T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ (VET) ANABİLİM DALI

SIĞIR VE KOYUN KIYMALARINDA *ARCOBACTER* TÜRLERİNİN PREVALANSI VE MULTİPLEKS PCR TEKNİĞİ İLE İDENTİFİYE EDİLMESİ

DOKTORA TEZİ

Nurhan ERTAŞ

Danışman

Prof. Dr. Yusuf DOĞRUER

KONYA 2007

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ (VET) ANABİLİM DALI

SIĞIR VE KOYUN KIYMALARINDA *ARCOBACTER* TÜRLERİNİN PREVALANSI VE MULTİPLEKS PCR TEKNİĞİ İLE İDENTİFİYE EDİLMESİ

DOKTORA TEZİ

Nurhan ERTAŞ

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 11/12/2007 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oy birliği ile kabul edilmiştir. (S.B.E. YÖN. Kur. Karar tarih ve No:)

Tez Jürisi: Prof. Dr. Suzan YALÇIN
Prof. Dr. Yusuf DOĞRUER
Prof. Dr. Mehmet ATEŞ
Doç. Dr. Ahmet GÜNER
Doç. Dr. Zafer GÖNÜLALAN

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ …… 1

2. LİTERATÜR BİLGİ …….. 3

2.1. *Arcobacter* Türleri, Genel Özellikleri ve Sınıflandırma …….. 3

2.1.1. Tarihçe ……. 3

2.1.2. *Arcobacter'*lerin Genel Özellikleri ……..... 5

2.1.3. *Arcobacter* Türleri …… 8

2.1.3.1. *Arcobacter cryaerophilus* …… 8

2.1.3.2. *Arcobacter butzleri* 10

2.1.3.3. *Arcobacter skirrowii* …….. 12

2.1.3.4. *Arcobacter nitrofigilis* 13

2.1.3.5.*Arcobacter cibarius* 14

2.1.3.6 *Arcobacter halophilus* …… 16

2.1.3.7. *Candidatus Arcobacter sulfidicus* ……. 17

2.1.4. Patojenite Faktörleri ……. 19

2.1.5. *Arcobacter* Türlerinin Prevalansı ve Prevalansını Etkileyen Faktörler … 19

2.1.6. *Arcobacter*'lerin Bulaşma Kaynakları …….. 20

2.1.7. Semptomlar ……... 27

2.1.8. *Arcobacter* Türlerinin İzolasyonu ……... 28

2.1.9. *Arcobacter* Türlerinin İdentifikasyonu ……. 33

2.1.10. Kontrol …… 34

3. MATERYAL ve METOT …… 38

3.1. Materyal ……... 38

3.1.1. Numuneler. ……... 38

3.1.2. Besiyerleri ……. 39

3.1.2.1. Arcobacter Zenginleştirme Besiyeri …….. 38

3.1.2.2. Kanlı Agar ……. 38

3.1.2.3. Nitrat Buyyon …… 39

3. 1.2.4. Mac Conkey Agar …… 39

3. 1.2.5. Üre Agar ……... 40

3. 1.2.6. Muller-Hinton Agar ……. 40

3.1.3. Saplement ……. 41

3.1.3.1. Cefoperazone – Amphotericin – Teicoplanin (CAT) ……... 41

3.1.4. Filtre …….. 41

3.1.4.1. Selüloz Asetat Membran Filtre …….. 41

3.1.5. Antibiyotik Diskleri …….. 41

3.1.5.1. Nalidiksik Asit ……... 41

3.1.5.2. Sefalotin ……. 41

3.1.6. Ayıraçlar ……... 42

3.1.6.1. Oksidaz Test Çubuğu ……. 42

3.1.6.2. Katalaz Test Ayıracı ……. 42

3.1.6.3. Nitrat Redüksiyon Test Ayıracı ……. 42

3.1.6.4. Sodyum Hippurat Ayıracı ……. 42

3.1.6.5. Ninhydrine Ayıracı …… 42

3.1.7. Gas Generating Kit …….. ... 42

3.1.8. Boyalar ……. 43

3.1.8.1. Gram Boyama Seti …… … 43

3.1.9. Standart Suş ……. 43

3.1.10. PCR Reaktifleri ……... 44

3.1.10.1. 10X PCR Buffer …….. 44

3.1.10.2.dNTP Mix ……. 44

3.1.10.3. Taq Polimerase……. 44

3.1.10.4. $MgCl_2$ …….. 44

3.1.10.5. Primerler …….. 44

3.1.10.6. VC 100 bp Plus DNA Ladder …….. 45

3.1.10.7. 6 X Loading Dye ……. 45

3.1.10.8. 10 X TBE Electrophoresis Buffer ……... 46

3.1.10.9. Agarose …… 46

3.1.10.10. Ethidium Bromide ……. 46

3.2. Metot …….. 46

3.2.1. *Arcobacter* spp. İzolasyonu ……. 46

3.2.2. Membran Filtrasyon Tekniği …… 47

3.2.3. Mikroskobik Muayene …….. 48

3.2.3.1. Gram Boyama Yöntemi ……. 48

3.2.3.2. Hareket Muayenesi ……..... 48

3.2.4. Biyokimyasal Testler …….. 48

3.2.4.1. Oksidaz Testi …… 49

3.2.4.2. Katalaz Testi ……. 49

3.2.4.3. Nitrat Redüksiyon Testi ……. 49

3.2.4.4. Üreaz Testi ……. 49

3.2.4.5. Hippurat Testi …… 49

3.2.4.8.Nalidiksik asit ve Sefalotin'e Duyarlılık Testi ……... 50

3.2.4.9. Mac Conkey Agarda Üreyebilme Yeteneği ……... 50

3.2.4.10. 37°C ve 42°C'de Üreyebilme Testi ……. 50

3.2.5. Moleküler İdentifikasyon ……. 50

3.2.5.1. DNA Ekstraksiyonu …….. 50

3.2.5.2. Multipleks PCR …… 51

3.2.5.3. Agaroz Jel Elektroforezi …… 51

3.3. İstatistiksel Metot …….. 52

4. BULGULAR …….. 53

4.1. Mikroskobik Muayene Sonuçları …… 53

4.2. Biyokimyasal Test Sonuçları …… .. 54

4.3. Multipleks-PCR Sonuçları ……... 54

4.4. Kıyma Numunelerinde *Arcobacter* spp. Prevalansı …… 57

5.TARTIŞMA ve SONUÇ …… 59

6. ÖZET …… 67

7. SUMMARY ……... 68

8. KAYNAKLAR …….. 69

9. ÖZGEÇMİŞ……... 81

10. TEŞEKKÜR …… 82

KISALTMALAR

a_w :	Su aktivitesi
ASB :	Arcobacter Selektif Broth
ASM :	Arcobacter Selective Semisolid Medium
AB :	Arcobacter Broth
AZB :	Arcobacter Zenginleştirme Broth
ASIB :	Arcobacter Selektif İzolasyon Broth
ASIA :	Arcobacter Selektif İzolasyon Agar
ASB :	Arcobacter Selektif Zenginleştirme Broth
AFLP :	Amplified Fragment Length Polimorphism
CAT :	Cefoperazone Amfoterisin Teikoplanin
CIN :	Cefsulodin – Irgasan – Novoniosin
HACCP :	Hazard Analysis Critical Control Point
H_2S :	Hidrojen Sülfür
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EMJH P-80 :	Ellinghausen McCullough Johnson Harris Polysorbate – 80
ERIC-PCR :	Enterobacterial Repetetive Intergenic Consensus PCR
ICMSF :	International Commission on Microbiological Specifications for Food

JM :	Johnson Murano Agar
IL-8 :	İnterleukin-8
kDa :	kiloDalton
MCCDA :	modified Charcoal Cefoperazone Desoxycholate Agar
m PCR :	Multipleks Polimerase Chain Reaction
MR :	Metil Red
NaCl :	Sodyum Klorür
PCR :	Polimerase Chain Reaction
RFLP-PCR :	Restrictin Fragment Length Polymorphsm-Polimerase Chain Reaction
RFLP :	Restrictin Fragment Length Polymorphsm
RAPD :	Randomly Amplified Polymorphic DNA
Rpm :	Revolution Per Minute
TSIA :	Triptose Sugar Iron Agar
VP :	Voges Proskauer
χ^2	Pearson Chi-Square

RESİM LİSTESİ

Resim 2.1. *Arcobacter* spp.'lerin Flegellalarının Elektron Mikroskobundaki Görünümü ……..... 5

Resim 2.2. *A. cryaerophilus* Elektron Mikroskobunda Görünümü ……..... 9

Resim 2.3. *Arcobacter butzleri'nin* Elektron Mikroskobik Görünümü …… 10

Resim 2.4. *A. skirrowi* Elektron Mikroskobik Görünümü……. 13

Resim 2.5. *A. cibarius*'un Elektron Mikroskobik Görünümü ……..... 15

Resim 2.6.a. *A. holaphilus*'un Elektron Mikroskobik Görünümü ……..... 16

Resim 2.6.b-c *A. halophilus*'un Polar Flegellası …….. 16

Resim 2.7. Elektron Mikroskobunda Flamentöz Sülfür Üreten *Candidatus Arcobacter sulfidicus*'un Dört Polar Flagellası……... 17

Resim 2.8. *A. butzleri'* nin Elekron Mikroskobunda Porlardan Filtre Olurken Resimlenmiş Görünümü ……... 30

Resim 3.1. Membran Filtarasyon Yöntemi ile Yapılan Ekimler…… 47

Resim 4.1. Kanlı Agardaki *Arcobacter* Kolonileri……... 53

Resim 4.2. Sığır Kıyma Numunelerinde m-PCR Ürünleri ……..... 55

Resim 4.3. Koyun Kıyma Numunelerinde m-PCR Ürünleri……..… 56

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 4.1. *Arcobacter* Türlerinin Toplam Kıyma Numunelerinde Dağılımı……... 58

Şekil 4.2. *Arcobacter* Türlerinin Koyun ve Sığır Kıyma Numunelerinde Dağılımı …….. 58

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. *Arcobacter* Türlerinin Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri…… 18

Tablo 2.2. *Arcobacter* Türlerinin Bilinen Kaynakları ve İlişkili Olduğu Hastalıklar…….. 21

Tablo. 3.1. Çalışmada Kullanılan Primerlerin Dizilimi ……. 45

Tablo 4.1. Kıyma Numunelerinden Elde Edilen İzolatların Fenotipik Özellikleri……. 54

Tablo 4.2. Sığır ve Koyun Kıymalarında *Arcobacter* Türlerinin Prevalansı ……. 57

Tablo 4.3. *Arcobacter* Pozitif Numunelerdeki *A.butzleri* ve A. *skirrowi*'nin Prevalansı ……. 57

1. GİRİŞ

Yeterli ve dengeli beslenme, insan vücudunun gereksinimi olan besin unsurlarının (örn. protein, yağ, karbonhidart, vitamin) gereken miktarlarda alınmasıdır. Dengeli beslenmede önemli bir rolü olan et, diğer birçok gıda maddesinde olduğu gibi değişen oranlarda protein, yağ, karbonhidrat, mineral madde, vitamin ve diğer besin unsurlarından oluşmuştur.

