cihazının (ABI 7500 Fast, Almanya) reaksiyon haznesine yerleştirilmiştir. qPCR cihazı, döngü protokolüne göre programlanmıştır (Çizelge 3.2.). qPCR çalışması başlatılıp sonuçlar analiz edilmiştir. *Mericon* Campylobacter Triple Kit (Qiagen, Almanya); *C. jejuni, C. coli* veya *C. lari* DNA'sını bir reaksiyonda en az 10 kopyasını tespit edebilir.

Çizelge 3.2. Multiplex qPCR'da Isı Döngü Programı.

Isı Döngü Programı			
Yorum	**Zaman**	**Derece**	**İşlem Basamağı**
DNA Polimeraz enziminin aktivasyonu	5 dk	95°C	İlk Denatürasyon
40 Döngü	15 sn	95°C	Denatürasyon
	23 sn	60°C	Primerlerin Bağlanması
	10 sn	72°C	Uzama

3.4.4. *C. jejuni* Standart Kit ile qPCR

*C. jejuni'*nin hem varlığını hemde miktarını diğer iki türün varlığı ve miktarından ayırmak için bu aşamada ikinci bir kit olan *C. jejuni* Standart Kit (Genesig, ABD) kullanılmıştır. *C. jejuni*, standart kit miktarı belli olan (µl'de $2x10^5$ kopya) pozitif kontrol içermektedir. Böylece çalışmada bundan sonraki örneklerde *C. jejuni'*nin varlığı ve miktarı tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu pozitif kontrol *Mericon* Campylobacter Triple Kit (Qiagen, Almanya) için de kılavuz olarak kullanılmış ve üç türün de miktarını analiz etme imkânı sağlamıştır. *C. jejuni* Standart Kit (Genesig, ABD) reaksiyon karışımı Çizelge 3.3.'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. *C. jejuni* Standart Kit (Genesig, ABD) Reaksiyon Karışımı.

BİLEŞEN	**ÖRNEK**	**POZİTİF PCR KONTROL**	**NEGATİF PCR KONTROL**
Reaksiyon Karışımı	15 µl	15 µl	15 µl
Örnek DNA	5 µl	-	-
Pozitif Kontrol DNA	-	5 µl	-
Negatif Kontrol	-	-	5 µl
Toplam Hacim	20 µl	20 µl	20 µl

Kit, geniş bir tespit profiline sahip olacak şekilde tasarlanmıştır. Kullanılan primerler hedef bölgeler ile % 100 uyumludur. Bu hedef bölgeler NCBI veri tabanında

C. jejuni suşunun tespiti için CP000814.1, AL111168.1, CP000025.1, AF104303.1, CP000538.1, CP000768.1, AF104302.1 erişim numaraları ile kaydedilmiştir.

Gerçek zamanlı PCR'da *C. jejuni*'ye özgü sağlanan bir primer ve prob karışımı, FAM (6-karboksiflofesein) kanalı yoluyla tespit edilmektedir. Sağlanan primer ve prob karışımı, TaqMan® prensibinden yararlanır. PCR amplifikasyonu sırasında, ileri ve geri primerler *C. jejuni* DNA'sına hibridize olur. 5'-raportör ve 3'-susturucu ile etiketlenmiş bir DNA probundan oluşan aynı reaksiyon karışımına bir floresan prob dahil edilmiştir. PCR amplifikasyonu sırasında, prob yıkılır ve raportör ile baskılayıcı boya birbirinden ayrılır. Sonuçta ortaya çıkan floresan ışıma her bir döngüde artar ve üssel artış qPCR cihazı tarafından pozitif kontrol ile kıyaslanarak tespit edilebilir.

Pozitif kontrol için, her bir konsantrasyon 1/10 olacak şekilde beş nokta seyreltme serisi hazırlanmıştır. Her bir örnekten 5 µl kullanılmıştır. Kitin içindeki pozitif kontrol µl'de $2x10^5$ kopya içerdiği için; PK1 500000 kopya, PK2 (PK1/10) 50000 kopya, PK3 (PK2/10) 5000 kopya, PK4 (PK3/10) 500 kopya ve PK5 (PK4/10) 50 kopya içermesi gerekmektedir. Negatif kontrol için, RNaz / DNaz içermeyen su kullanılmıştır. Negatif bir sonuç, reaktiflerin çalışma sırasında kontamine olmadığını gösterir. Isı döngü programı Çizelge 3.4.'te verilmiştir.

Çizelge 3.4 . *C. jejuni* Standart Kit (Genesig, ABD) Isı Döngü Programı.

ISI DÖNGÜ PROGRAMI		
İŞLEM BASAMAĞI	**ZAMAN**	**SICAKLIK**
Enzim Aktivasyonu	2 dk	95°C
50 Döngü	10 sn	95°C
	60 sn	60°C

BÖLÜM 4

SONUÇLAR

Termofilik *Campylobacter* türlerinin araştırması için 2019 yılında Ocak ayından başlayıp Aralık ayının sonuna kadar Edirne il merkezi, 8 ilçe merkezi ile 260 kırsal bölgeden (köy, belde, özel işletme vb.) içme ve kullanma amacıyla kullanılan şebekeden toplam 455 istasyondan 1644 su örneği toplanmıştır (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. İçme ve kullanma amacıyla su örneklerinin toplandığı bölgeler (https://webdosya.csb.gov.tr).

Toplanan 1644 su örneğinin % 38'i il ve ilçe merkezlerinden, % 62'si kırsal bölgeden alınmıştır (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. Ocak-Aralık 2019 tarihleri arasında, Edirne il merkezi, ilçeleri ve köylerinden içme ve kullanma amacıyla kurulmuş şebekeden alınan su örnekleri.

İstasyon No.	Ocak	Şubat	Mart	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim	Kasım	Aralık
1. İlçe Merkezi	17	23	15	33	23	27	45	21	37	35	14	24
Kırsal Kesim	22	28	13	3	5	12	9	12	12	7	5	1
2. İlçe Merkezi	3	6	4	11	5	4	4	7	11	5	9	6
Kırsal Kesim	12	15	14	12	10	8	26	8	16	20	14	12
3. İlçe Merkezi	5	18	18	6	4	3	3	3	15	3	8	6
Kırsal Kesim	21	21	20	4	8	17	21	23	25	10	3	19
4. İlçe Merkezi	4	1	3	3	0	1	2	2	2	2	1	8
Kırsal Kesim	13	9	5	8	4	3	11	8	8	12	3	4
5. İlçe Merkezi	0	0	2	0	1	3	1	2	2	0	1	0
Kırsal Kesim	12	7	16	2	1	8	9	13	13	4	1	4
6. İlçe Merkezi	4	4	1	4	5	7	3	1	1	1	3	3
Kırsal Kesim	12	7	4	12	9	9	31	4	4	13	5	4
7. İlçe Merkezi	1	2	2	2	0	1	2	2	2	1	2	1
Kırsal Kesim	9	13	1	1	4	0	17	3	3	0	3	1
8. İlçe Merkez	1	0	2	0	2	1	0	3	3	1	1	1
Kırsal Kesim	20	16	16	9	5	4	12	10	10	16	12	5
9. İlçe Merkezi	0	3	2	0	7	4	10	2	2	1	2	1
Kırsal Kesim	2	5	8	6	5	4	0	5	5	5	0	3
Toplam	**158**	**178**	**146**	**116**	**98**	**116**	**206**	**129**	**171**	**136**	**87**	**103**

4.1. *E. coli'*nin tespiti

"ISO 9308-1: 2014 *E. coli* ve koliform bakterilerin tespiti ve sayımında düşük bakterili zemin floralı sular için membranla süzme yöntemi" esaslarına göre yapılan çalışmada 2019 yılında alınan 1644 su örneğinden 67 adet (toplanan örnek miktarının % 4'ü) örnekte *E. coli* tespit edilmiştir (Çizelge 4.2.). 67 adet *E. coli* örneği yıl içinde 37 istasyondan 1 defa, 12 istasyondan 2 defa ve 2 istasyondan 3 defa olmak üzere toplam 51 farklı istasyondan tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. *E. coli* tespit edilen örneklerin bölgelere göre dağılımı.

***E. coli* tespit edilen bölge**	***E. coli* tespit edilen örnek sayısı**
1. İlçe	22
2. İlçe	9
3. İlçe	7
4. İlçe	3
5. İlçe	1
6. İlçe	10
7. İlçe	3
8. İlçe	5
9. İlçe	7
Toplam	**67**

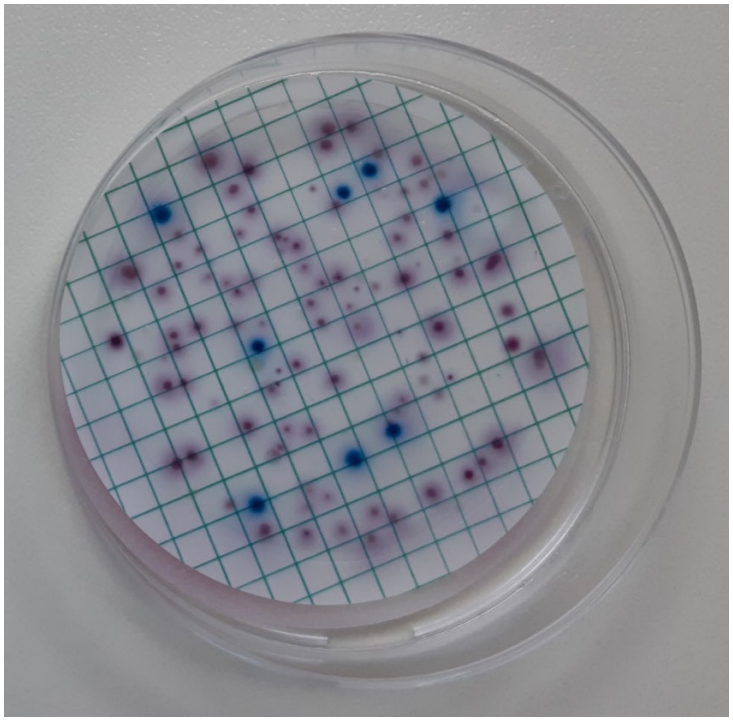
E. coli tespit edilen örneklerin (Çizelge 4.3.) tamamı yer altı suyu olup herhangi bir arıtma işleminden geçirilmemiştir ve sadece 34 nolu örnekte 0,3 ppm serbest klorun olduğu, diğer örneklerin tamamının serbest klor miktarının 0 ppm olduğu tespit edilmiştir. Çizelge 4.3.'teki 17 numaralı örnekte (Şekil 4.2.) sayılabilir ve 58 numaralı örnekte (Şekil 4.3.) sayılamayan (100'den fazla) mavi mor renkteki *E. coli* kolonileri görülmekterdir.

Çizelge 4.3. *E. coli* tespit edilen örnekler.