Etin insan yiyeceği olarak geçmişi insanlığın tarihi kadar eskidir. İnsanlığın ilk dönemlerinde ilkel topluluklar avlandıkları hayvanlara ait etleri yiyecek olarak tüketirken, deri ve postlarının giyinme ve barınma ihtiyaçlarını karşılamak amacı ile kullanmışlardır. Zamanla et, gelişen insan toplumlarının en önemli gıda maddesi haline gelmiştir.

Et, uygun pişirilip hazırlandığı zaman göze çok hoş görünümlü, lezzetli bir gıda maddesidir. Et insanın lezzet duygularını tatmin ettiği gibi açlık duygusunu bastırır. Yavaş fakat etkin bir şekilde sindirildiği için insanı diğer pek çok yiyecekten daha uzun süre tok tutan et, hemen hemen tamamen sindirilebilen bir gıdadır.

Beslenmede büyük önem taşıyan et ve et ürünleri sağlıklı yetiştirilmiş hayvanlardan elde edilmez, asgari teknik ve hijyenik şartlara sahip mezbahalarda kesilmez ve uygun muhafaza koşulları sağlanmaz ise insan sağlığı açısından ciddi tehlikelerin oluşumuna neden olabilirler. Bugün dünya da meydana gelen gıda kaynaklı sağlık sorunları içerisinde et ve et ürünlerinin oluşturduğu riskler ilk sırada yer almaktadır. Et ve et ürünlerinden kaynaklanan sağlık problemlerinin; üretim, işleme, muhafaza, taşıma, pazarlama ve tüketim zincirindeki yetersiz ve bilinçsiz uygulamalara bağlı olarak meydana geldiği belirtilmektedir.

Arcobacter türleri gıda kaynaklı mikrobiyel tehlikelerden birisi olarak tanımlanmıştır. İlk olarak abort yapmış sığır ve domuzlardan izole edilen *Arcobacter* türleri insan ve hayvanlarda neonatal septisemi, gastroenteritis, mastitis gibi hastalıklara sebep olur. İnsan veya hayvanlara bulaşmalarının su ve gıda kaynaklı olduğu kabul edilmektedir. *Arcobacter* türleri insanlara, kanatlı

hayvanların karkaslarından, kontamine içme sularından ve kırmızı etlerden bulaşabilmektedir.

Bu çalışmada, Kayseri ilinde tüketime sunulan koyun ve sığır kıymalarında *Arcobacter* türlerinin varlığının saptanması ve elde edilen izolatlardan multiplex Polimerase Chain Reaction (m PCR) tekniği ile tür düzeyinde identifikasyonu yapılarak kıyma numunelerinin birden fazla suşla kontamine olup olmadığının tespit edilmesi amaçlanarak bu mikroorganizmanın halk sağlığı açısından oluşturabileceği risklerin ortaya konulması hedeflenmiştir.

2. LİTERATÜR BİLGİ

2.1.*ARCOBACTER* TÜRLERİ, GENEL ÖZELLİKLERİ VE SINIFLANDIRMA

2.1.1. Tarihçe

Önceleri aerotolerant *Campylobacter* olarak bilinen *Arcobacter'*ler ilk kez Ellis ve arkadaşları tarafından 1977 yılında aborte sığır ve domuz fetuslarından izole edilmiştir (De Oliveira ve ark 1999, Atabay ve ark 2001, Phillips 2001a, Houf ve ark 2002a,b, Rivas ve ark 2004, Vandenberg ve ark 2004, Van Drissche ve ark 2005).

*Arcobacter'*ler başlangıçta *Campylobacter* olarak identifiye edilmiş ve iki farklı biyokimyasal grup içerdikleri belirtilmiştir. Bu farklı iki gruptan birisi *C. fetus subsp. fetus'*a ait özellikler göstermiştir (Çelik 2000). İkinci grupta yer alan *Campylobacter'*ler mikroaerofilik şartlarda ilk izolasyondan sonra 30 ^{o}C'de aerobik olarak üremelerinden dolayı aerotolerant *Campylobacter* olarak sınıflandırılmıştır. Daha sonra bu grup *Campylobacter cryaerophilus* olarak isimlendirilmiştir (Çelik 2000, De Oliveira ve ark 2001, Kabeya ve ark 2003b, Savaşan ve ark 2003). *Campylobacter cryaerophilus* insanlarda diyare ve bakteriyemi ile seyreden hastalıklardan, reprodüktif sorun yaşayan çiftlik hayvanlarından, enteritisli hayvanların dışkılarından ve mastitisli hayvanların sütlerinden izole edilmiştir (Kabeya ve ark 2003a,b, Van Driessche ve ark 2005, Scullion ve ark 2006).

Arcobacter türlerinin taksinomisi bakterilerdeki 16S rRNA geninin dizilimine dayanır (Abdelbaqi ve ark 2007). Aerotolerant *Campylobacter*'lerin filogenetik ilişkileri üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda *Campylobacter*'lerden ve diğer bakterilerden farklı 16S rRNA dizilerine sahip olan *C. cryaerophila* ve *C. nitrofigilis*'in ayrı bir cins olabileceği belirtilmiştir (Kiehlbach ve ark 1991, Savaşan ve ark 2003).

Campylobacteriaceae genusu içerisinde aerotolerant *Campylobacter* olarak adlandırılan *Arcobacter'*lerin ilk izolasyonlarında mikroaerofilik ortam gerektirmelerine rağmen aerobik ortamda da üreyebilmeleri (Wesley ve ark 1995, Antolin ve ark 2001, Houf ve ark 2000,2001a,b, Kabeya ve ark 2003b, Öngör ve

ark 2004, Gude ve ark 2005), 15–30 ^{o}C sıcaklıkları arasında gelişebilmeleri (Atabay ve Corry 1997, Antolin ve ark 2001, Atabay ve ark 2001,2002, Gonzalez ve ark 2000, Moreno ve ark 2004) ve yağ asidi profillerinin farklı olması dolayısı ile *Campylobacter'*lerden ayrıldıkları bildirilmiştir (Wesley ve ark 1995, Ridsale ve ark 1998, On ve ark 2001, Kabeya ve ark 2003a, Long ve Phillips 2003a, Snelling ve ark 2006, Jelinek ve ark 2006)

Arcobacter DNA-DNA ve rRNA-DNA hibridizasyon çalışmalarıyla önce *A. butzleri, A. cryaerophilus* ve *A. skirrowii* olmak üzere üç alt türe ayrılmıştır (Anderson ve ark 1993, Harmon ve ark 1997, Koneman ve ark 1997, Phillips 2001b, On ve ark 2001, 2002). Daha sonra bataklık bitkilerinin kökünden *A. nitrofigilis* izole edilmiştir (Corry ve Atabay 2001, Kabeya ve ark 2003b,Van Drissche ve ark 2004, Gude ve ark 2005).

Ayrıca bu genusta bulunan beşinci tür *Arcobacter cibarius'*dur (Lehner ve ark 2005, Ho ve ark 2006a, Son ve ark 2007a, Cervenka ve ark 2006, Snelling ve ark 2006, Stoeva ve ark 2006). Diğer bir *Arcobacter* türü ise halofilik özellikte olan *A. halophilus*'tur (Snelling ve ark 2006, Ho ve ark 2006a, Stoeva ve ark 2006). *A. cibarius* ilk defa broiler karkasından izole edilmiştir (Son ve ark 2007a, Snelling ve ark 2006, Ho ve ark 2006a, Hansen ve ark 2007). *A. halophilus*, tuzlu sulardan izole edilmiştir (Snelling ve ark 2006, Hansen ve ark 2007).

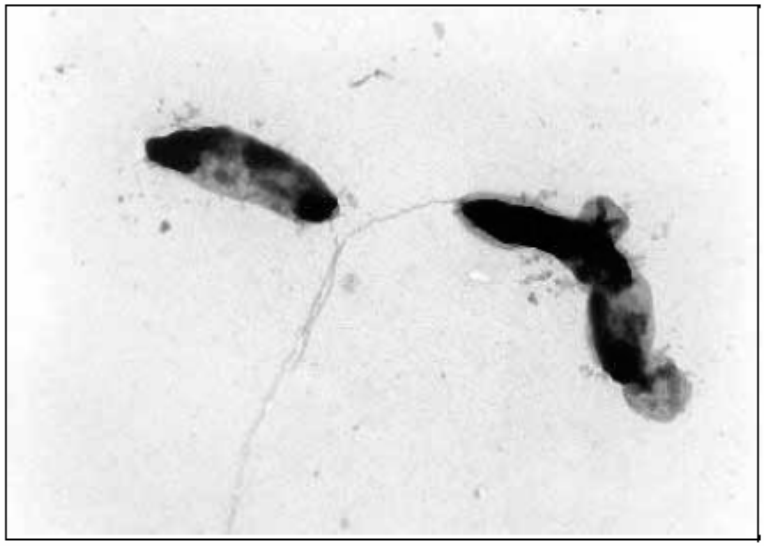
Wirsen ve ark (2002), sahildeki deniz ürünlerinde hidrojen sülfidi okside eden ve metobolik ürün olarak hidrofilik flamentöz sülfür oluşturan ototrofik bir bakteri izole etmişlerdir. Bu izolat *Candidatus Arcobacter sulfidicus* olarak adlandırılmıştır.

Arcobacter türleri klinik olarak genellikle diyareli yetişkin ve çocuklardan izole edilmektedir (Long ve Phillips 2003a, Lehner ve ark 2005, Ho ve ark 2006a, Son ve ark 2007a, Cervenka ve ark 2006, Stoeva ve ark 2006). Bu türlerden *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* ve *A. skirrowi* hem sağlıklı hemde klinik olarak hasta hayvanlarda ve insanlarda tespit edilmiştir. Bu üç tür insanlarda gastroenteritis ve septisemiye neden olurken hayvanlarda, gastroenteritis ve abortlara neden olurlar (Atabay ve Corry 1998, Atabay ve ark 1998, 2001,2002, Forbes ve ark 2002, Houf ve ark 2002a,b,Van Drissche ve ark 2003, Scullion ve ark 2004 Vandenberg ve ark

2006). Ancak sadece bitki köklerinden ve bitki sedimentlerinden izole edilen *A. nitrofigilis*'in, klinik olarak hasta insan ve hayvanlardan izolasyonu yapılamamıştır (Nachamkin 2000, Corry ve Atabay 2001, Atabay ve ark 2003, Carbone ve ark 2003, Gude ve ark 2005).

2.1.2. *Arcobacter*'lerin Genel Özellikleri

Campylobacteriaceae familyasının bir üyesi olan *Arcobacter*'ler 0,2-0,9 X 1-3 µm boyutlarında, Gram negatif, genellikle S şekilli, kıvrımlı (Ridsale ve ark 1998, Nachamkin 2000, Phillips 2001a, b) çomakçık veya helikal şekilli, bazen düz çubuk şeklinde, sporsuz ve kapsülsüz mikroorganizmalardır (Diker 1997, Çelik 2000, Long ve Phillips 2003). Tek bir polar ya da iki ucuna yerleşmiş kılıfsız polar flegalla ile aktif hareketlidirler (Phillips 2001b, Lehner ve ark 2005, Ho ve ark 2006b). Resim 2.1'de *Arcobacter* türlerinin flegellalarının elektron mikroskobik görünümü belirtilmektedir (De Oliveira ve ark 2001).



Resim 2.1. *Arcobacter* spp.'lerin Flegellalarının Elektron Mikroskobundaki Görünümü

Arcobacter'ler kurbağa larvası veya tirbişon benzeri harekete sahiptirler (Aydın ve Atabay 2001, Phillips 2001b, Pervical ve ark 2004, Son ve ark 2007b).

Arcobacter'ler, aerobik ortamlarda ve düşük sıcaklık aralıklarında (15-30^{o}C) üreyebilirler (Wesley 1997, 1999, Ridsale ve ark 1998, Phillips 2001a,b, Forbes ve ark 2002, Ho ve ark 2006b, Aydın ve ark 2007). *Arcobacter*'lerin ilk izolasyonunda türlerin atmosferik gereksinimleri bakımından farklılıklar vardır. *A. cryaerophilus*

ilk izolasyonda genellikle mikroaerofilik ortama gereksinim duyar. Diğer türler ilk izolasyonda normal atmosferde üreyebilirler (Corry ve Atabay 1997, Savaşan ve Çiftçi 2003). Mikroaerofilik ortamda optimal üreme sıcaklığı 37^{o}C'dir. *Arcobacter'*ler için anaerobik üreme ısısı 35-37°C'dir (Corry ve Atabay 1997, Hsueh ve ark 1997, Nachamkin 2000, Phillips 2001a, 2003).

Arcobacter türlerinde optimal üreme pH'sı 5,5-9,5'tir (Hilton ve ark 2001, D'sa ve Harrison 2005, Snelling ve ark 2006). Etken 0.98'in altındaki su aktivitesinde (a_w) inhibe olur (Nachamkin 1997, Lehner ve ark 2005, Snelling ve ark 2006). Üreme için en düşük sıcaklık henüz saptanamamış olup en yüksek sıcaklık ise inkübasyon şartlarına bağlıdır. Etkenin termal ölüm zamanı belirlenememiştir. Ancak radyasyona olan duyarlılıklarının *Campylobacter* türleri için bildirilenden daha az olduğu saptanmıştır (Wesley ve Baetz 1999, Phillips 2001a,b, Forbes ve ark 2002).

*Arcobacter'*lerin metabolizmaları *Campylobacter'*lere benzemektedir. Nonsakkarolitik metabolizmaya sahiptirler (Diker 1997, Çelik 2000, Percival ve ark 2004). D-glukoz ile metobolizmaları inaktive olurken (Percival ve ark 2004), diğer karbonhidratları fermente ve okside edemezler. Dolayısıyla karbonhidratlardan asit ve nötral ürünler oluşturmazlar (Wesley ve ark 1995, Percival ve ark 2004). Karbon kaynağı olarak organik asit ve amino asitleri kullanırlar (Diker 1997, Savaşan ve Çiftçi 2003*).* Çoğu suşlar Mac Conkey agarda (MCA) üreyebilir (Koneman ve ark 1997, Ridsale ve ark 1998, Nachamkin 2000). Etken kanlı agarda 30^{o}C'de 2–3 günlük inkübasyon periyodundan sonra 2-4 mm çapında gri-beyaz, konveks düzgün kenarlı koloniler meydana getirir (Phillips 2001a,b).

Oksidaz, indoksil asetat pozitif (De Oliveira ve ark 1997, Çelik 2000, Phillips 2001a), hippurat, indol, Metil Red (MR), Voges Proskauer (VP) testleri ve üreaz aktivitesi negatiftir. Triptose Sugar Iron Agar (TSIA)'da hidrojen sülfür (H_2S) testi negatiftir. Sisteinden hidrojen sülfür oluşumu, nitrat redüksiyonu, katalaz aktivitesi, DNA hidrolizi, % 1'lik glisinde ve % 8'lik glukozda üreme türlere göre değişir. Eskulini hidrolize etmez, jelatin testi ise negatiftir (Diker 1997, Ridsale ve ark 1998, Forbes ve ark 2002).

Nalidiksik aside duyarlıdır. Sefalotine duyarlılık değişkendir (Wesley 1997,1999, Nachamkin 2000, Kabeya ve ark 2004, Vandenberg ve ark 2006). Etken ciprofloxacin'e duyarlıdır (Otth ve ark 2004, Vandenberg ve ark 2006, Son ve ark 2007b).

*Arcobacter'*lerin koloni şekilleri ve renkleri türlere göre farklılık gösterir. Koloni renkleri en iyi bir şekilde kömürlü besiyerinde gözlenir. *A. cryaerophilus* kolonileri sarı ve bej, *A. nitrofigilis* kolonileri beyaz, *A. butzleri* kolonileri beyaz bej arası ve *A. skirrowi* kolonileri ise gri renkte görülürler (Çelik 2000).

Arcobacter türlerinin çoğunluğu nonhemolitiktir. Ancak *A. skirrowii* ve bazı *A. butzleri* suşları α- hemolitik aktiviteye sahiptirler (Savaşan ve ark 2003).

Etken nisine duyarlıdır (Phillips ve Duggan 2001,2002, Long ve Phillips 2003, Cervanke ve ark 2006, Snelling ve ark 2006). *Lactococcus lactis* subs. *lactis* tarafından üretilen bir bakteriyosin olan nisin özellikle Gram pozitif bakterilere etkilidir (Phillips ve Duggan 2001,2002, Long ve Phillips 2003, Cervanke ve ark 2006).

İnsan ve hayvanlardan izole edilen *Arcobacter'*lerin antibiyotik duyarlılıkları ile ilgili yapılan çalışmalarda *A. butzleri, A. cryaerophilus* ve *A. skirrowi'*nin colistin ve rifampin'e duyarlı oldukları belirtilmiştir (Houf ve ark 2001b). Bu antimikrobiyal maddelere en hassas olan türün ise *A. skirrowi* olduğu bildirilmiştir. 5-fluorouracil, novobiosin, trimethoprim ve teicoplanin *Arcobacter* türleri üzerine herhangi bir inhibitör etkilerinin olmadığını belirtilmiştir (Houf ve ark 2001c). Ayrıca *Arcobacter* türlerinin arilsülfataz ve pirazinamidaz aktivitesi negatifitir (Burnens ve Nicolet 1993).

*Arcobacter'*ler, trimetoprim, vankomisin (Fera ve ark 2003), eritromisin ve kloramfenikol'e dirençlidir (Fera ve ark 2003, Kabeya ve ark 2004, Otth ve ark 2004, Snelling ve ark 2006, Vandenberg ve ark 2006).

Trisodyum fosfat tek başına ya da nisin ile kombine olarak kullanıldığında *A. butzleri*'nin üremesini inhibe edici etkiye sahiptir (Phillips ve Duggan 2001).

2.1.3. *Arcobacter* Türleri

2.1.3.1. *Arcobacter cryaerophilus*

A. cryaerophilus, domuz ve sığırların aborte fetuslarından, plasental dokularından, dişi domuzların uterus ve ovaryal dokularından ve erkek domuzların prepusial sıvablarından izole edilen bir türdür (De Oliveira ve ark 1997, 2001, Phillips 2001b, Savaşan ve Çiftçi 2003, Van Driessche ve ark 2004, Van Driessche ve Houf 2007).

A. cryaerophilus ilk bulunan *Arcobacter* türü olduğundan, başlangıçta Aerotolerant *Campylobacter* olarak da adlandırılmıştır. DNA hibridizasyon çalışmaları ile etken 1A ve 1B olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır (Vandamme ve ark 1992, Koneman ve ark 1997, Savaşan ve ark 2003). Yapılan çalışmalarda bu iki alt grubun DNA baz kompozisyonlarının benzer olduğu belirlenmiştir. Her iki alt grup mikroorganizmanın protein profilleri ve yağ asidi kompozisyon farklılıkları dolayısı ile birbirlerinden ayrılabileceği belirtilmiştir (Vandamme ve ark 1992, Higgins ve ark 1998, Savaşan ve Çiftçi 2003, Jelinek ve ark 2006).