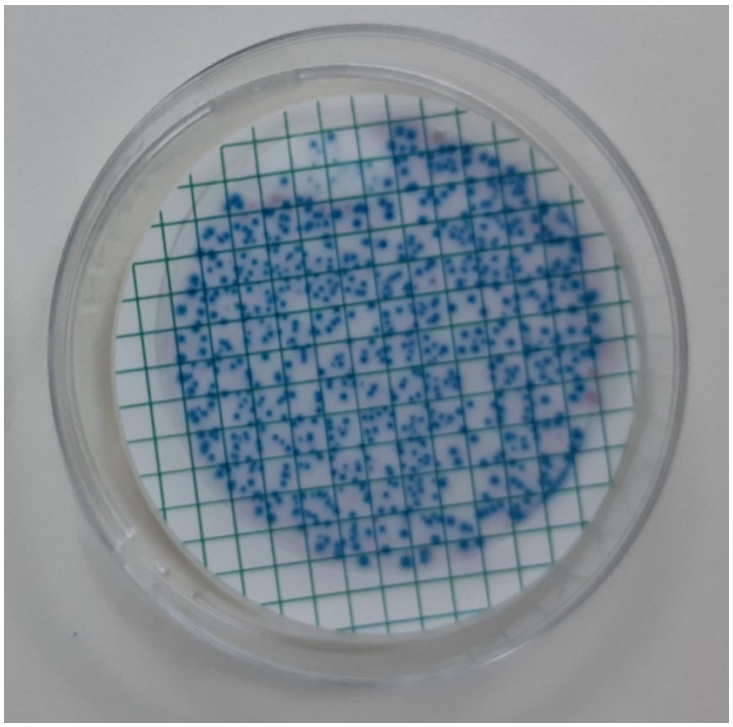
AY	ÖRNEK NO	BÖLGE (İLÇE)	E. COLİ KOB/100 ML
OCAK	1	8. İlçe	2
	2	8. İlçe	6
	3	1. İlçe	5
	4	8. İlçe	4
	5	1. İlçe	8
ŞUBAT	6	9. İlçe	2
	7	2. İlçe	1
	8	2. İlçe	5
	9	7. İlçe	6
	10	7. İlçe	1
	11	8. İlçe	1
	12	1. İlçe	47
	13	1. İlçe	34
MART	14	7. İlçe	1
	15	9. İlçe	1
	16	9. İlçe	2
	17	9. İlçe	8
NİSAN	18	2. İlçe	2000
	19	4. İlçe	200
	20	1. İlçe	2
	21	6. İlçe	3
MAYIS	22	1. İlçe	2
	23	1. İlçe	100
	24	1. İlçe	3
	25	1. İlçe	300
	26	9. İlçe	5
HAZİRAN	27	6. İlçe	4
	28	6. İlçe	3
	29	2. İlçe	15
	30	2. İlçe	10
	31	6. İlçe	3000
	32	3. İlçe	6

Çizelge 4.3. *E. coli* tespit edilen örnekler (devamı).

TEMMUZ	33	1. İlçe	20
	34	5. İlçe	100
	35	6. İlçe	4
	36	6. İlçe	2
	37	6. İlçe	4
	38	6. İlçe	12
	39	6. İlçe	6
AĞUSTOS	40	1. İlçe	1
	41	1. İlçe	28
	42	2. İlçe	2
EYLÜL	43	3. İlçe	20
	44	1. İlçe	100
	45	2. İlçe	100
	46	1. İlçe	10
	47	1. İlçe	18
	48	1. İlçe	2
	49	1. İlçe	200
	50	1. İlçe	10
	51	1. İlçe	3
	52	4. İlçe	1000
	53	3. İlçe	30
	54	3. İlçe	4
	55	3. İlçe	10
	56	8. İlçe	5
EKİM	57	1. İlçe	2
	58	4. İlçe	520
	59	3. İlçe	30
	60	2. İlçe	3
	61	1. İlçe	2
KASIM	62	6. İlçe	4
	63	1. İlçe	2
ARALIK	64	3. İlçe	2
	65	9. İlçe	10
	66	6. İlçe	38
	67	2. İlçe	50



Şekil 4.2. Chromogenic Coliform besiyerinde 36^0C'de görülen sayılabilir mavi mor renkte *E. coli* kolonileri. Görüntü 17 numaralı örnekten yapılan ekimden alınmıştır.



Şekil 4.3. Chromogenic Coliform besiyerinde 36^0C'de görülen 100'den fazla mavi mor renkte *E. coli* koloni örneği. Görüntü 58 numaralı örnekten yapılan ekimden alınmıştır.

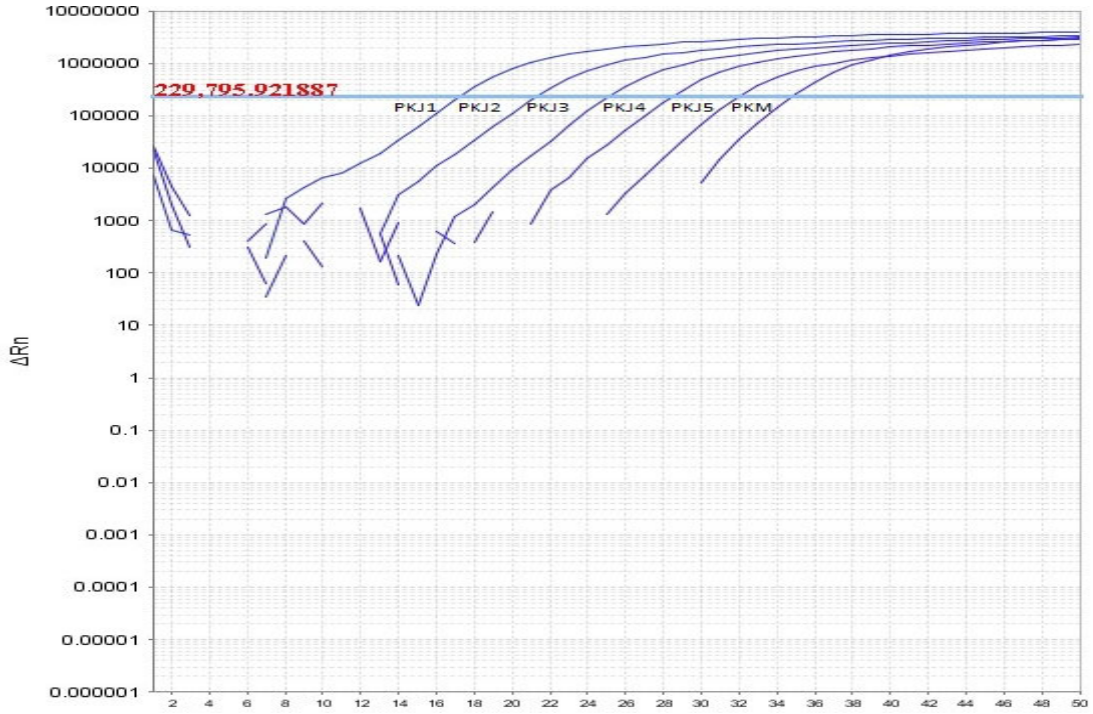
4.2. Pozitif Kontrollerin Miktarlarının Hesaplanması

C. jejuni Standart Kit (Genesig, ABD), miktarı belli olan (µl'de $2x10^5$ kopya) pozitif kontrol içermektedir. Herbir örnek 5 µl kullanıldığından pozitif kontrol 1'de (PK1) $2x10^5x5$ µl, yani 10^6 kopya/5 µl bulunmaktadır. Pozitif kontrol 1'den hazırlanan 1/10'luk beş nokta seyreltme serisi (PK1, PK2, PK3, PK4, PK5) ve beraberinde kullanılan *Mericon* Campylobacter Triple Kitin (Qiagen, Almanya) içindeki miktari belli olmayan pozitif kontrolün (PKM) kritik eşik (C_T) değerleri ve kopya sayıları (RQ) Çizelge 4.4.'de verilmiştir. Böylece *C. jejuni* Standart Kit (Genesig, ABD), pozitif kontrolün beş nokta seri seyreltmeye bağlı çoğalma eğrisinin doğruluğu ölçülmüştür ve *Mericon* Campylobacter Triple Kitin içindeki miktari belli olmayan pozitif kontrolün miktari 6 kopya/5 µl tespit edilmiştir. Ancak *Mericon* Campylobacter Triple Kit kalitatif olduğundan çıkan sonuçlara sayısal değer verilmemiştir.

Çizelge 4.4. *C. jejuni* Standart Kit (Genesig, ABD) pozitif kontrol (PK1, PK2, PK3, PK4, PK5) 5 nokta standart seyreltme serisi ile *Mericon* Campylobacter Triple Kitin (Qiagen, Almanya) pozitif kontrol (PKM) kritik eşik değerleri ve kopya sayıları.

Pozitif Kontroller	Raportör	Susturucu	C_T (Kritik Eşik)	RQ (Göreceli Sayı)
PK1	FAM	NFQ-MGB	17.496	1000000 kopya/5 µl
PK2	FAM	NFQ-MGB	21.316	70805 kopya/5 µl
PK3	FAM	NFQ-MGB	25.046	5336 kopya/5 µl
PK4	FAM	NFQ-MGB	28.343	543 kopya/5 µl
PK5	FAM	NFQ-MGB	31.963	44 kopya/5 µl
PKM	FAM	NFQ-MGB	34.795	6 kopya/5 µl

C. jejuni Standart Kit (Genesig, ABD) Pozitif kontrol 1'den hazırlanan 1/10'luk beş nokta seyreltme serisi ve beraberinde kullanılan *Mericon* Campylobacter Triple Kitin (Qiagen, Almanya) içindeki miktari belli olmayan pozitif kontrolün (PKM) çoğalma eğrisi Şekil 4.4.'de verilmiştir.



Şekil 4.4. *C. jejuni* Standart Kit (Genesig, ABD) Pozitif kontrolün beş nokta seyreltme serisi ve *Mericon* Campylobacter Triple Kit (Qiagen, Almanya) pozitif kontrolün çoğalma eğrisi.

4.3. Multiplex qPCR sonuçları

Patojen DNA'sının varlığını veya yokluğunu belirlemek, hedef dizisinin amplifikasyonu temelinde gerçekleştirilir ve kullanılan gerçek zamanlı PCR cihazının uygulama yazılımı tarafından üretilen amplifikasyon grafiğinde gerçek zamanlı olarak görselleştirilir.

Mericon Campylobacter Triple Kit (Qiagen, Almanya) aynı anda birden fazla hedefi çoğaltma (multipleks) özelliğe sahiptir. Kitin içinden çıkan pozitif kontrol, örnek içermeyen negatif kontrol, karşılaştırmak amacıyla *Campylobacter spp*. içeren mCCDA agardan saf bir koloni suya karıştırılarak 1-22 numaralı örneklerin kritik eşik (C_T) değerleri ve sonuçları Çizelge 4.5.'te verilmiştir. Böylece hem kitin düzgün bir şekilde çalıştığı (eğer analiz edilmek istenen örnek miktarı yeterli değilse, internal kontrol çoğalacağından kitin çalıştığı kontrol edilebilmektedir) hem de araştırılan örneğin varlığı veya yokluğu belirlenebilmektedir.

E. coli tespit edilen 67 örnekten, 28 istasyondan 1 defa, 2 istasyondan 2 defa pozitif çıkmış olup 30 farklı istasyondan toplam 32 örnekte (% 47,76) *Mericon*

Campylobacter Triple Kit ile pozitif tespit edilmiştir (Çizelge 4.5., Çizelge 4.6., Çizelge 4.7. ve Çizelge 4.8.).

Çizelge 4.5. Multiplex qPCR ile pozitif kontrol, negatif kontrol, *Campylobacter spp*. (C (+)) ve 1-22 numaralı örneklerin kritik eşik döngü sayısı (C_T) ile sonuçları.