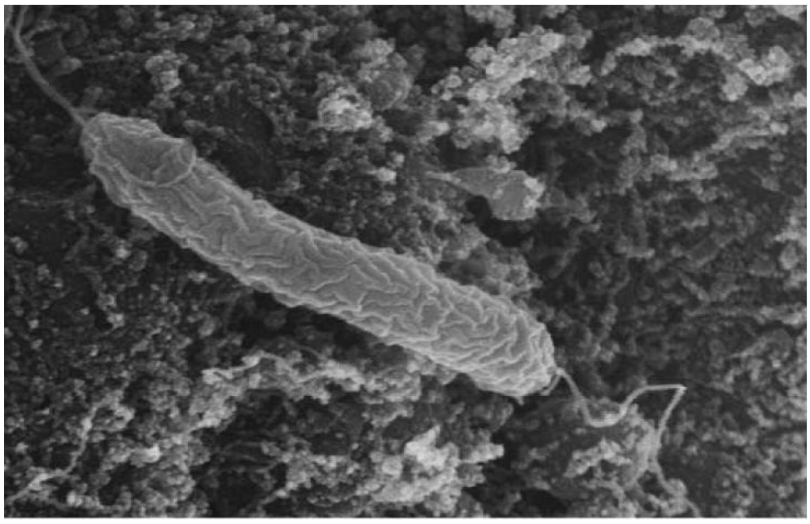
A. cryaerophilus, 0,5X3 µm boyutlarında, kıvrımlı, "S" şekilli yada helikal şekilli mikroorganizmadır (Koneman ve ark 1997, Aydın ve Atabay 2001). Etkenin uzun spiral formlarına da rastlanır (Savaşan Çiftçi 2003). *A. cryaerophilus* tek bir polar flegella ile hareket eder (Çelik 2000, Savaşan ve Çiftçi 2003).

Etken ilk izolasyonda mikroaerofilik ortama ihtiyaç duyar. Optimal üreme sıcaklığı 30 ^{o} C'dir (Konemon ve ark 1997, Ho ve ark 2006b). Bazı suşlar 5-40°C arasında üreyebilir. Fakat bütün suşlar 15°C'de ürerler (Phillips 2001a,b, Ho ve ark 2006b). *A. cryaerophilus* katı agarda 48-72 saatte küçük, yaygın, sarı ya da bej renkte koloniler oluşturur. Suşlar % 3,5 NaCl, % 4 glukoz ve % 1 glisin varlığında üreyemez (Koneman ve ark 1997, Atabay ve ark 2002, Phillips 2001a,b, Philips ve ark 2002).

Etken MCA veya Deoxycholate agar'da üreyemez iken zenginleştirilmiş ve 5-florourasil inhibitörü içeren kanlı agarda ve Cefsulodin Irgasan Novobiosin (CIN)

agarda ürer (Koneman ve ark 1997, Phillips 2001b, Atabay ve ark 2002). İlk izolasyonda 2–3 mm çaplı nonhemolitik koloniler oluşturur (Çelik 2000).

Resim 2.2'de *A. cryaerophilus*'un elektron mikroskobundaki görünümü belirtilmektedir (Ho ve ark 2006b).



Resim 2.2. *A. cryaerophilu'un* Elektron Mikroskobunda Görünümü

TSIA'da ve sistin içeren besi yerinde H_2S üretimi olmaz. MR ve VP testleri negatiftir. İndol, ornitin, lizin, arjinin, dekarboksilaz, üreaz, ribonükleaz ya da deoksiribonükleaz oluşturmazlar (Wesley 1995, Phillips 2001). İndoksil asetat aktivitesi pozitiftir (Konemon ve ark 1997). Kazein, nişasta, hippurat, tributirin ve eskülini hidrolize edemezler (Savaşan ve Çiftçi 2003). Güçlü katalaz aktivitesi gösteren *A. cryaerophilus* kadmiyum kloride duyarlıdır (Harmon ve ark 2007).

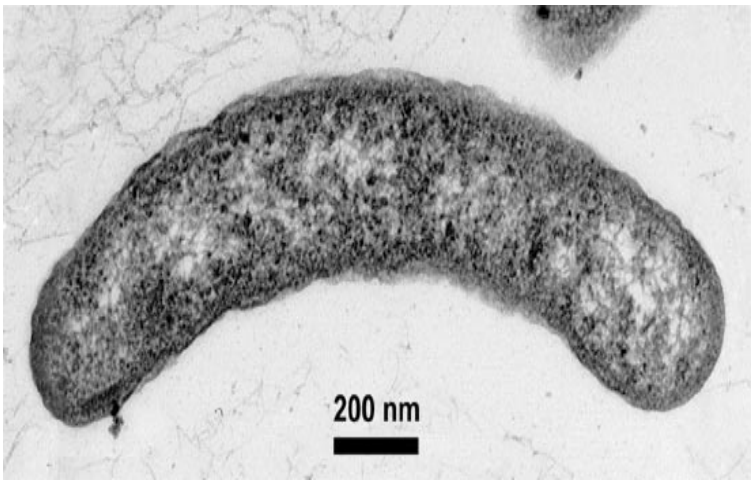
Çocuklarda gastroenteritise neden olan etken, ampisilin, carbenisilin, kloramfenikol, kanamisin, metranidazol, penisilin G ve polimiksin B'ye dirençli (Çelik 2000, Fera ve ark 2003) streptomisin ve nalidiksik asite duyarlıdır (Kabeya ve ark 2004, Otth ve ark 2004). Etken sefalotine dirençlidir (Konemon ve ark 1997). *A. cryaerophilus*'un kontamine yiyecekler, su ve direk temas ile bulaşabileceği, sığır ve domuzlarda veneral bulaşmanında söz konusu olduğu bildirilmiştir (On ve ark 2002, Fera ve ark 2003, Scullion ve ark 2004, Ho ve ark 2006b).

Etken, sığır, koyun ve domuzlarda aborta neden olmaktadır (Konemon ve ark 1997, On ve ark 2002,2003a,b, Ho ve ark 2006b). *A. cryaerophilus*'un domuz ve sığırlarda reprodüktif problemlere ve infertiliteye neden olduğu bildirilmiştir (Boudreau ve ark 1991). Etken karın ağrısı ve diyare semptomu gösteren insanlardan izole edilmiştir. Ancak bu bakterilerin insan hastalıklarındaki rolü ve patojenitesi tam olarak açıklanamamıştır (Husueh ve ark 1997).

2.1.3.2. *Arcobacter butzleri*

İlk kez 1986 yılında iki aylık Rhesus maymunlarından izole edilen *A. butzleri*, önceleri, *C. butzleri* olarak tanımlanmış daha sonraları yapılan taksonomik çalışmalar ile bugünkü adını almıştır (Atabay ve Corry 1998, Higgins ve ark 1998, Wesley ve Baetz 1999).

A. butzleri, Gram negatif, hafif kıvrımlı, "S" şeklindedir. 1-3X0,2–0,4 µm boyutlarındadır (Vandamme ve ark 1992, Nachkhamin ve ark 1998, Eifert ve ark 2003). Tek bir polar flegellası ile hareketli olan etken mikroaerofilik ortamda 15, 25 ve 35^{o}C'de üreyebilir. Aeorbik ortamda üreme sıcaklığı 30^{o}C'dir. Etken 42^{o}C' de üreyemez (Vandamme ve ark 1992, Eifert ve ark 2003). Resim 2.3'de *A. butzleri*'nin elektron mikroskobik görünümü belirtilmektedir (Wirsen ve ark 2002)



Resim 2.3. *Arcobacter butzleri'nin* Elektron Mikroskobik Görünümü

A. butzleri zayıf katalaz aktivitesine sahiptir (Vandamme ve ark 1992, Higgins ve ark 1998, Wesley 1999, Chinivasagam ve ark 2006). Oksidaz aktivitesi, nitrat redüksiyonu pozitif, üreaz aktivitesi ve hippurat hidrolizi negatiftir (Vandamme ve ark 1992, Higgins ve ark 1998, Wesley 1999, Percival ve ark 2004). Karbonhidratları fermente etmeyen *A. butzleri* enerji kaynağı olarak piruvatı kullanır (Eifert ve ark 2003). Etken nisin ve sitrik asite duyarlıdır (Phillips 2001a,b, Phillips ve Duggan 2001, 2002, Cervenka ve ark 2006). Mac Conkey agarda, % 8 glukoz varlığında üreme gösterir (Koneman ve ark 1997, Higgins ve ark 1998, Percival ve ark 2004).

Kanlı agarda 3 gün inkübasyondan sonra yuvarlak, beyaz-bej renkli koloniler oluşturur (Atabay ve ark 1998, Mansfield ve ark 2000). Etken çoğunlukla nonhemolitiktir. DNase aktivitesi pozitiftir (Vandamme ve ark 1992, Lerner ve ark 1994). *A. butzleri* % 1,5 NaCl ve % 1 glisinde üreme yeteneği ile *A. cryaerophilus'*dan ayrılır (Atabay ve ark 1998, Mansfield ve ark 2000). Zayıf katalaz aktivitesi (Vandamme ve ark 1992, Atabay ve ark 1998, Wesley 1999, Chinivasagam ve ark 2006) ve kadmiyum kloride olan direnci ile diğer *Arcobacter'*lerden farklılık gösterir (Harmon ve ark 1997, Atabay ve ark 2003, Chinivasagam ve ark 2006). TSIA'da H_2S oluşturmaz, % 3.5 NaCl varlığında ve % 1 glisin varlığında üreyebilir (Vandamme ve ark 1992). *A. cryaerophilus* ile % 40 oranında DNA benzerliği gösteren *A. butzleri'*nin 16S rRNA analizleri *A. skirrowi'*ye daha yakın olduğunu göstermektedir (Mansfield ve ark 2000). Etken nalidiksik aside duyarlı iken sefalotine dirençlidir (Higgins ve ark 1998, Koneman ve ark 1997 Çelik 2000, Atabay ve ark 2001, De Oliveira ve ark 2001, Savaşan ve ark 2003).