Örnekler	**C_T (Kritik Eşik Döngü Sayısı)**	**Sonuç**
Mericon PK	30,69889	**Pozitif**
1	0	Negatif
2	15,00091	**Pozitif**
3	0	Negatif
4	0	Negatif
5	18,00465	**Pozitif**
6	17,93065	**Pozitif**
7	22,61234	**Pozitif**
8	0	Negatif
9	33,99436	**Pozitif**
10	24,34466	**Pozitif**
11	34,96129	**Pozitif**
12	0	Negatif
13	35,99902	**Pozitif**
14	0	Negatif
15	0	Negatif
16	0	Negatif
17	0	Negatif
18	0	Negatif
19	0	Negatif
20	38,66728	Negatif
21	0	Negatif
22	37,875	Negatif
C (+)	10,00045	**Pozitif**

Kitin içinden çıkan pozitif kontrol, örnek içermeyen negatif kontrol, karşılaştırmak amacıyla *Campylobacter spp*. içeren mCCDA agardan saf bir koloni suya

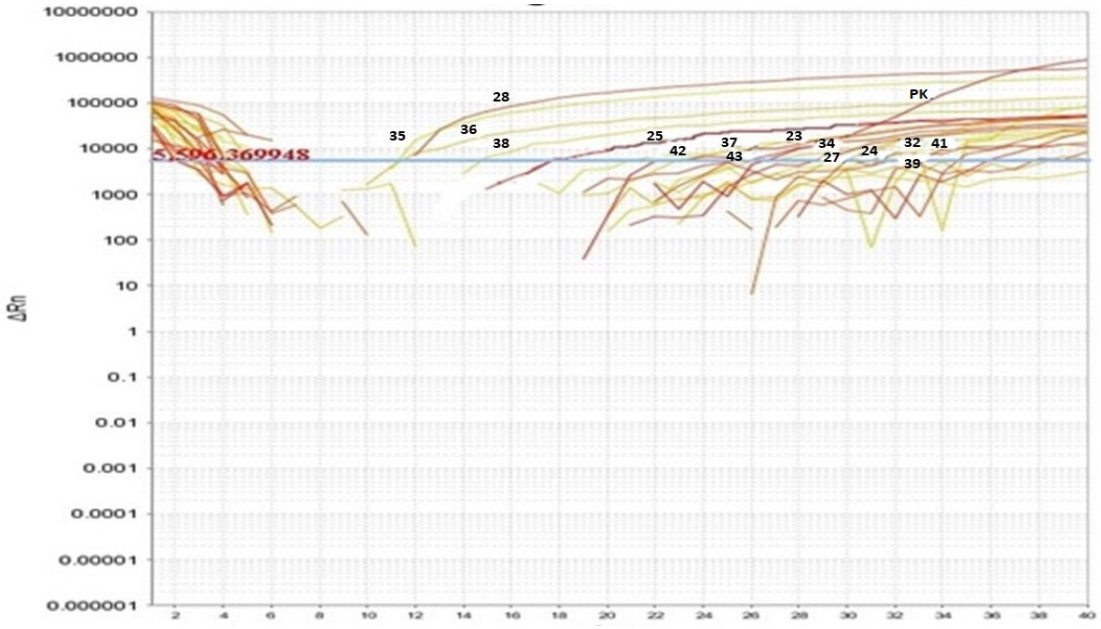
karıştırılarak örneklerle birlikte RT-PCR yöntemiyle yapılan analizlerin çoğalma eğrisi Şekil 4.5.'te verilmiştir.



Şekil 4.5. Multiplex qPCR ile pozitif kontrol, negatif kontrol, *Campylobacter spp*. (C (+)) ve 1- 22 numaralı örneklerin çoğalma eğrisi.

Çizelge 4.6. Multiplex qPCR ile pozitif kontrol ve 23- 43 numaralı örneklerin kritik eşik döngü sayıları (C_T) ile sonuçları.

Örnekler	C_T (Kritik Eşik Döngü Sayısı)	Sonuç
PK Mericon	26,60347176	**Pozitif**
23	23,23252869	**Pozitif**
24	28,74941444	**Pozitif**
25	17,31285095	**Pozitif**
26	36,07877731	Negatif
27	25,64371872	**Pozitif**
28	11,94557667	**Pozitif**
29	32,30728149	**Pozitif**
30	38,3801384	Negatif
31	34,4078598	Negatif
32	30,92212868	**Pozitif**
33	38,37699127	Negatif
34	29,73836708	**Pozitif**
35	11,14158535	**Pozitif**
36	11,37949753	**Pozitif**
37	23,19154739	**Pozitif**
38	14,85310936	**Pozitif**
39	34,14884949	**Pozitif**
40	0	Negatif
41	31,03388214	**Pozitif**
42	21,06176376	**Pozitif**
43	25,08424034	**Pozitif**



Şekil 4.6. Multiplex qPCR ile pozitif kontrol, negatif kontrol ve 23-43 numaralı örneklerin çoğalma eğrisi.

Şekil 4.6., Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.'de, pozitif kontrol, negatif kontrol ve örneklerin çoğalma eğrileri görülmektedir.

Çizelge 4.7. Multiplex qPCR ile pozitif kontrol ve 44-63 numaralı örneklerin kritik eşik döngü sayıları (C_T) ile sonuçları.

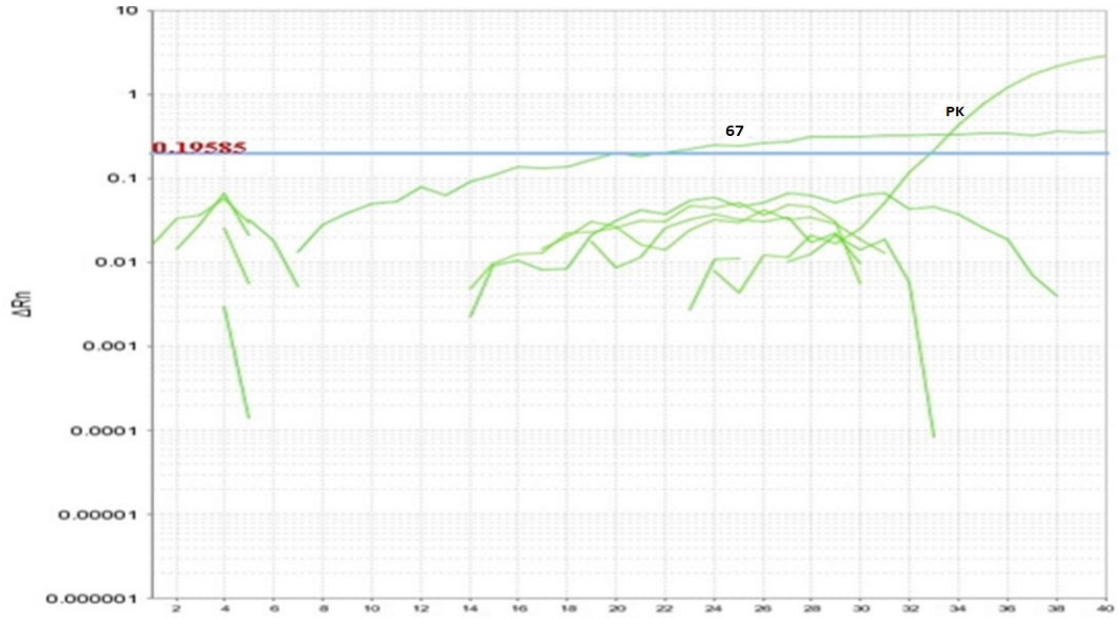
Örnekler	C_T (Kritik Eşik Döngü Sayısı)	Sonuç
PK Mericon	21,93132973	**Pozitif**
44	21,20454758	**Pozitif**
45	0	Negatif
46	0	Negatif
47	24,87968636	**Pozitif**
48	0	Negatif
49	31,76025772	Negatif
50	0	Negatif
51	35,00484467	Negatif
52	14,58177853	**Pozitif**
53	14,65433121	**Pozitif**
54	12,4411974	**Pozitif**
55	0	Negatif
56	0	Negatif
57	38,67535019	Negatif
58	20,99507713	**Pozitif**
59	0	Negatif
60	8,334105492	**Pozitif**
61	0	Negatif
62	0	Negatif
63	0	Negatif



Şekil 4.7. Multiplex qPCR ile pozitif kontrol, negatif kontrol ve 44-63 numaralı örneklerin çoğalma eğrisi.

Çizelge 4.8. Multiplex qPCR ile pozitif kontrol ve 64-67 numaralı örneklerin kritik eşik döngü sayıları (C_T) ile sonuçları.

Örnekler	**C_T (Kritik Eşik)**	**Sonuç**
PK Mericon	32,80662537	**Pozitif**
64	0	Negatif
65	0	Negatif
66	0	Negatif
67	20,85744667	**Pozitif**



Şekil 4.8. Multiplex qPCR ile pozitif kontrol, negatif kontrol ve 64-67 numaralı örneklerin çoğalma eğrisi.

4.4. *C. jejuni* PCR Sonuçları

Pozitif kontrol için, 1/10'luk seri seyreltilmesine bağlı beş nokta seyreltme serisi daha önce açıklandığı şekilde hazırlanmıştır. Gerek pozitif kontrolün seri seyretlemeleri gerekse örneklerin miktarının minimum ölçülebilen eşik değerleri (CT 'Critic Threshold') RT-PCR cihazında sırasıyla şu şekilde hesaplanmıştır:

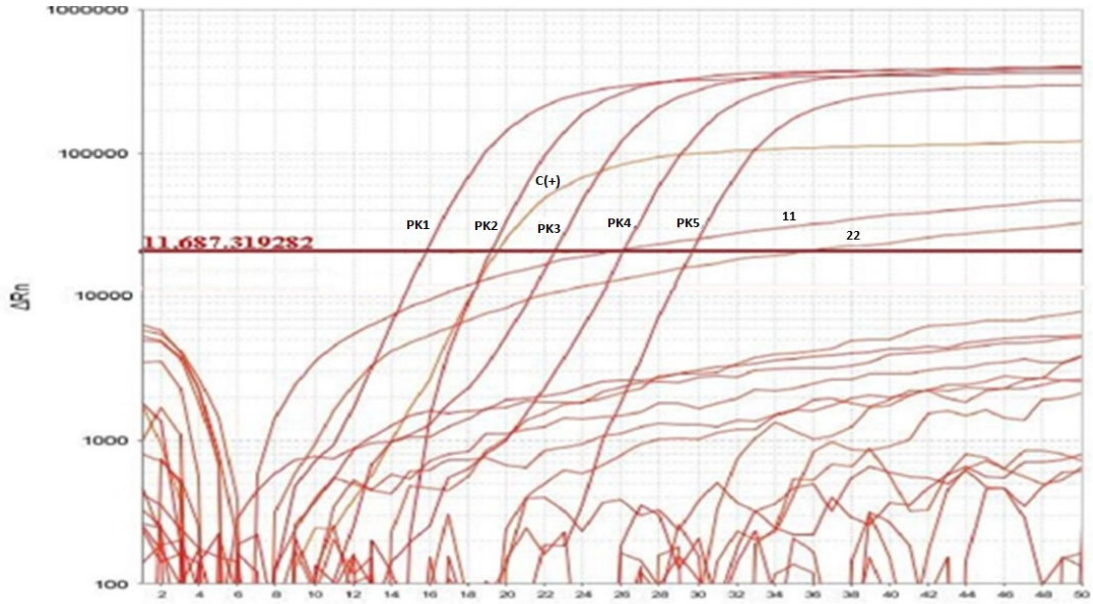
Real time PCR cihazının miktar hesaplama mantığı örneklerin eşik değeri geçtikleri döngü sayılarının birbirinden çıkartılmasına bağlı fark hesaplamasına göredir. Bunun için kopya sayısı belli olan örnek referans olarak kullanılır. Bu referansın miktarı örneğin 100 olsun. Referans eşik değeri 23. döngüde geçiyorsa, miktarını bilmediğimiz örnek ise 25. döngüde geçiyorsa aradaki fark hesaplanır 25-23= 2 real time PCR'da çoğalma ilk baştaki miktar sayısı çarpı 2 üzeri döngü sayısı olduğu için 2^2 alınır. Ancak 25. döngü 23. döngüden sonra geldiği için 2 üzeri iki eşittir 4 olduğu için 23. döngüde eşik değeri geçen örnek miktarı 100 ise 4'e bölünür. Yani miktarını araştırdığımız örnekteki kopya sayısı 100/4= 25 olmalıdır. Buna göre hem 5 nokta pozitif kontrol hemde 1-22 numaralı örneklerdeki *C. jejuni* kopya sayıları Çizelge 4.9.'da verilmiştir.