A. butzleri, diyareli insan ve hayvanlarda, aborte fetuslardan, gastroenteritisli ve mide kramplı insanların kanından tespit edilmiştir (Vandamme ve ark 1993, Phillips 2001b, Atabay ve ark 2001, 2002, On ve ark 2002, Mauleon ve ark 2006, Snelling ve ark 2006). Ayrıca etken sulardan, sağlıklı çiftlik hayvanlarından da izole edilmiştir (Atabay ve Corry 1998, De Oliveira ve ark, 1997, 2001, Gude ve ark 2005, Atabay ve ark 2006). Endüstrileşmiş ülkelerde insanların *A. butzleri*'ye maruz kalmalarındaki en önemli araç kontamine besinlerdir (Mauleon ve ark 2006). Et ve

et ürünleri özelliklede kanatlı etleri, etkenin insanlar tarafından alınmasında en önemli kaynak ve riskli gıdayı oluşturmaktadır. Etken en çok kanatlı etlerinden izole edilmiştir (Çelik 2000, Mauleon ve ark 2006, Hansen ve ark 2007).

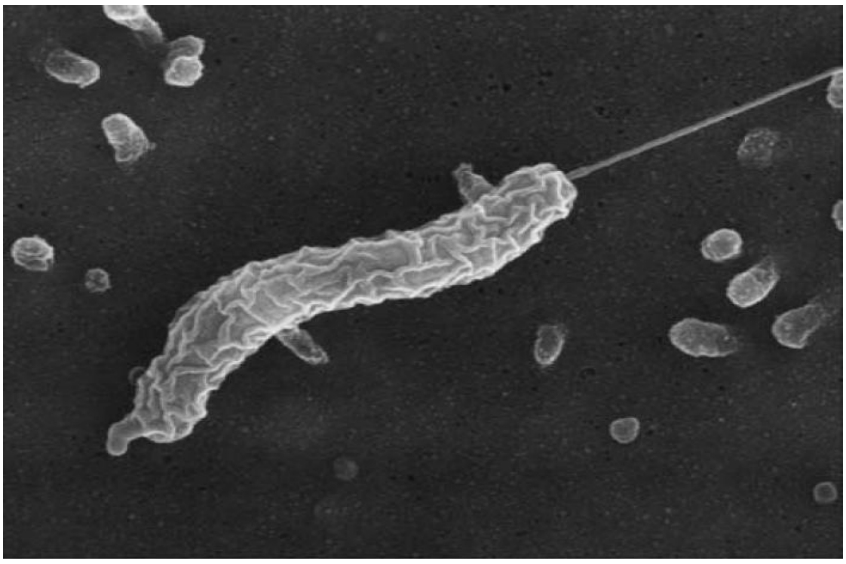
Arcobacter butzleri doğada yaygın olarak bulunan suya adapte olmuş bir bakteridir (Rashid ve ark 2000). İnsanlar ve hayvanlar için kontamine sularda önemli kabul edilen hastalık etkenleri arasında kabul edilir (Vandamme ve ark 1992, Anderson ve ark 1993). *A. butzler*i farklı su kaynaklarından izole edilmiştir (Anderson ve ark 1993, Wesley ve Baetz 1999, On ve ark 2003a, Phillips ve Duggan 2002, Maugeri ve ark 2004). Maugeri ve ark (2004) deniz sularından ve planktonlardan *Arcobacter* türlerinden sadece *A. butzleri* izole etmişlerdir. İnsanlardan en sık izole edilen *A. butzleri* en patojen *Arcobacter* türüdür (Phillips 2001b, Lau ve ark 2002, Carbone ve ark 2003, Fera ve ark 2004, Wybo ve ark 2004, Otth ve ark 2004, Rivas ve ark 2004).

2.1.3.3. *Arcobacter skirrowii*

A. skirrowii, ismini *C. jejuni* türüne ait bakterilerin insan ishallerindeki önemini ilk olarak tanımlayan İngiliz mikrobiyolog M. B. Skirrowii 'den almıştır (Suarez ve ark 1997).

A. skirrowii, kıvrımlı, "S" şekilli çomak şeklindeki mikroorganizma olup, 1-3X0,2-0,4 µm boyutlarındadır (Aydın ve Atabay 2001). Kanlı agarda 3 gün inkübasyondan sonra 2–3 mm çapında koloniler oluşturur. *A. skirrowii'*nin bütün suşları kanlı agarda α- hemoliz yapar (Çelik 2000, Aydın ve Atabay 2001, Atabay ve ark 2003). Mac Conkey agarda, % 1 oxgall varlığında, %1 glisin varlığında üremez. Sisteinli ortamda H_2S oluşturmaz. Suşların çoğu % 1.5 NaCl varlığında üremez. Nalidiksik aside ve sefalotine duyarlıdır (Çelik 2000, Atabay ve ark 2003, Savaşan ve Çiftçi 2003).

Resim 2.4'te *A. skirrow'nin* elektron mikroskobik görünümü belirtilmektedir (Ho ve ark 2006b).



Resim 2.4. *A. skirrow'nin* Elektron Mikroskobik Görünümü

A. skirowii kronik diyareli insanlardan, sığır, domuz ve koyunların aborte fetuslarından, boğaların prepusyal yıkantı sıvılarından ve diyareli hastaların dışkılarından izole edilmiştir (Wesley ve ark 1996, Houf ve ark 2002a,b, Wybo ve ark 2004, Vandenberg ve ark 2004, Van Drissche ve ark 2005, Stoeva ve ark 2006).

2.1.3.4. *Arcobacter nitrofigilis*

A. nitrofigilis, 1980 yılında bir bataklık bitkisi olan *Spartina alterniflora*'nın kökleri ile ilişkili sedimentlerden *Campylobacter* benzeri mikroorganizmalar olarak izole edilmiştir (Houf ve ark 2000, 2001a, Phillips 2001, Atabay ve ark 2003, Son ve ark 2007a). *A. nitrofigilis*, ilk önce *Campylobacter nitrofigilis* olarak tanımlanmış daha sonraları *Arcobacter* genusuna dahil edilmiştir (Houf ve ark, 2000, 2001a, Phillips 2001, Atabay ve ark 2003).

A. nitrofigilis, kıvrımlı ya da spiral olup 1–3 X 0,2–0,9 µm boyutlarındadır. Kılıfsız tek bir polar flagellaya sahiptir ve bununla hareket eder. Bataklıktaki sazlıkların köklerinde bulunur (Mansfield ve ark 2000, Corry ve Atabay 2001, Kabeya ve ark 2003b, Drissche ve ark 2004, Gude ve ark 2005).

A. nitrofigilis 16S rRNA sekansı incelendiğinde, % 89 oranında diğer *Arcobacter* türlerine benzediği belirtilmiştir (Mansfield ve ark 2000). *A. nitrofigilis* tipik koloni morfolojisi ve nitrojenaz aktivitesi ile diğer *Arcobacter'*lerden

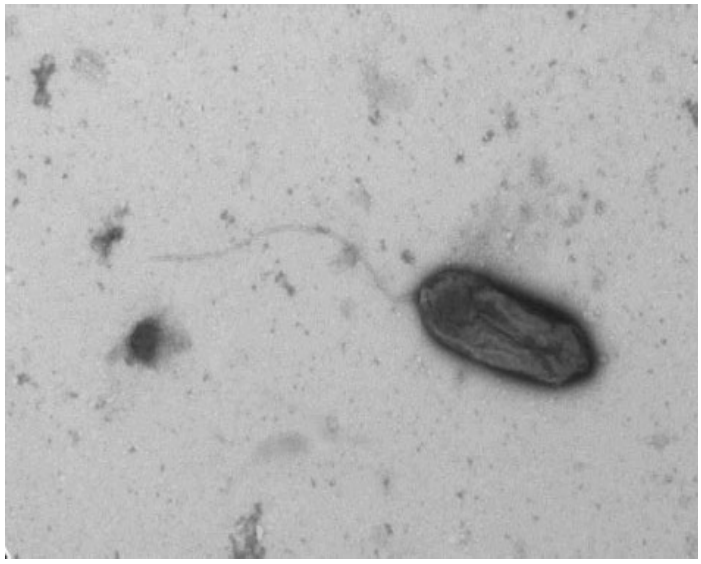
ayrılmaktadır. Nitrojeni metabolizmasında direkt olarak kullanabilen bir türdür (Koneman ve ark 1997, Van Driessche ve ark 2003). Optimal üreme sıcaklığı 25°C'dir (Konemon ve ark 1997). Ayrıca *A. nitrofigilis, A. skirrowii* ve *A. cryaerophilus* 'tan % 1.5 NaCl varlığında üreme yeteneği ile ayrılabilmektedir. Etken, petrolle kontamine yeraltı sularından, deniz sedimentlerinden ve petrol yataklarından izole edilmiştir. İnsan ve hayvanlarda hastalık oluşturmaz (Koneman ve ark 1997, Phillips 2001, Houf ve ark 2002a,b, Van Drissche ve ark 2004).

2.1.3.5. *A. cibarius*

Gram negatif, hafif kıvrımlı ya da düz çomak şekinde olan etken 1,5 µm uzunluğunda ve 0,5 µm genişliğindedir. Etken tek bir polar flagellaya sahiptir ve aktif hareketlidir. Kanlı agarda *A. cibarius* 28°C'de mikroaerofilik ortamda 72 saatlik inkübasyon sonucunda 2 mm büyüklüğünde beyazımsı koloniler oluşturur. Etken mikroaerofilik ortamda oda sıcaklığında (18–22 °C) ve 37 °C üreyebilir fakat 42 °C'de üreyemez. Aerobik ortamda 37°C'de üreyemez. Aynı sıcaklıkta anaerobik ortamda zayıf üreme gösterir. Etken oksidaz üretir. İndoksil asetatı hidroliz eder, bazı türleri katalaz aktivitesi gösterir (Houf ve ark 2005, Chinivasagam ve ark 2006).

Etken kanlı agarda hemoliz oluşturmaz. Mac Conkey agarda üreme değişkendir. Alkalin fosfataz, üreaz, DNase aktivitesi negatiftir. TSIA'da hidrojen sülfür üretmez (Houf ve ark 2005).

Nitrat redüksiyon aktivitesi negatiftir, % 2-4'lük tuz içeren ortamlarda üreyemez (Houf ve ark 2005, Chinivasagam ve ark 2006). Selenit ve trifeniltetrazolium kloridi indirgemez. Etken % 1'lik glisinde üreyemez (Houf ve ark 2005). Resim 2.5'te *A. cibarius*'un elektron mikroskobik görünümü belirtilmektedir (Houf ve ark 2005).



Resim 2.5. *A. cibarius*'un Elektron Mikroskobik Görünümü

Houf ve ark (2005) tarafından broilerlerin karkaslarından izole edilen *A. cibarius'*un patojenitesi bilinmemektedir. Ancak araştırmacılar, etkenin insan hastalıkları ile özellikle gastroenteritisle yakından ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Etken genellikle kanatlı karkaslarında bulunur bu nedenle insanlar için önemli bir besin kaynaklı zoonotik hastalık olma potansiyeli taşıdığı belirtilmiştir (Houf ve ark 2005, Andersen ve ark 2006, Ho ve ark 2006b,).

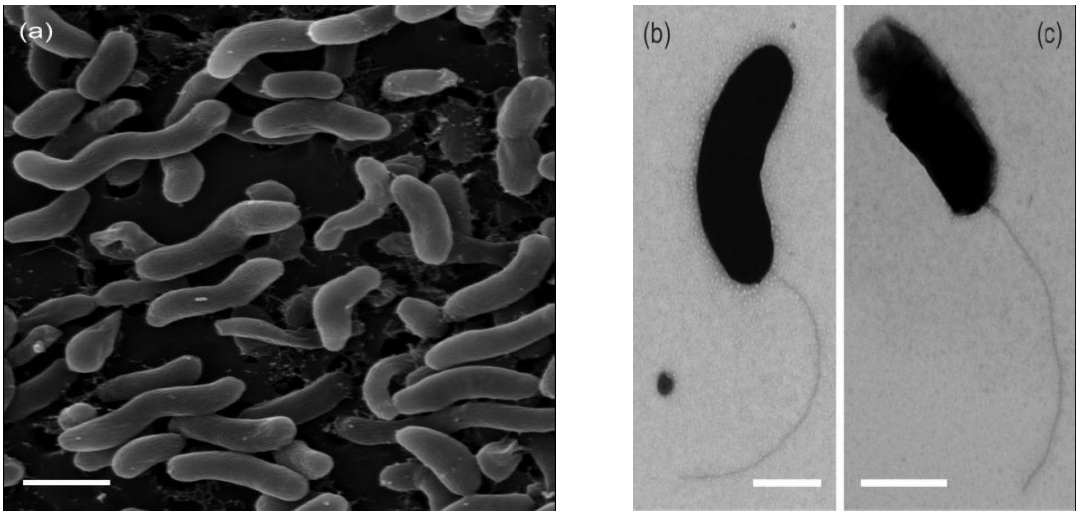
Ayrıca, Chinivasagam ve ark (2006) domuz ve domuzların yaşadıkları çevrede *A. cibarius*'u izole etmişlerdir. Araştırmacılar mPCR metodu kullanarak yaptıkları çalışmalarında izolatların 29 (% 35)'unu *A. butzleri,* 33 (% 49)'ünü *A. cryaerophilus* olarak identifiye ederlerken izolatların 13 (% 16)'ünün ise bant oluşturmadığını görmüşlerdir. Bant oluşturmayan 13 izolatın 16S rDNA sekanslama işleminden sonra *A. cibarius*'a % 99 oranında benzerlik gösterdiğini saptamışlardır. Ancak araştırmacılar *A. cibarius*'un domuzlar üzerindeki önemi ve patojenitesinin henüz bilinmediğini bildirmişlerdir.

Ho ve ark (2007) *Arcobacter*'ler ile ilgili patojenite çalışmaları sonucunda *A. cibarius*'un yüksek adezif yeteneğine sahip olduklarını belirtmişlerdir.

2.1.3.6. *A. halophilus*

Donachia ve ark (2005) tarafından tuzlu sulardan izole edilen *A. halophilus* başlangıçta, *Arcobacter* spp. olarak adlandırılmıştır. Daha sonra yapılan, biyokimyasal testler, yağ asidi profil analizi ve DNA-DNA hibridizasyon yöntemleri ile obligat halofilik özellikte olan bakteri *A. halophilus* olarak tanımlanmıştır (Snelling ve ark 2006, Ho ve ark 2006b). Etkenin insan ya da hayvanlarda hastalık yaptığına dair bir bilgi yoktur (Van Drissche ve Houf 2007).

A. halophilus, Gram negatif, hafif eğri çomak ya da helikal şekilde olup, 0,4-0,5X1,5-2,5μm boyutlarındadır. Etken % 3,5'lik tuz içeren % 5'lik kanlı agarda mikroerobik ortamda 18–22 °C'de 72 saatlik inkübasyondan sonra 1–2 mm çapında düz koloniler oluşturur. Etken tek bir polar flagellası ile hareket eder. *A. halophilus* % 2'den az tuz içeren ortamlarda üreyemez ya da çok zayıf ürer. Oksidaz pozitif, katalaz, alkalin fosfataz, DNase ve üreaz aktivitesi negatiftir. İndoksil asetatı hidrolize eder fakat hippuratı hidrolize etmez. Etken kanlı agarda hemoliz oluşturmaz, TSIA'dan da H_2S oluşturmaz % 3,5'luk tuzlu ortamda mikroaerofilik koşullarda oda sıcaklığında ve 37 °C'de üreyebilir ancak aynı ortamda 42°C'de üreyemez. Nalidiksik asite duyarlıdır. %1 lik glisinli ortamda üreyemez (Donachie ve ark 2005). Resim 2.6'da *A. holaphilus*'un elektron mikroskobik görünümü ve polar flegallası belirtilmektedir (Doachie ve ark 2005).

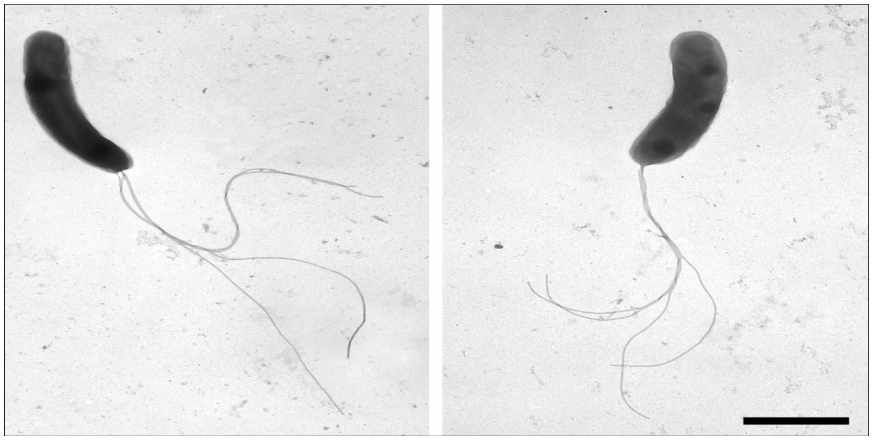


Resim2.6. a**.** *A. holaphilus*'un Elektron Mikroskobik Görünümü, b-c. *A. halophilus*'un Polar Flegellası

2.1.3.7. *Candidatus Arcobacter sulfidicus*

Wirsen ve ark (2002) tarafından deniz ürünlerinden izole edilen *Candidatus Arcobacter sulfidicus* hidrojen sülfidi okside ederek metobolik ürün olarak hidrofilik flamentöz sülfür oluşturur (Hügler ve ark 2005, Sievert ve ark 2006, Ho ve ark 2006b). Gram negatif olan etken dört adet polar flegellası ile hareket eder. Etken, katı yüzeylere yapışabilir ve *A. nitrofigilis* gibi nitrojeni fikse eder (Wirsen ve ark 2002). *Candidatus Arcobacter sulfidicus* CO_2'i fikzasyon aktivitesi pozitiftir. Etkenin bu özelliği diğer sülfüdi okside eden bakterilere göre daha fazladır (Wirsen ve ark 2002, Hügler ve ark 2005).

Resim 2.7'de Flamentöz sülfür üreten *Candidatus Arcobacter sulfidicus*'un elektron mikroskobunda dört polar flagellasının görünümü belirtilmektedir (Wirsen ve ark 2002).



Resim 2.7. Elektron Mikroskobunda *Candidatus Arcobacter sulfidicus*'un Dört Polar Flagellası

Candidatus Arcobacter sulfidicus yüksek konsantrasyondaki hidrojen sülfit'e tolerans gösterir. Etken, yüksek hidrojen sülfit konsantrasyonlarında ve düşük oksijen konsantrasyonlarında üreyebilir (Sievert ve ark 2006).

*Candidatus Arcobacter sulfidicus'*un insan ve hayvanlarda hastalık yaptığına dair bilgi yoktur (Houf ve Stephan 2007).

Tablo 2.1'de *Arcobacter* türlerinin biyakimyasal ve fiziksel özellkleri belirtilmektedir (Çelik 2000, Houf ve ark 2005, Doachie ve ark 2005).

Tablo 2.1. *Arcobacter* Türlerinin Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Karakteristik özellikler	***A. cryaerophilus***	***A. butzleri***	***A. skirrowii***	***A. nitrofigilus***	***A. halophilus***	***A. cibarius***
Katalaz aktivitesi	**+**	**+**	**+**	**+**	**-**	**+**
Nitrat redüksiyonu	**-**	**+**	**+**	**+**	**+**	**-**
DNase aktivitesi	**+**	**+**	**+**	**+**	**-**	**-**
Mac Conkey agarda üreme	**+**	**+**	**-**	**-**	-	**D**
37 ^{o}C'de üreme	**+**	**+**	**+**	**-**	**+**	**+**
42 ^{o}C'de üreme	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
Sisteinden H_2S üretimi	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
% 1 glisinde üreme	**-**	**+**	**-**	**+**	**-**	**-**
% 1,5 NaCl'de üreme	**-**	**+**	**-**	**+**	**+**	**-**
% 3,5 NaCl'de üreme	**-**	**+**	**-**	**+**	**+**	**-**
Nalidiksik aside duyarlılık	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**
Sefalotine duyarlılık	**R**	**R**	**S**	**S**	**S**	**R**

+: pozitif **- :** negatif **D:** değişken **S:** duyarlı **R:** dirençli

2.1.4. Patojenite Faktörleri

Arcobacter türlerinin sitotoksinlere (Mansfield ve ark 2000, D'sa ve Harrison 2005, Lehner ve ark 2005, Ho ve ark 2006b, Hansen ve ark 2007) sahip olduğu ve çeşitli hücrelere yapıştığı fakat invaziv olmadıkları bildirilmiştir (Mansfield ve ark 2000). Etken gastrik ya da intestinal epitel ve endotel hücreler ile mukoz membranların yüzeyine yapışır (Houf ve Stephan 2007).