E. coli tespit edilen 67 örnekten toplam 7 farklı noktadan 8 *C. jejuni* pozitif tespit edilmiştir (Çizelge 4.9., Çizelge 4.10., Çizelge 4.11. ve Çizelge 4.12.). Ancak 22,

23 ve 37 numaralı örnekler kitin tespit limiti olan 100'ün altında kalmaktadır (Çizelge 4.9. ve Çizelge 4.10.).

Çizelge 4.9. *C. jejuni* PCR pozitif kontroller, *Campylobacter spp*. (C (+)) ve 1-22 numaralı örneklerin kritik eşik (C_T) değerleri ile kopya sayıları (RQ).

Örnekler	**C_T (Kritik Eşik)**	**RQ (Göreceli Sayı)**
PK1	15,91045731	1000000 kopya/5 µl
PK2	19,23427492	99857 kopya/5 µl
PK3	22,59589767	8178 kopya/5 µl
PK4	26,22533842	661 kopya/5 µl
PK5	29,85727332	53 kopya/5 µl
1	Tespit Edilemeyecek Kadar Az	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
2	Tespit Edilemeyecek Kadar Az	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
3	Tespit Edilemeyecek Kadar Az	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
4	Tespit Edilemeyecek Kadar Az	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
5	Tespit Edilemeyecek Kadar Az	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
6	Tespit Edilemeyecek Kadar Az	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
7	Tespit Edilemeyecek Kadar Az	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
8	Tespit Edilemeyecek Kadar Az	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
9	Tespit Edilemeyecek Kadar Az	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
10	Tespit Edilemeyecek Kadar Az	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
11	26,092	725 kopya/5 µl
12	Tespit Edilemeyecek Kadar Az	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
13	Tespit Edilemeyecek Kadar Az	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
14	Tespit Edilemeyecek Kadar Az	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
15	Tespit Edilemeyecek Kadar Az	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
16	Tespit Edilemeyecek Kadar Az	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
17	Tespit Edilemeyecek Kadar Az	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
18	Tespit Edilemeyecek Kadar Az	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
19	Tespit Edilemeyecek Kadar Az	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
20	Tespit Edilemeyecek Kadar Az	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
21	Tespit Edilemeyecek Kadar Az	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
22	35,943	1kopya/5 µl
C+	19,694	72595 kopya/5 µl

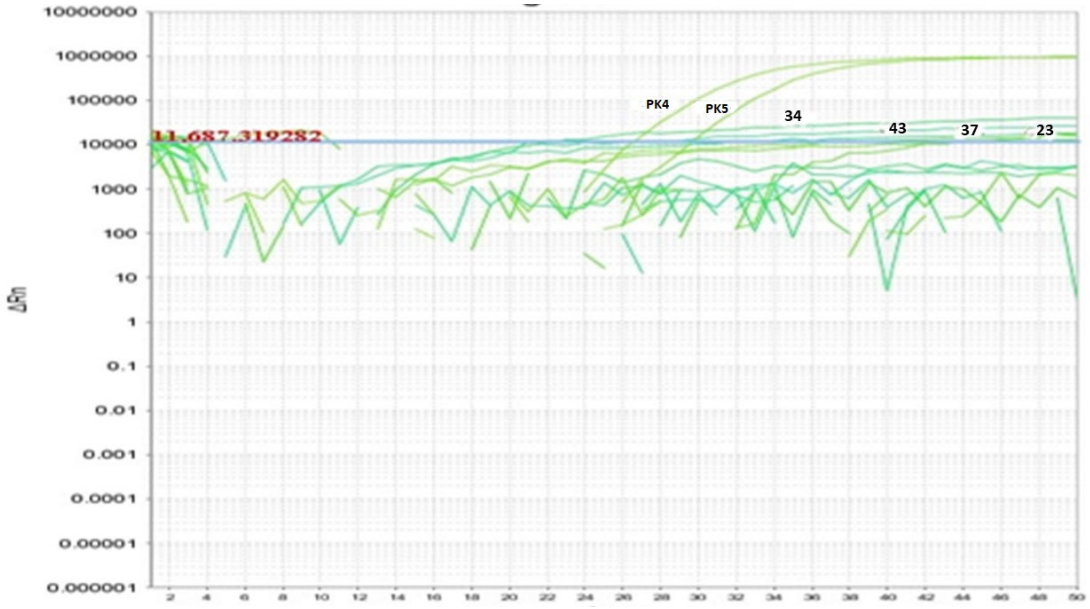


Şekil 4.9. *C. jejuni* pozitif kontrol, negatif kontrol, *Campylobacter spp*. (C (+)) ve 1-22 numaralı örneklerin çoğalma eğrisi.

İlk ve son çalışmada, 5 nokta pozitif kontrol kullanılarak çoğalma eğrilerindeki örneklerin kopya sayıları hesaplanmıştır (Şekil 4.9. ve Şekil 4.11.).

Çizelge 4.10. *C. jejuni* pozitif kontrol ve 23-43 numaralı örneklerin kritik eşik (C_T) değerleri ile kopya sayıları (RQ).

Örnekler	**C_T (Kritik Eşik)**	**RQ (Göreceli Sayı)**
pk4	26,62380981	1000 kopya/5 µl
pk5	29,71736336	117 kopya/5 µl
23	37,38822937	1 kopya/5 µl
24	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
25	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
26	43,68595886	Tespit edilemeyecek kadar az
27	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
28	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
29	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
30	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
31	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
32	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
33	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
34	22,40015221	18636 kopya/5 µl
35	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
36	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
37	32,3737	19 kopya/5 µl
38	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
39	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
40	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
41	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
42	44,20158386	Tespit edilemeyecek kadar az
43	28,94634666	200 kopya/5 µl

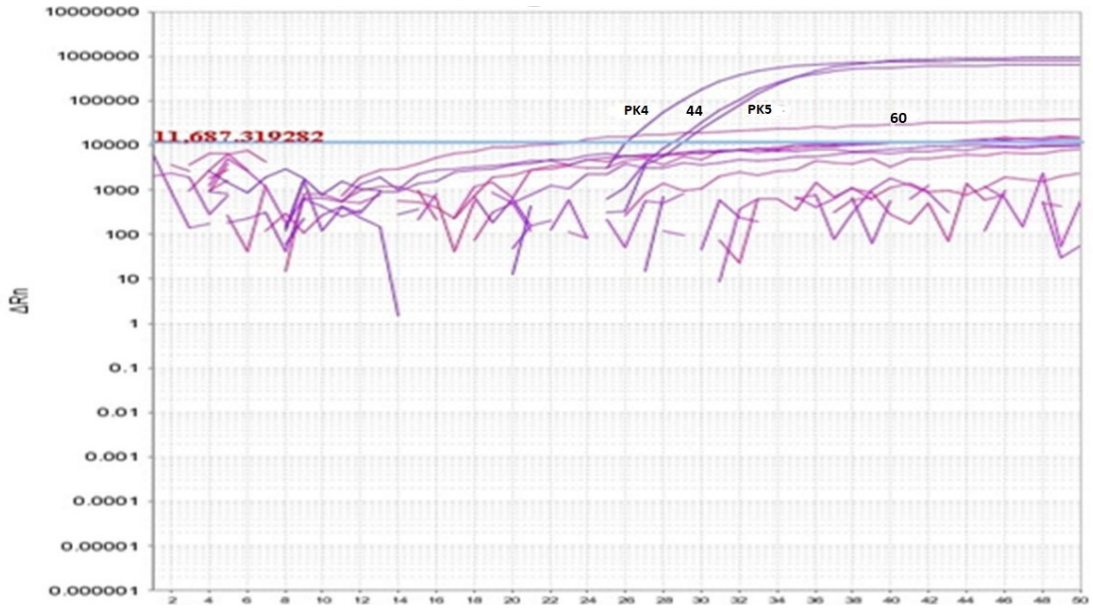


Şekil 4.10. *C. jejuni* pozitif kontrol, negatif kontrol ve 23-43 numaralı örneklerin çoğalma eğrisi.

Çoğalma eğrilerindeki 23 ile 63 numaralı örneklerin kopya sayıları, iki pozitif kontrol kullanlarak hesaplanmıştır (Şekil 4.10. ve Şekil 4.11.).

Çizelge 4.11. *C. jejuni* pozitif kontroller ve 44-63 numaralı örneklerin kritik eşik (C_T) değerleri ile kopya sayıları (RQ).

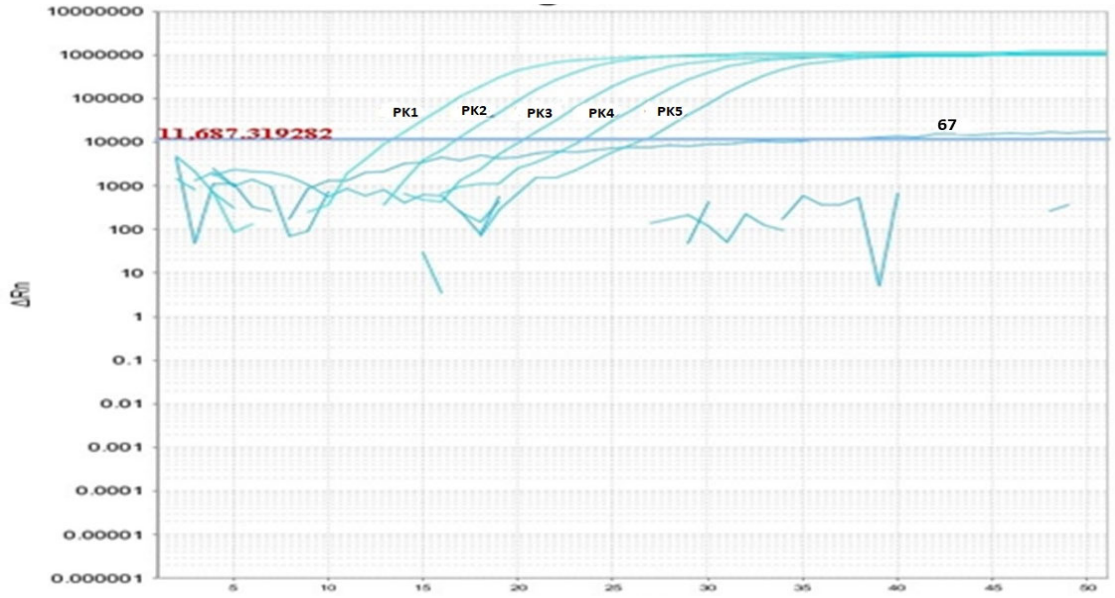
Örnekler	**C_T (Kritik Eşik)**	**RQ (Göreceli Sayı)**
pk4	26,14565468	1000 kopya/5 µl
pk5	28,97920609	134 kopya/5 µl
44	28,56805611	178 kopya/5 µl
45	40,04471588	Tespit edilemeyecek kadar az
46	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
47	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
48	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
49	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
50	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
51	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
52	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
53	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
54	43,62965775	Tespit edilemeyecek kadar az
55	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
56	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
57	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
58	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
59	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
60	22,79157066	10225 kopya/5 µl
61	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
62	41,55773163	Tespit edilemeyecek kadar az
63	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az



Şekil 4.11. *C. jejuni* pozitif kontrol, negatif kontrol ve 44-63 numaralı örneklerin çoğalma eğrisi.