Ho ve ark (2007), insan ve domuzlarda intestinal epitel hücrelerine *Arcobacter'*lerin adhezyon ve invazyon yeteneklerini belirlemek amacı ile yaptıkları çalışmada *Arcobacter*'lerin epitelyum hücrelerine yapıştığını ve interleukin-8 (IL-8) üretimine neden olduklarını belirtmişlerdir. Araştırmacılar adhezyon ile invazyon arasında bir ilişki olmadığını bildirmişlerdir.

*Arcobacter'*ler 20 kiloDalton (kDa) büyüklüğünde, proteolitik enzimlere ve 80°C'ye duyarlı lektin benzeri bir hemaglutine sahiptirler (Aydın ve Atabay 2001, Ho ve ark 2006b).

Carbone ve ark (2003) tarafından İtalya'da yapılan bir çalışmada *A. butzleri'*nin toksijenik ve adhezif türleri sulu ortamdan izole edilmiştir.

2.1.5. *Arcobacter* Türlerinin Prevalansı ve Prevalansını Etkileyen Faktörler

Arcobacter türlerinin hayvanlarda ve hayvansal ürünlerdeki prevalansının belirlenmesini etkileyen bir çok faktör bulunmaktadır. Bunların başlıcaları, örnek büyüklüğü, izolasyon ve identifikasyon için kullanılan yöntemler, yaş ve hayvan türü şeklinde sıralanabilir (Van Driessche ve ark 2003, 2004, Ho ve ark 2006b).

Zenginleştirme metodu kullanılarak yapılan izolasyona göre direk izolasyonda prevalans belirleme oranı daha düşüktür (Van Driessche ve ark 2003, 2004,2005, Ho ve ark 2006b). Türler arasında da, kullanılan izolasyon yöntemine hassasiyet farkı bulunmaktadır. Örneğin, *A. skirrowi* ve *A. cryaerophilus'*un izolasyonu, antimikrobiyal maddelere duyarlılıklarından dolayı *A. butzleri*'ye göre daha güçtür (Atabay ve ark 1998, Houf ve ark 2001, Kabeya ve ark 2004, Ho ve ark 2006b).

Rivas ve ark (2004) *Arcobacter*'lerin kanatlı etlerinde prevalansının en yüksek olduğunu ve bunu domuz ve sığır etlerinin takip ettiğini bildirmişleridir. Van Driessche ve Houf (2007) yaptıkları çalışmada domuzlarda *Arcobacter* türlerinin görülme sıklığının sığırlara göre daha fazla olduğunu saptamışlardır.

Hayvanların yaşı da prevalansı etkiler (Ho ve ark 2006b). Wesley ve Baetz (1999), yaptıkları çalışmada, 8–16 haftalık kanatlılarda *Arcobacter* spp. prevalansının düşük, 56 haftalık kanatlılar da ise prevalansının yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Golla ve ark (2002) hayvanların yaşlarının artması ile birlikte hastalığın prevalansının da arttığını bildirmişlerdir. Yaşlı domuzlarda *Arcobacter* türlerinin insidensi kontamine çevreye daha uzun süre maruz kalmasından dolayı daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Ho ve ark 2006a, Chinivasagam ve ark 2006).

Etkenin prevlansı hayvanların yetiştirildikleri çiftliklerin hijyenik durumu, su kaynakları ve beslenme şekline göre de değiştiği ifade edilmiştir (Wesley ve ark 1997, 1999b, 2000, Golla ve ark 2002).

Hayvanlarda *Arcobacter* türlerinin prevalansı mevsim değişikliklerinden de etkilenir. Etkenin prevalansının bahar ve yaz mevsimlerinde kış mevsimine göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Van Driessche ve ark 2004, Ho ve ark 2006b). Ancak Kabeya ve ark (2003b) tarafından Japonya'da yapılan bir çalışmada kış ve yaz mevsiminde görülen farklılığın istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir.

2.1.6. *Arcobacter*'lerin Bulaşma Kaynakları

Arcobacter genusuna bağlı türler daha çok kanatlı, sığır ve domuz eti gibi hayvansal orijinli besinlerden izole edilmektedir (Wesley ve ark 1995, Long 2003, Moreno ve ark 2003, Phillips 2003, Kabeya ve ark 2003a, On ve ark 2004, D'sa ve Harrison 2005, Cervenka ve ark 2006, Jelinek ve ark 2006). *A. cryaephilus*, *A. skirrowi* ve *A. butzleri* çiğ ya da az pişmiş hayvansal orjinli besinlerin tüketilmesi sonucu insanlara bulaşmaktadır (Houf ve ark 2002a,b, Öngör ve ark 2004, Van Drissche ve ark 2004, 2005, Lehner ve ark 2005, Snelling ve ark 2006).

Etken en fazla tavuk etlerinde bulunmaktadır. Bunu sırası ile domuz eti ve sığır eti takip eder (Ho ve ark 2006b, Mauleon ve ark 2006, Hansen ve ark 2007). *Arcobacter* türleri arasında kırmızı et örneklerinden en çok *A. butzleri,* ikinci sırada *A. cryaerophilus* izole edilmiştir (Houf ve ark 2003, Kabeya ve ark 2003a,b, Morita ve ark 2004, Rivas ve ark 2004, Ho ve ark 2006b). *A. skirrowi* ise et örneklerinden düşük oranlarda izole edilmiştir. Bunun sebebi de *A. skirrowi*'nin etlerdeki prevalansının düşük olması ya da etkenin diğer iki türe göre etlerden izole edilmesinin daha zor olmasıdır (Atabay ve ark 2003, Kabeya ve ark 2004, Gude ve ark 2005, Ho ve ark 2006b).

Tablo 2.2'de etkenin bulaşma kaynakları ve buna bağlı olarak insan ve hayvanlarda oluşturduğu hastalıklar belirtilmektedir (Atabay ve Corry 1997,1998, Atabay ve ark 1998, de Olievera ve ark, 1997, Engeberg ve ark 2000).

Tablo 2.2. *Arcobacter* Türlerinin Bilinen Kaynakları ve İlişkili Olduğu Hastalıklar

Türler	Bilinen kaynaklar	İlişkili olduğu hastalıklar	
		Hayvan	İnsan
A. butzleri	Domuz, sığır, maymun, insan, kanatlı hayvanlar, domuz kıyması, içme suyu, nehir suyu, lağım suyu, at, kaplumbağa	Domuz, sığır ve primatlarda gastroenteritisve domuzlarda abortus	Gastroenteritis ve septisemi
A.cryaerophilus	Domuz, boğa, at, koyun, lağım suyu, kanatlı hayvanlar	Domuz, sığır, koyun ve atlarda abortus, sığırlarda mastitis	Gastroenteritis ve septisemi
A. skirrowii	Koyun, boğa, domuz, kanatlı hayvanlar	Koyun ve sığırlarda gastro enteritis; domuz ve sığırlarda abortus	-
A. nitrofigilis	Bitki kökleri	-	-

Arcobacter'ler *Campylobacter*'ler gibi kırmızı etten ziyade kanatlı etlerinden sık izole edilmektedir (De Oliveira ve ark 1999, Wesley ve Baetz 1999, Gonzalez ve ark 2000, Houf ve ark 2000, Atabay ve ark 2002, 2003, Morita ve ark 2004,

Rivas ve ark 2004). Bu nedenle, *Arcobacter*'ler bakımından kanatlı hayvanlar önemli bir rezervuar olarak kabul edilebilir (Wesley ve Baetz 1999, Atabay ve ark 2002, 2003).

Atabay ve ark (2003) kanatlı karkaslarında *Arcobacter* türlerinin prevalansını belirlemek amacıyla Kars ilindeki çeşitli marketlerden alınan 44'ü taze 31'i dondurulmuş olmak üzere toplam 75 tavuk karkasını incelenmiştir. Araştırmacılar 44 taze karkas örneğinin 42'sinde (% 95), 31 dondurulmuş karkas örneğinin 7'sinde (% 23) *A. butzleri* suşu izole etmişlerdir.

De Oliveira ve ark (2001) 80 tavuk karkası örneğinin 37'sinden (% 46,25) *Arcobacter* spp. izole etmişlerdir. Aynı araştırmacılar tarafından yapılan PCR testinde izolatlardan 41'i A. *butzleri* olarak belirlenmiştir.

Hollanda'da yapılan bir çalışmada 220 kanatlı et örneğinin % 24,1'i *Arcobacter* pozitif olarak bulunmuştur (Phillips 2001).

Fransa'da 201 kanatlı karkasının kullanılarak yapıldığı bir çalışmada kanatlı etlerinin % 81'inde *A. butzleri* belirlenmiştir (Wesley ve Baetz 1999).

Houf ve ark (2001) tarafından kanatlı ürünlerinde *Arcobacter* türlerinin izolasyon ve identifikasyonu için yapılan çalışmada araştırmacılar 71 adet broyler boyun derisinin 61 (% 90,1)'inden 34 adet tavuk boyun derisinin 34 (% 100)'ünden, 52 broyler göğüs etinin 34 (% 65,4)'ünde *Arcobacter* türlerini izole etmişlerdir.

Etken kanatlı karkasından izole edildiği halde canlı tavukların barsaklarından nadiren ya da hiç tespit edilememektedir (Corry ve Atabay 2001, Phillips 2001b, Gude ve ark 2005).

Andersen ve ark (2006) tarafından hindilerde yapılan bir çalışmada 298 adet kloakal örneğin 6'sından (% 2), 145 sekum örneğinin 3'ünden (% 2,1), 150 hindi karkas örneğinin 139'undan (% 93) *Arcobacter* türleri izole edilmiştir.