Çizelge 4.12. *C. jejuni* pozitif kontrol ve 64-67 numaralı örneklerin kritik eşik (C_T) değerleri ile kopya sayıları (RQ).

Örnekler	**C_T (Kritik Eşik)**	**RQ (Göreceli Sayı)**
pk1	13,50596046	1000000 kopya/5 µl
pk2	16,85880089	98073 kopya/5 µl
pk3	20,46965981	8027 kopya/5 µl
pk4	23,48251343	994 kopya/5 µl
pk5	26,72303963	105 kopya/5 µl
64	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
65	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
66	Tespit edilemeyecek kadar az	Tespit edilemeyecek kadar az
67	35,9925499	Tespit edilemeyecek kadar az



Şekil 4.12. *C. jejuni* pozitif kontrol, negatif kontrol ve 64-67 numaralı örneklerin çoğalma eğrisi.

4.5. Multiplex qPCR ve *C. jejuni* PCR Sonuçlarının karşılaştırılması

Mericon Campylobacter Triple Kit (Qiagen, Almanya) ile pozitif tespit edilen 32 örnek bölgesel olarak incelendiğinde; 1. İlçe Merkezi 8, 6. İlçe Merkezi 7, 2. İlçe Merkezi 5, 3. İlçe Merkezi 4, 8. İlçe Merkezi 2, 4. İlçe Merkezi 2, 7. İlçe Merkezi 2, 9. İlçe Merkezi 1 ve 5. İlçe Merkezi 1 olacak şekilde dağılmaktadır (Çizelge 4.14.). *C. jejuni* Standart Kit (Genesig, ABD) ile pozitif tespit edilen 8 örnek bölgesel olarak incelendiğinde; 1. İlçe Merkezi 3, 6. İlçe Merkezi 1, 2. İlçe Merkezi 1, 3. İlçe Merkezi 1, 8. İlçe Merkezi 1 ve 5. İlçe Merkezi 1 olacak şekilde dağılmaktadır. İki kitin pozitif örnek sayısının aylara göre dağılımı ise Çizelge 4.13'teki gibidir. Yapılan birçok çalışmada *Campylobacter* enfeksiyonlarının % 85-90 gibi bir oranda *C. jejuni* sebep olduğundan iki kit sonuçlarının benzer olması beklenirdi. Ancak *Mericon* Campylobacter Triple Kit bir reaksiyonda en az 10 DNA kopyasını tespit edebilirken *C. jejuni* Standart Kit bir reaksiyonda en az 100 DNA kopyasını tespit edebilir.

Çizelge 4.13. İki kitin pozitif örnek sayısının aylara göre dağılımı.

Ay	*Mericon* Campylobacter Triple Kit	C. jejuni Standart Kit
Ocak	2	0
Şubat	6	1
Mart	0	0
Nisan	0	0
Mayıs	3	2
Haziran	4	0
Temmuz	6	2
Ağustos	2	0
Eylül	6	2
Ekim	2	1
Kasım	0	0
Aralık	1	0

Çizelge 4.14. Multiplex qPCR ve *C. jejuni* PCR Sonuçları.

Ay	Sıra	Bölge (İlçe)	Mericon Triple Kit Sonuç	RQ (Göreceli Sayı)Genesig C. jejuni Kiti
Ocak	1	8. İlçe	Negatif	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
	2	8. İlçe	**Pozitif**	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
	3	1. İlçe	Negatif	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
	4	8. İlçe	Negatif	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
	5	1. İlçe	**Pozitif**	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
Şubat	6	9. İlçe	**Pozitif**	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
	7	2. İlçe	**Pozitif**	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
	8	2. İlçe	Negatif	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
	9	7. İlçe	**Pozitif**	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
	10	7. İlçe	**Pozitif**	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
	11	8. İlçe	**Pozitif**	725 kopya/5 µl
	12	1. İlçe	Negatif	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
	13	1. İlçe	**Pozitif**	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
Mart	14	7. İlçe	Negatif	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
	15	9. İlçe	Negatif	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
	16	9. İlçe	Negatif	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
	17	9. İlçe	Negatif	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
Nisan	18	2. İlçe	Negatif	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
	19	4. İlçe	Negatif	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
	20	1. İlçe	Negatif	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
	21	6. İlçe	Negatif	Tespit Edilemeyecek Kadar Az
Mayıs	22	1. İlçe	Negatif	1kopya/5 µl
	23	1. İlçe	**Pozitif**	1kopya/5 µl
	24	1. İlçe	**Pozitif**	Tespit edilemeyecek kadar az
	25	1. İlçe	**Pozitif**	Tespit edilemeyecek kadar az
	26	9. İlçe	Negatif	Tespit edilemeyecek kadar az
Haziran	27	4. İlçe	**Pozitif**	Tespit edilemeyecek kadar az
	28	4. İlçe	**Pozitif**	Tespit edilemeyecek kadar az
	29	2. İlçe	**Pozitif**	Tespit edilemeyecek kadar az
	30	2. İlçe	Negatif	Tespit edilemeyecek kadar az
	31	4. İlçe	Negatif	Tespit edilemeyecek kadar az
	32	3. İlçe	**Pozitif**	Tespit edilemeyecek kadar az

Çizelge 4.14. Multiplex qPCR ve *C. jejuni* PCR Sonuçları (devamı).

Temmuz	33	1. İlçe	Negatif	Tespit edilemeyecek kadar az
	34	5. İlçe	**Pozitif**	18636 kopya/5 µl
	35	4. İlçe	**Pozitif**	Tespit edilemeyecek kadar az
	36	4. İlçe	**Pozitif**	Tespit edilemeyecek kadar az
	37	4. İlçe	**Pozitif**	19 kopya/5 µl
	38	4. İlçe	**Pozitif**	Tespit edilemeyecek kadar az
	39	4. İlçe	**Pozitif**	Tespit edilemeyecek kadar az
Ağustos	40	1. İlçe	Negatif	Tespit edilemeyecek kadar az
	41	1. İlçe	**Pozitif**	Tespit edilemeyecek kadar az
	42	2. İlçe	**Pozitif**	Tespit edilemeyecek kadar az
Eylül	43	3. İlçe	**Pozitif**	200 kopya/5 µl
	44	1. İlçe	**Pozitif**	178 kopya/5 µl
	45	2. İlçe	Negatif	Tespit edilemeyecek kadar az
	46	1. İlçe	Negatif	Tespit edilemeyecek kadar az
	47	1. İlçe	**Pozitif**	Tespit edilemeyecek kadar az
	48	1. İlçe	Negatif	Tespit edilemeyecek kadar az
	49	1. İlçe	Negatif	Tespit edilemeyecek kadar az
	50	1. İlçe	Negatif	Tespit edilemeyecek kadar az
	51	1. İlçe	Negatif	Tespit edilemeyecek kadar az
	52	4. İlçe	**Pozitif**	Tespit edilemeyecek kadar az
	53	3. İlçe	**Pozitif**	Tespit edilemeyecek kadar az
	54	3. İlçe	**Pozitif**	Tespit edilemeyecek kadar az
	55	3. İlçe	Negatif	Tespit edilemeyecek kadar az
	56	8. İlçe	Negatif	Tespit edilemeyecek kadar az
Ekim	57	1. İlçe	Negatif	Tespit edilemeyecek kadar az
	58	4. İlçe	**Pozitif**	Tespit edilemeyecek kadar az
	59	3. İlçe	Negatif	Tespit edilemeyecek kadar az
	60	2. İlçe	**Pozitif**	10225 kopya/5 µl
	61	1. İlçe	Negatif	Tespit edilemeyecek kadar az
Kasım	62	4. İlçe	Negatif	Tespit edilemeyecek kadar az
	63	1. İlçe	Negatif	Tespit edilemeyecek kadar az
Aralık	64	3. İlçe	Negatif	Tespit edilemeyecek kadar az
	65	9. İlçe	Negatif	Tespit edilemeyecek kadar az
	66	4. İlçe	Negatif	Tespit edilemeyecek kadar az
	67	2. İlçe	**Pozitif**	Tespit edilemeyecek kadar az

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Güvenli içme suyu, mikrobiyal su kalitesinin değerlendirilmesi, tüketicileri bakteri, virüs ve protozoa gibi patojenlerin neden olduğu su kaynaklı hastalıklardan korumak için gereklidir (Masaaki K, 2014; Pitkänen, 2010). Küresel olarak, içme suyunun fekal kontaminasyonu ve bunu takiben su kaynaklı gastrointestinal enfeksiyon salgınları önemli bir halk sağlığı sorunudur (Pitkänen, 2010). Tüm dünyada gıda kaynaklı enfeksiyonların yanı sıra kirlenmiş içme suyu tüketimi *Campylobacter* için önemli bir bulaşma yolu oluşturur ve çeşitli ülkelerde çok sayıda su kökenli salgına neden olabileceğini gösteren birçok çalışma vardır (Pitkänen, 2010; Tissier vd., 2012; Van Dyke vd., 2010; World Health Organization, 2017). Kirli içme suyu bazı kampylobakteriyoz sporadik salgınlarında da rol oynamıştır. Ağırlıklı olarak salgınların, arıtılmamış veya kontamine su tüketiminin bir sonucu olduğu görülmüştür (St-Pierre vd., 2009a). Su kaynaklı gastroenterit salgınları gelişmiş ülkelerde görülmeye devam etmektedir. Yeni Zelanda'nın Güney Adası'ndaki kırsal bir kasaba olan Daradd'da, 16 Ağustos 2012'de *Escherichia coli*'nin identifikasyonunun ihlali sonrasında kampilobakteriyoz salgını yaşadı. Tanımlayıcı bir salgın soruşturması yapıldı. Sonuç olarak, 29 olguda laboratuvar onaylı kampilobakteriyoz tanısı vardı ve 138 olguda olası vakalar saptandı (Bartholomew vd., 2014). İngiltere ve Galler'de özel su kaynaklarının çoğunluğu pınarlar, sondaj kuyuları ve kuyulardır ve 1992-2003 yılları arasında yapılan bir inceleme, özel su kaynaklarını insan kampilobakteriyoz salgınlarının kaynağı olarak tanımlamıştır (Said vd., 2003). Yağmur suyu tankları kampilobakteriyoz salgınlarında kontaminasyon kaynağı olarak tanımlanmıştır (Daoud vd., 2011). Avustralya'da yapılan bir çalışmada, içme suyu için kullanılan 27 yağmur suyu tankından 12'sinin

Campylobacter spp. kontaminasyonunda başlıca kaynağının kuş feçesi olduğu bildirilmiştir (Ahmed vd., 2008).

Gıda kaynaklı enfeksiyonlardan farklı olarak içme suyu yoluyla bulaşan mikroorganizmalar aynı anda binlerce insanı etkileyebilmektedir. Su ortamı *Campylobacter*'lerin doğal yaşam ortamı değildir. İnsanlardan ve sıcakkanlı hayvan atıklarından suya karıştıklarında buradaki besin kıtlığı, ısı, pH, serbest oksijen, ultraviyole ışınlar vb. olumsuz faktörlerle kısa sürede ölmekte ya da yaşayabilir fakat kültüre edilemez forma dönüşmektedir. Bundan dolayı geleneksel yöntemlerle klinik örneklere kıyasla tespit edilmeleri oldukça zorlaşmakta ya da imkansız hale gelmektedir (Van Dyke vd., 2010; Yang vd., 2003). Dünya Sağlık Örgütü (WHO), önemli su kaynaklı bakteriyel, viral ve protozoon patojenlerini listelemiş ve içme suyunun kabul edilebilirliği için kriterler sağlamıştır (World Health Organization, 2017).

Çalışmamızda, Edirne ili merkezinde ve çevresindeki ilçe ve köylerde içme suyu olarak kullanılan sularda, *C. jejuni, C. coli* ve *C lari* türlerini tespit etme ihtimalini artırmak amacıyla *E. coli* indikatörünün araştırılması yapılmıştır. *Campylobacter* cinsi bakteriler suda doğal olarak bulunmayıp insan ve hayvan dışkısından karıştığı için çalışmalarda mikrobiyal kirliliği gösteren bu indikatör bakteriye ihtiyaç duyulmuştur (Paruch vd., 2020; World Health Organization, 2017). Suda kesin bir dışkı kirliliğinin göstergesi olan *E. coli*'nin varlığının saptanması, *C. jejuni, C. coli* ve *C. lari* türlerinin tespit etme ihtimalini artırmaktadır (Paruch vd., 2020). Başka bir çalışmada da *E. coli* gibi su kalitesi parametreleri *Campylobacter* seviyeleri ile yüksek düzeyde korelasyon göstermemekle birlikte, daha soğuk su sıcaklıklarında daha yüksek patojen konsantrasyonları gözlendiğini ortaya koymuştur (Van Dyke vd., 2010). Suda *E. coli*'nin hayatta kalmasının, sucul ortamlarda üremeyen *C. jejuni* gibi enterik bakteriyel patojenlerin varlığı ile korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Çalışmalar, koliform bakterilerin içme suyundan uzaklaştırılması için tasarlanan dezenfeksiyon işlemlerinin *Campylobacter spp.*'yi ortadan kaldırmak için yeterli olduğunu bulmuştur. Örneğin, Blaser ve ark. çeşitli sıcaklık ve pH koşulları altında, *C. jejuni*'nin klor ve monokloramin dezenfeksiyonuna *E. coli*'den daha duyarlı olduğunu göstermiştir (St-Pierre vd., 2009b).

Çalışmamızda Edirne merkezi ve ilçeleri de dahil olmak üzere bütün bölgelerden *E. coli*'nin tespiti ve sayımı yapılmıştır. Yıl içinde tespiti ve sayımı yapılan *E. coli* içeren numune sayısı en az Kasım ayında (2) ve en fazla da Eylül ayında (15) görülmüştür. Diğer aylarda tespit edilen *E. coli* içeren numune sayısında aylara ve mevsimlere göre anlamlı bir değişimin olmadığı görülmüştür. Bir çalışmada, kampilobakteriyozun, net ama açıklanamayan bir mevsimsellik gösterdiğini ve insan vakalarında gözlenen yaz aylarındaki artışın, *Campylobacter* kaynak kontaminasyonundaki bir artışın sonucu olmaktan ziyade, daha sık riskli maruziyetler nedeniyle olabileceği bildirilmiştir (David vd., 2017). Bir başka çalışmada ise güçlü mevsimsel değişimin hüküm sürdüğü tropikal iklimde, kuru ve sıcak mevsimler, kontaminasyon ve bulaşın yıllık riskin üzerinde olabileceğini, ayrıca, su dağıtım sisteminin önemli bir risk faktörü olduğunu ve suyun kirlenme derecesinin genellikle mevsimsel değişikliklerden etkilendiğini bildirmiştir (Etchie vd., 2014).

Çalışmamızda, *E. coli* tespit edilen örneklerden sadece 34 nolu örnekte 0,3 ppm serbest klor tespit edilmiş olup diğer örneklerin tamamında 0 ppm'dir. 0,3 ppm serbest klora rağmen suda *E. coli* tespit edilmesi burada yeni bir dışkı bulaşının olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca *E. coli* tespit edilen numunelerin tamamı yer altı suyu olup herhangi bir arıtma işleminden geçirilmemiştir. İçme suyu güvenliği, feçesin suya erişiminin önlenmesi ve su arıtma ile dezenfeksiyon işlemlerine dayanmaktadır. Salgınların çoğu, minimum su arıtımı kullanan nispeten küçük yeraltı suyu soyutlama tesislerinde gerçekleşir ve kontaminasyon kaynağı genellikle belirsizdir (Pitkänen, 2010). Başka bir çalışma, içme suyunun kirlenmesine bağlı salgınların, gösterge organizmalarının varlığına veya yokluğuna bakılmaksızın meydana geldiğini göstermiştir (Ahmed vd., 2009; Masaaki K, 2014).

Campylobacter türlerinin patojen olup olmadığının tespiti, içme ve kullanma suyu bakımından önemlidir. *Campylobacter* türleri genellikle fenotipik testlerle tanımlanmakta, ancak biyokimyasal aktivitelerinin zayıf olmasından dolayı tür düzeyinde doğru tanımlama için fenotipik testler her zaman yeterli olmamakta ve moleküler analize ihtiyaç duyulmaktadır (Kayman 2012; Oyarzabal, 2013). Canlı fakat kültürlenemeyen hücrelerin oluşumu ve kültür yönteminin düşük geri kazanımı nedeniyle kantitatif PCR kullanılarak daha yüksek prevalans oranları bulunması muhtemeldir (Van Dyke vd., 2010). Birçok çalışmada, qPCR testi, *C. jejuni*'nin

kantitatif tespiti için spesifik, hassas ve hızlı bir yöntem olduğundan yaygın olarak benimsenmiştir (Paruch vd., 2020; Yang vd., 2003). Multipleks qPCR, *C. jejuni ve C. coli*'nin tespitinde güvenilirdir. Ayrıca tespiti takip eden validasyon çalışmaları için multipleks qPCR, farklı örnekler için uygulanabilir, hızlı ve alternatif bir metodolojidir (Isabel, 2019; Lopez-Roldan vd., 2013; Toplak vd., 2012). Multipleks qPCR monopleks PCR'a göre avantajlıdır, birden farklı DNA hedefini tek bir reaksiyonda çoğaltabilmektedir (Toplak vd., 2012).

Multipleks PCR testi, insanlarda gastroenterit ve/veya septisemi ile yaygın olarak ilişkili *Campylobacter*'lerin tanımlanması için hızlı, basit ve pratik bir araçtır ve geleneksel biyokimyasal testlere etkili bir alternatif sunar (Yamazaki-Matsune vd., 2007). Farklı *Campylobacter* türleri, özellikle *C. jejuni, C. coli* ve *C. lari* ve diğer enterik patojenleri ayırt etmek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Dolayısıyla, yeni gerçek zamanlı multipleks PCR kısa sürede güvenilir sonuçların sağladığını ve enteropatojenik bakterilerin teşhisinde zaman önemli olduğunda ek bir teşhis aracı olarak yararlı olabildiğini göstermiştir (Frasao vd., 2017; Wiemer vd., 2011).

Fenotipik yöntemlere göre daha başarılı sonuçlar alınan moleküler yöntemlerle tespitte geçmişte yapılan çalışmalarda bazı sorunlarla karşılaşılmıştır. *Campylobacter* türleri sıklıkla doğal su ortamlarından ve kanalizasyondan izole edilmelerine rağmen bu organizmaları kontamine içme suyundan izole edilmeleri zor olduğundan, su yoğunlaştırma tekniklerinin ve moleküler yöntemlerin kullanımına daha fazla vurgu yapılmıştır (Oyarzabal, 2013). Çalışmamızda, bu sorunlarla karşılaşmamak için sulardan DNA izolasyonunda standardize edilmiş hazır ticari kit kullanılmıştır. DNA izolasyon aşamasının ilk basamağında, su örneklerinden bakterinin yoğunlaştırılması için 0.20 μm porları olan selüloz nitrat membran filtre kullanılmıştır. Bir çalışmada etanol içinde korunan veya bir -20˚C dondurucuda saklanıp selüloz nitrat filtre kağıdı kullanılarak yapılan süzme işleminde, DNA geri kazanımının maliyeti ve verimliliği açısından diğer kombinasyonlardan daha iyi performans gösterdiğini tespit etmiştir (Hinlo vd., 2017). Bu nedenle çalışmamızda *Campylobacter spp.* yoğunlaştırılmasında filtrasyon yöntemi kullanılmıştır.

Çalışmamızda, termofilik *Campylobacter*'lerin tespiti için iki farklı ticari kit kullanılarak qPCR çalışması yapılmıştır. İlk olarak Mericon Campylobacter Triple Kit

ile 3 tür termofilik *Campylobacter*'in (*C. jejuni, C. coli* ve *C. lari*) multipleks qPCR ile tespit çalışması yapılmıştır. Ancak bu kit ile pozitif tespit edilen örneklerde üç tür arasında ayırım yapılmadığından pozitif sonuçların üç türden hangisine ya da hangilerine ait olduğu saptanmamıştır. Çalışmamızda patojen olduğu bilinen *C. jejuni*'nin tespiti için kit *C. jejuni* Standart Kit kullanılarak insan sağlığını tehdit eden bu türün saptanması hedeflenmiştir.

Yaptığımız çalışmada, *E. coli* tespit edilen 67 örnekten 32'sinde *Mericon* Campylobacter Triple Kit ile bu bakteri için pozitif sonuçlanmıştır. *Campylobacter* pozitif tespit edilen 32 numunenin tamamının kırsal bölgeden alınan numunelerden olması, bu bölgelerdeki içme ve kullanma suyunda hem indikatör bakterilerin hem de spesifik patojenlerin bulunabileceğini göstermektedir. Yeraltı sularının hiçbir işlemden geçirilmeden su depolarına ve dezenfeksiyon işlemi yapılmadan şebekeye verilmesi sonucunda dışkı kirliğinin olduğu durumlarda suda diğer patojenler de bulunabilmektedir. Özellikle kanalizasyon ve hayvan feçesi ile kirlenmiş sularda insan sağlığını korumak amacıyla spesifik patojenler için ileri analizler gerekebilir (Hellein vd., 2011). Hayvan ve insan atıklarına ek olarak, su kuşlarının *Campylobacter*'in çevreye yayılımında önemli bir katkısı olabilir (Van Dyke vd., 2010).

C. jejuni Standart Kit ile yaptığımız çalışmada *E. coli* tespit edilen 67 örnekten, *Mericon* Campylobacter Triple Kitin tespit ettiği 32 pozitif örneğe karşılık sadece 8'inde *C. jejuni* tespit etmemiz beklediğimiz bir durum değildir. Üstelik *C. jejuni* Standart Kit, kantitatif bir kit olduğundan çıkan sonuçların DNA kopya sayıları da hesaplanmıştır. Ancak kitin tespit limiti en az 100 kopya olduğundan üç su örneği tespit limitinin altında kalmaktadır. Bundan dolayı *C. jejuni* Standart Kit ile pozitif örnek sayısını beş olarak değerlendirmekteyiz. Geçmişte yapılan çalışmaların genelinde enfeksiyona büyük oranda *C. jejuni*'nin sebep olduğu belirtilmektedir (Nyati & Nyati, 2013). Bu bakımdan elde ettiğimiz sonuçlar geçmişte yapılan çalışmalarla çelişmektedir. Bu çelişkinin birkaç olası sebebinin olabileceğini düşünmekteyiz. Birincisi, kullanılan iki kitin DNA kopya tespit limitleri farklıdır. *C. jejuni* Standart Kitin tespit limiti 100 kopya iken *Mericon* Campylobacter Triple Kitin tespit limiti 10 kopyadır. Öte yandan izole edilen *Campylobacter*'lerin yaklaşık olarak % 27- 50'sini *C. jejuni* ve *C. coli* dışındaki türlerin oluşturduğunu bildiren çalışmalar da vardır (Bullman vd., 2011; Lastovica, 2006). İkinci sebep, *Campylobacter* cinsi bakterilerin

identifikasyonunda farklı primerlerin, farklı miktarda reaksiyon karışımlarının ve amplifikasyon programlarının yer aldığı çeşitli PCR yöntemleri kullanılmaktadır. Farklı PCR yöntemlerinin performansı hem PCR yöntemi ile ilişkili fizikokimyasal etkenlere hem de bakteri ile ilişkili biyolojik etkenlere (genetik çeşitlilik gibi) bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. *C. jejuni*'nin identifikasyonu için altı, *C. coli*'nin identifikasyonu için dört, *C. jejuni* ve *C. coli*'nin multipleks temelli identifikasyonu için bir yöntem olmak üzere toplam 11 farklı PCR yönteminin karşılaştırıldığı bir çalışmada, *C. jejuni* tanısında hiç bir yöntemin % 100 doğru olmadığı bildirilmiş ve *C. jejuni*'nin PCR ile identifikasyonunda farklı gen bölgelerini hedef alan primerlerin kullanıldığı birden fazla yöntemin tercih edilmesi önerilmiştir (On & Jordan, 2003).

Sonuç olarak çalışmamız, içme suyu kaynaklarında ilk kez termofilik *Campylobacter*'lerin Edirne'nin bütün bölgelerinde bulunabileceğini göstermektedir. Ülkemizde gıdalarla ve klinik örneklerle yapılan birçok çalışma varken içme suyu ile yapılan çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız, içme suyu olarak kullanılan suyun arıtımı, depolanması ve dağıtımında meydana gelen aksaklıkların, dünyanın değişik bölgerinde olduğu gibi araştırdığımız bölgede de olası salgınlara sebep olabileceğini göstermektedir. Bu bakımdan *Campylobacter* enfeksiyonlarının epidemiyolojisinin tam olarak aydınlatılması amacıyla daha geniş araştırmaya ihtiyaç vardır. Ayrıca çalışmamız, indikatör bakteri yokluğunda termofilik *Campylobacter'*lerin varlığının araştırılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Ahmed, W., Huygens, F., Goonetilleke, A., & Gardner, T. (2008). Real-Time PCR Detection of Pathogenic Microorganisms in Roof-Harvested Rainwater in Southeast Queensland, Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(17), 5490-5496. https://doi.org/10.1128/AEM.00331-08

Ahmed, W., Sawant, S., Huygens, F., Goonetilleke, A., & Gardner, T. (2009). Prevalence and occurrence of zoonotic bacterial pathogens in surface waters determined by quantitative PCR. *Water Research*, *43*(19), 4918-4928. https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.03.041

Banting, G. S., Braithwaite, S., Scott, C., Kim, J., Jeon, B., Ashbolt, N., Ruecker, N., Tymensen, L., Charest, J., Pintar, K., Checkley, S., & Neumann, N. F. (2016). Evaluation of Various Campylobacter-Specific Quantitative PCR (qPCR) Assays for Detection and Enumeration of Campylobacteraceae in Irrigation Water and Wastewater via a Miniaturized Most-Probable-Number–qPCR Assay. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(15), 4743-4756. https://doi.org/10.1128/AEM.00077-16

Bartholomew, N., Brunton, C., Mitchell, P., Williamson, J., & Gilpin, B. (2014). A waterborne outbreak of campylobacteriosis in the South Island of New Zealand due to a failure to implement a multi-barrier approach. *Journal of Water and Health*, *12*(3), 555-563. https://doi.org/10.2166/wh.2014.155

Berberoğlu, U. (2012). *Su Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları El Kitabı*.11.

Bui, X. T. (2012). *Survival and Virulence of Campylobacter spp. In the Environment*. 215.

Bullman, S., Corcoran, D., O'Leary, J., O'Hare, D., Lucey, B., & Sleator, R. D. (2011). Emerging dynamics of human campylobacteriosis in Southern Ireland. *FEMS*

Immunology & Medical Microbiology, *63*(2), 248-253. https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00847.x

Casey, E., Fitzgerald, E., & Lucey, B. (2017). Towards understanding clinical campylobacter infection and its transmission: Time for a different approach? *British Journal of Biomedical Science*, *74*(2), 53-64. https://doi.org/10.1080/09674845.2017.1291205

Chukwu, Luther King Abia, Ubomba-Jaswa, Obi, & Dewar. (2019). Characterization and Phylogenetic Analysis of Campylobacter Species Isolated from Paediatric Stool and Water Samples in the Northwest Province, South Africa. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *16*(12), 2205. https://doi.org/10.3390/ijerph16122205

Clark, S. T., Gilbride, K. A., Mehrvar, M., Laursen, A. E., Bostan, V., Pushchak, R., & McCarthy, L. H. (2011). Evaluation of low-copy genetic targets for waterborne bacterial pathogen detection via qPCR. *Water Research*, *45*(11), 3378-3388. https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.03.050

Cools, I., Uyttendaele, M., Caro, C., D'Haese, E., Nelis, H. J., & Debevere, J. (2003). Survival of Campylobacter jejuni strains of different origin in drinking water. *Journal of Applied Microbiology*, *94*(5), 886-892. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01916.x

Daoud, A. K., Swaileh, K. M., Hussein, R. M., & Matani, M. (2011). Quality assessment of roof-harvested rainwater in the West Bank, Palestinian Authority. *Journal of Water and Health*, *9*(3), 525-533. https://doi.org/10.2166/wh.2011.148

Dasti, J. I., A Malik, T., & Raimond, L. (2010). *Campylobacter jejuni: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms*.

David, J. M., Pollari, F., Pintar, K. D. M., Nesbitt, A., Butler, A. J., & Ravel, A. (2017). Do contamination of and exposure to chicken meat and water drive the temporal dynamics of *Campylobacter* cases? *Epidemiology and Infection*, *145*(15), 3191-3203. https://doi.org/10.1017/S0950268817002199

Debruyne, L., Gevers, D., & Vandamme, P. (2016). *Taxonomy of the Family Campylobacteraceae*. 24.

El-Adawy, H., Hotzel, H., Tomaso, H., Neubauer, H., & Hafez, H. M. (2012). Elucidation of colonization time and prevalence of thermophilic Campylobacter species during turkey rearing using multiplex polymerase chain reaction. *Poultry Science*, *91*(2), 454-459. https://doi.org/10.3382/ps.2010-01810

Etchie, A. T., Etchie, T. O., Adewuyi, G. O., Kannan, K., Wate, S. R., Sivanesan, S., & Chukwu, A. U. (2014). Influence of seasonal variation on water quality in tropical water distribution system: Is the disease burden significant? *Water Research*, *49*, 186-196. https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.11.023

Ferguson, D. M., Griffith, J. F., McGee, C. D., Weisberg, S. B., & Hagedorn, C. (2013). Comparison of *Enterococcus* Species Diversity in Marine Water and Wastewater Using Enterolert and EPA Method 1600. *Journal of Environmental and Public Health*, *2013*, 1-6. https://doi.org/10.1155/2013/848049

Fermér, C., & Engvall, E. O. (1999). Specific PCR Identification and Differentiation of the Thermophilic Campylobacters, Campylobacter jejuni, C. coli, C. lari, and C. upsaliensis. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*(10), 3370-3373. https://doi.org/10.1128/JCM.37.10.3370-3373.1999

Ferrari, S., Frosth, S., Svensson, L., Fernström, L. -L., Skarin, H., & Hansson, I. (2019). Detection of *Campylobacter* spp. In water by dead-end ultrafiltration and application at farm level. *Journal of Applied Microbiology*, *127*(4), 1270-1279. https://doi.org/10.1111/jam.14379

Fittipaldi, M., Codony, F., Adrados, B., Camper, A. K., & Morató, J. (2011). Viable Real-Time PCR in Environmental Samples: Can All Data Be Interpreted Directly? *Microbial Ecology*, *61*(1), 7-12. https://doi.org/10.1007/s00248-010-9719-1

Fitzgerald, C. (2015). Campylobacter. *Clinics in Laboratory Medicine*, *35*(2), 289-298. https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.03.001

Frasao, B. da S., Marin, V. A., & Conte-Junior, C. A. (2017). Molecular Detection, Typing, and Quantification of *Campylobacter* spp. in Foods of Animal Origin: *Campylobacter* molecular tools in food…. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *16*(4), 721-734. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12274

Geissler, A. L., Bustos Carrillo, F., Swanson, K., Patrick, M. E., Fullerton, K. E., Bennett, C., Barrett, K., & Mahon, B. E. (2017). Increasing Campylobacter Infections, Outbreaks, and Antimicrobial Resistance in the United States, 2004–2012. *Clinical Infectious Diseases*, *65*(10), 1624-1631. https://doi.org/10.1093/cid/cix624

Hellein, K. N., Battie, C., Tauchman, E., Lund, D., Oyarzabal, O. A., & Lepo, J. E. (2011). Culture-based indicators of fecal contamination and molecular microbial indicators rarely correlate with Campylobacter spp. In recreational waters. *Journal of Water and Health*, *9*(4), 695-707. https://doi.org/10.2166/wh.2011.154

Hinlo, R., Gleeson, D., Lintermans, M., & Furlan, E. (2017). Methods to maximise recovery of environmental DNA from water samples. *PLOS ONE*, *12*(6), e0179251. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179251

Hudson, D. A., Cressey, P., & Gilbert, S. (2007). *Prepared as part of a New Zealand Food Safety Authority contract for scientific services*. 76.

Igwaran, A., & Okoh, A. I. (2019). Human campylobacteriosis: A public health concern of global importance. *Heliyon*, *5*(11), e02814. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02814

Isabel, R. (2019). Campylobacter jejuni bacteremia in a patient with asplenia and enteritis. *IDCases*, *17*, e00555. https://doi.org/10.1016/j.idcr.2019.e00555

ISO 9308-1, 2014. Water quality - Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria - Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora, Geneva, Switzerland.

Kaakoush, N. O., Castaño-Rodríguez, N., Mitchell, H. M., & Man, S. M. (2015). Global Epidemiology of Campylobacter Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, *28*(3), 687-720. https://doi.org/10.1128/CMR.00006-15

Kayman, T., Abay, S., & Hizlisoy, H. (2012). *Campylobacter Türlerinin Fenotipik Yöntemler ve Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılıkları*. 10.

Kayman, T., Aydin, F., Abay, S., & DiKer, K. S. (2016). Co-infection with Campylobacter jejuni Subtypes in Patients with Acute Gastroenteritis. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*. https://doi.org/10.5222/TMCD.2015.117

Kelley, B. R., Ellis, J. C., Hyatt, D., Jacobson, D., & Johnson, J. (2018). Isolation and Whole-Genome Sequencing of Environmental *Campylobacter*. *Current Protocols in Microbiology*, *51*(1), e64. https://doi.org/10.1002/cpmc.64

Ketley, J. M., & Konkel, M. E. (2005). *Campylobacter: Molecular and Cellular Biology* (1. bs). Horizon Bioscience.

Khan, I. U. H., Gannon, V., Jokinen, C. C., Kent, R., Koning, W., Lapen, D. R., Medeiros, D., Miller, J., Neumann, N. F., Phillips, R., Schreier, H., Topp, E., van Bochove, E., Wilkes, G., & Edge, T. A. (2014). A national investigation of the prevalence and diversity of thermophilic Campylobacter species in agricultural watersheds in Canada. *Water Research*, *61*, 243-252. https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.05.027

Khan, I. U. H., Gannon, V., Loughborough, A., Jokinen, C., Kent, R., Koning, W., Lapen, D. R., Medeiros, D., Miller, J., Neumann, N., Phillips, R., Robertson, W., Schreier, H., Topp, E., van Bochove, E., & Edge, T. A. (2009). A methods comparison for the isolation and detection of thermophilic Campylobacter in agricultural watersheds. *Journal of Microbiological Methods*, *79*(3), 307-313. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.09.024

Lastovica, A. J. (2006). Emerging Campylobacter spp.: The tip of the iceberg. *Clinical Microbiology Newsletter*, *28*(7), 49-56. https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2006.03.004

Lastovica, A. J., On, S. L. W., & Zhang, L. (2014). The Family Campylobacteraceae. Içinde E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, & F. Thompson (Ed.),

The Prokaryotes (ss. 307-335). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-39044-9_274

Lopez-Roldan, R., Tusell, P., Cortina, J. L., Courtois, S., & Cortina, J. L. (2013). On-line bacteriological detection in water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *44*, 46-57. https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.10.010

Man, S. M. (2011). The clinical importance of emerging Campylobacter species. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *8*(12), 669-685. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.191

Mandal, R. K., Jiang, T., & Kwon, Y. M. (2017). Essential genome of Campylobacter jejuni. *BMC Genomics*, *18*(1), 616. https://doi.org/10.1186/s12864-017-4032-8

Masaaki K, S. P. (2014). Rapid Detection Technologies for Monitoring Microorganisms in Water. *Biosensors Journal*, *03*(01). https://doi.org/10.4172/2090-4967.1000109

Moreira, N. A., & Bondelind, M. (2017). Safe drinking water and waterborne outbreaks. *Journal of Water and Health*, *15*(1), 83-96. https://doi.org/10.2166/wh.2016.103

Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A., & Çev. Başustaoğlu, A. C. (2010). *Tıbbi Mikrobiyoloji*. Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti.

Nachamkin, Szymanski, & Blaser (Ed.). (2008). Epidemiology of Campylobacter jejuni Infections in Industrialized Nations. Içinde *Campylobacter, Third Edition* (ss. 163-189). American Society of Microbiology. https://doi.org/10.1128/9781555815554.ch9

National Institute of Health and Welfare, Pitkanen, T., Hanninen, M.-L., & University of Helsinki. (2019). Members of the family Campylobacteraceae: Campylobacter jejuni, Campylobacter coli. Içinde Michigan State University, J. Rose, B. Jiménez-Cisneros, & UNESCO - International Hydrological Programme (Ed.), *Global Water Pathogen Project*. Michigan State University. https://doi.org/10.14321/waterpathogens.23

Nyati, K. K., & Nyati, R. (2013). Role of *Campylobacter jejuni* Infection in the Pathogenesis of Guillain-Barré Syndrome: An Update. *BioMed Research International*, *2013*, 1-13. https://doi.org/10.1155/2013/852195

On, S. L. W., & Jordan, P. J. (2003). Evaluation of 11 PCR Assays for Species-Level Identification of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(1), 330-336. https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.330-336.2003

Ono, M., Sato, H., Shirahashi, M., Tomioka, N., Maeda, J., Watanabe, K., Amagata, T., Ikeda, T., Yakubo, K., & Fukuiya, T. (2015). Clinical Features of Miller-Fisher Syndrome in Pregnancy. *Case Reports in Obstetrics and Gynecology*, *2015*, 1-3. https://doi.org/10.1155/2015/840680

Oyarzabal, O. A. (2013). Update on Campylobacter Methodologies. *Journal of Microbiological Methods*, *95*(1), 1-2. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.07.013

Özkuyumcu, C. (2009). *Hacettepe Mikrobiyoloji Serisi-1 Klinik Bakteriyoloji El Kitabı*.

Parkhill, j, Wren, B. W., Ketley, J. M., Churcher, C., & Bashom, D. (2000). *The genome sequence of the food-borne pathogen Campylobacter jejuni reveals hypervariable sequences*.

Paruch, L., Paruch, A. M., & Sørheim, R. (2020). DNA-based faecal source tracking of contaminated drinking water causing a large Campylobacter outbreak in Norway 2019. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, *224*, 113420. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.113420

Pedati, C., Koirala, S., Safranek, T., Buss, B. F., & Carlson, A. V. (2019). Campylobacteriosis Outbreak Associated with Contaminated Municipal Water Supply—Nebraska, 2017. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, *68*(7), 169-173. https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6807a1

Pitkänen, T. (2010). *Studies on the Detection Methods of Campylobacter and Faecal Indicator Bacteria in Drinking Water*. 116.

Pitkänen, T. (2013). Review of Campylobacter spp. In drinking and environmental waters. *Journal of Microbiological Methods*, *95*(1), 39-47. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.06.008

Pitkänen, T., Bräcker, J., Miettinen, I. T., Heitto, A., Pesola, J., & Hakalehto, E. (2009). Enhanced enrichment and detection of thermotolerant *Campylobacter* species from water using the Portable Microbe Enrichment Unit and real-time PCR. *Canadian Journal of Microbiology*, *55*(7), 849-858. https://doi.org/10.1139/W09-040

Pitkänen, T., Miettinen, I. T., Nakari, U.-M., Takkinen, J., Siitonen, A., Kuusi, M., Holopainen, A., Nieminen, K., & Hänninen, M.-L. (2008). Faecal contamination of a municipal drinking water distribution system in association with Campylobacter jejuni infections. *Journal of Water and Health*, *6*(3), 365-376. https://doi.org/10.2166/wh.2008.050

Redondo, N., Carroll, A., & McNamara, E. (2019). Molecular characterization of Campylobacter causing human clinical infection using whole-genome sequencing: Virulence, antimicrobial resistance and phylogeny in Ireland. *PLOS ONE*, *14*(7), e0219088. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219088

Said, B., Wright, F., Nichols, G. L., Reacher, M., & Rutter, M. (2003). Outbreaks of infectious disease associated with private drinking water supplies in England and Wales 1970–2000. *Epidemiology and Infection*, *130*(3), 469-479. https://doi.org/10.1017/S0950268803008495

Snezana Ivanovic. (2012). Campylobacter as a cause of gastroenteritis in humans and animals. *African Journal of Microbiology Research*, *6*(8). https://doi.org/10.5897/AJMR11.1094

St-Pierre, K., Levesque, S., Frost, E., Carrier, N., Arbeit, R. D., & Michaud, S. (2009a). Thermotolerant Coliforms Are Not a Good Surrogate for Campylobacter spp. In Environmental Water. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(21), 6736-6744. https://doi.org/10.1128/AEM.00486-09

St-Pierre, K., Levesque, S., Frost, E., Carrier, N., Arbeit, R. D., & Michaud, S. (2009b). Thermotolerant Coliforms Are Not a Good Surrogate for Campylobacter spp. In Environmental Water. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(21), 6736-6744. https://doi.org/10.1128/AEM.00486-09

Şadi Yenen, O. (2010). *Tıbbi Mikrobiyoloji*. Nobel Tıp Kitabevleri.

Tanchou, V., European Commission, Joint Research Centre, & Institute for the Protection and the Security of the Citizen. (2014). *Review of methods for the rapid identification of pathogens in water samples: ERNCIP thematic area Chemical & Biological Risks in the Water Sector Task 7, deliverable 1.* Publications Office. http://dx.publications.europa.eu/10.2788/18775

Tissier, A., Denis, M., Hartemann, P., & Gassilloud, B. (2012). Development of a Rapid and Sensitive Method Combining a Cellulose Ester Microfilter and a Real-Time Quantitative PCR Assay To Detect Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in 20 Liters of Drinking Water or Low-Turbidity Waters. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(3), 839-845. https://doi.org/10.1128/AEM.06754-11

Topçu, A. W., Söyletir, G., & Doğanay, M. (2008). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi* (Nobel Matbaacılık, C. 2). www.nobeltıp.com

Toplak, N., Kovač, M., Piskernik, S., Možina, S. S., & Jeršek, B. (2012). Detection and quantification of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli using real-time multiplex PCR: QmPCR for C. jejuni and C. coli. *Journal of Applied Microbiology*, *112*(4), 752-764. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05235.x

Van Dyke, M. I., Morton, V. K., McLellan, N. L., & Huck, P. M. (2010). The occurrence of Campylobacter in river water and waterfowl within a watershed in southern Ontario, Canada: Campylobacter in river water. *Journal of Applied Microbiology*, *109*(3), 1053-1066. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04730.x

Vandenberg, O., Skirrow, M. B., & Butzler, J.-P. (2010). *Campylobacter and Arcobacter*. 22.

Vondrakova, L., Pazlarova, J., & Demnerova, K. (2014). Detection, identification and quantification of Campylobacter jejuni, coli and lari in food matrices all at once using multiplex qPCR. *Gut Pathogens*, *6*(1), 12. https://doi.org/10.1186/1757-4749-6-12

Whiley, H., van den Akker, B., Giglio, S., & Bentham, R. (2013). The Role of Environmental Reservoirs in Human Campylobacteriosis. *International Journal of*

Environmental Research and Public Health, *10*(11), 5886-5907. https://doi.org/10.3390/ijerph10115886

Wiemer, D., Loderstaedt, U., von Wulffen, H., Priesnitz, S., Fischer, M., Tannich, E., & Hagen, R. M. (2011). Real-time multiplex PCR for simultaneous detection of Campylobacter jejuni, Salmonella, Shigella and Yersinia species in fecal samples. *International Journal of Medical Microbiology*, *301*(7), 577-584. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.06.001

World Health Organization. (2017). *Guidelines for drinking-water quality.*

Yamazaki-Matsune, W., Taguchi, M., Seto, K., Kawahara, R., Kawatsu, K., Kumeda, Y., Kitazato, M., Nukina, M., Misawa, N., & Tsukamoto, T. (2007). Development of a multiplex PCR assay for identification of Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter hyointestinalis subsp. Hyointestinalis, Campylobacter jejuni, Campylobacter lari and Campylobacter upsaliensis. *Journal of Medical Microbiology*, *56*(11), 1467-1473. https://doi.org/10.1099/jmm.0.47363-0

Yang, C., Jiang, Y., Huang, K., Zhu, C., & Yin, Y. (2003). Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk and environmental water. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *38*(3), 265-271. https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00168-8

Young, K. T., Davis, L. M., & DiRita, V. J. (2007). Campylobacter jejuni: Molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, *5*(9), 665-679. https://doi.org/10.1038/nrmicro1718

https://webdosya.csb.gov.tr

ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Bulgaristan'nın Kırcaali şehrinde doğdum. İlk 8 yıllık öğrenimini 1989 yılında Bulgaristan'da tamamladım. 1993 yılında Kırklareli 60.Yıl Sağlık Meslek Lisesi'nden mezun oldum ve aynı yıl Kırklareli'de Sağlık Bakanlığı'nın personeli olarak Sağlık Memuru ünvanıyla göreve başladım. 1995 yılında T.Ü. Kırklareli Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Sağlık Teknikerliği (Sağlık Memurluğu) Bölümünden mezun oldum. 2002 yılında T.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldum. 2003 yılında askerlik görevimi tamamladım. 2013 yılında T.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Endüstriyel Mikrobiyoloji Bölümü'nde yüksek lisansı tamamladım. Halen Edirne İl Sağlık Müdürlüğü Halk Sağlığı Laboratuvarı'nda Biyolog ünvanıyla çalışmaktayım. Evli ve iki kız babasıyım.