Almanya'da yapılan bir çalışmada (Wesley ve Baetz 1999) 170 adet yeni kesilmiş broilerlerden alınan sekum örneklerinin hiçbirinden etken izole edilemezken aynı hayvanların % 57'sinin derisinden *Arcobacter* türleri izole edilmiştir.

Kanatlılarda *Arcobacter* kontaminasyonunun en fazla boyun derisinde olduğu belirtilmiştir (Houf ve ark 2002a, Gude ve ark 2005).

Wesley ve Baetz (1999) tarafından *A. butzleri*'nin kanatlı karkas ve kloakalarında belirlemek amacı ile yapılan çalışmada 407 adet kanatlı kloaka örneği incelenmiştir. Çalışmada kanatlıların % 15'inden *Arcobacter* türleri izole edilmiştir. Kloaka örneklerinin % 1'inde *A. butzleri* izole edilmiştir. Araştırmada hindilerin % 65'nin kloaka sıvaplarından *A. butzleri* tespit edilmiştir.

Türkiye'de Aydın ve ark (2007) tarafından yapılan çalışmada 100 adet broiler kloakal sıvabından alınan sıvab örneklerinin hiç birisinden *Arcobacter* türleri izole edilememiştir.

Yukarıda belirtilen çalışmalardaki araştırmacıların (Wesley ve Baetz 1999, Corry ve Atabay 2001, Houf ve ark 2002a, Gude ve ark 2005, Andersen ve ark 2006 Ho ve ark 2006b, Aydın ve ark 2007) ortak düşüncesi etkenin kanatlı hayvanların barsağından geçtiği ancak barsaklara kolonize olmadığıdır. Kanatlıların intestinal kanalının memelilere göre daha yüksek sıcaklığa sahip (41°C) olmaları dolayısı ile nontermofilik *Arcobacter'*lerin kolonize olabilmeleri için uygun bir ortam olarak kabul edilmemektedir (Ridsale ve ark 1999, Ho ve ark 2006b).

*Arcobacter'*lerin özellikle kanatlı karkaslarından yüksek oranda izole edilmeleri, kesim sırası ve sonrası kontaminasyona bağlanmaktadır (Phillips ve Duggan 2001, Phillips 2002, De Oliveira ve ark 2001, Long ve Phillips 2003, Ho ve ark 2006b). Yine sığır ve domuz etlerinin de kesim esnasında kontamine olduğu düşünülmektedir (Van Driessche ve ark 2004, 2005). Kesim salonunun hijyenik olmayışı ve kesimhanedeki kontamine ekipmanlar bulaşmada en önemli rolü oynar (Wesley 1999, Gude ve ark 2005, Lehner ve ark 2005, Andersen ve ark 2006, Brightwell ve ark 2007).

A. *butzleri* süt inekleri, domuz ve insanlardan izole edilmiştir (Phillips 2001a). Ancak A. *butzleri*'nin besi sığırlarında var olduğuna dair veri mevcut değildir. Ayrıca infekte kanatlıların yumurtalarında etkene rastlanılmamıştır (Phillips 2001a, Golla ve ark 2002, De Oliveira 2001).

Sığır, koyun, domuz ve kanatlılar hastalığın taşınmasında önemli portörleridir. Etken domuzların aborte fetüslerinde, dışkılarında, ülserli domuzların midelerinde, mastitisli ineklerin sütlerinde bulunabilir. (Suarez ve ark 1997, Wesley 1997, 1999, de Oliveira ve ark 1999, Vandenberg ve ark 2004,Van Driessche ve ark 2003, 2004, 2005, Lehner ve ark 2005).

Etken, sağlıklı hayvanların sindirim sisteminde bulunabilir. Dolayısıyla etken sağlıklı hayvanların dışkısında bulunabilir ve bulaşmada portör vazifesi gösterebilirler (Wesley 1997, Houf ve ark 2002b, Van Driessche ve ark 2003, 2004, 2005, Kabeya ve ark 2003a,b, Öngör ve ark 2004, Van Drissche ve ark 2005).

Golla ve ark (2000) tarafından sığırlarda *A. butzleri'*nin insidansını belirlemek amacı ile yapılan çalışmada, 200 sığır dışkısının 18 'inden *A. butzleri* izole edilmiştir.

Pianta ve ark (2007) 188 süt örneğinin altısında *Arcobacter* türlerini izole etmişlerdir. PCR metodu ile izolatlardan beşinde *A. cryaerophilus* ve birinin ise *A. butzleri* olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar 188 numuneden 32'sinin mastitisli süt olduğunu tespit etmişlerdir. Ancak araştırmacılar *Arcobacter* türlerini izole ettikleri sütlerin alındıkları hayvanlarda mastitis olmadığını belirtmişlerdir. Pianta ve ark (2007) bu çalışmasının, etkenin sağlıklı ineklerin sütlerinde tespit edilmesi yönünden ilk çalışma olduğu belirtilmiştir

*Arcobacter'*ler domuzlardan sığırlara oranla daha fazla izole edilmiştir (Ho ve ark 2006b). Van Driessche ve ark (2003) tarafından hayvan dışkılarından *Arcobacter* türlerinin izolasyonu amacıyla yapılan çalışmada, domuz dışkı numunelerinin % 43,9'undan, sığır dışkı numunelerinin % 39,2'sinden, koyun dışkı numunelerinin % 16,1'inden ve at dışkı numunelerinin % 15,4'ünden izolasyon gerçekleştirilmiştir. Kabeya ve ark (2003), 332 sığır dışkı örneği, 250 domuz dışkı örneği ve 234 adet kanatlı kloakal sıvab örneğini *Arcobacter* türlerinin varlığı yönünden incelemişlerdir. Araştırma sonucunda, sığır ve domuz dışkı örneklerinin % 10'undan, tavuk kloakal sıvabının % 14,5'inden etkeni izole etmişlerdir.

Wesley ve ark (1995,1996) sağlıklı domuz ve domuz ürünlerinin % 40'ında *Arcobacter*'lerin bulunduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar, *A. butzleri, A.*

skirrowi ve *A cryaerophilus'*un belirlenmesi amacı ile deneysel olarak infekte ettikleri yeni doğan domuzlardan yaptıkları nekropside dalak, karaciğer, böbrek gibi ekstraintestinal bölgelerden sadece *A. butzleri* izole edilmiştir.

Brezilya'da *A. cryaerophilus* reprodüktif problemli domuzlar ve aborte domuz fetuslarından izole edilmiştir (Wesley ve ark 1995, De Oliveira ve ark 1997, Phillips 2001a,b).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde aborte domuz fetuslarından *A. butzleri* ve *A. cryaerophilus* türleri izole edilmiştir (De Oliveira ve ark 1997, Phillps 2001b, Ho ve ark 2006b).

Arcobacter'lerin domuzlarda önemli ekonomik kayıplara sebep olan gastrik ülsere neden olduğu bildirilmiştir (Phillips 2001a, b). Ho ve ark (2006a), domuzların yavrularına *Arcobacter* türlerini horizantal ya da vertikal yol ile taşıdıklarını belirtmişlerdir. Araştırmacılar etkeni taşıyan dişi domuzların yavrularında doğumdan sonra hastalık olmadığını tespit etmişlerdir. Bunun nedeninin ise doğumdan sonra yavruların annelerinden aldıkları kolostrumundaki antikorların yavruyu etkene karşı koruduğu sonucuna varmışlardır.

İnsanlardan en çok *A. butzleri* daha az sıklıkla *A. cryaerophilus* izole edilmektedir. *Arcobacter*'ler normal de insanların barsak florasında bulunmazlar. Muhtemelen insanlar arasında bulaşmanın fekal-oral yol (Wesley 1997, Lehner ve ark 2005) ya da kontak yolu ile olduğu ifade edilmektedir (Houf ve Stephan 2007).

Wesley ve ark (2000), süt sığırlarında yaptıkları çalışmada, sığırların % 14,3'ünün fekal örneğinden *Arcobacter* türlerini izole etmişlerdir. Araştırmacılar mPCR tekniği ile 33 izolatın 17'sini *Arcobacter butzleri* olarak identifiye etmişlerdir.

Arcobacter'lerin insan ve hayvanlara bulaşmasında su da önemli bir kontaminasyon kaynağıdır (Wesley ve ark 1995, Atabay ve ark 1998, Harmon ve Wesley 1997, Phillips 2001b, Phillips ve Duggan 2002, Moreno ve ark 2003).

Tayland'da kanalizasyon suyundan (Rashid ve ark 2000, Phillips 2001b), Almanya'da içme sularından *A. butzleri* izole edilmiştir (Phillips 2001b, Fera ve ark 2003, Gude ve ark 2005).

Etken, içme sularından, yeraltı sularından, bataklıklardan izole edilmiştir (Rice ve ark 1999, Houf ve ark 2000, Corry ve Atabay 2001, Atabay ve ark 2002, Van Driessche ve ark 2003,2004, Wesley ve Baetz 2003, Morita ve ark 2004, Moreno ve ark 2004, Snelling ve ark 2006).

Nehir sularından elde edilen izolatların memeli hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin olduğu belirtilmiştir (Long ve Phillips 2003a, Hansen ve ark 2007). İnfekte hayvanların dışkıları ile kirlenmiş, iyi dezenfekte edilmemiş suyun tüketimine bağlı olarak etkenin daha geniş kitleleri etkileyerek salgınlar oluşturma kabiliyetinin bulunduğu belirtilmektedir (Wesley 1997, Çelik 2000, Harmon ve, Phiilps 2001 b).

Romeo ve ark (2002) Restrictin Fragment Length Polymorphsm-Polimerase Chain Reaction (RFLP-PCR) metodu kullanarak yaptıkları çalışmada, istiridyelerin bakteriyel florasında bol miktarda *Arcobacter* ve *Arcobacter* ile ilgili türlerin bulunduğunu ve etkenin denizdeki agarda gelişemediğini bildirmişlerdir.

Arcobacter'ler, özellikle *A. butzleri,* klora duyarlıdır (Rice ve ark 1999, Phillips 2001a,b, Moreno ve ark 2004, Gude ve ark 2005, Andersen ve ark 2006, Ho ve ark 2006b). Ancak *A. skirrowi* klora direnç gösterebilir (Phillips 2001b). Şehir şebeke sularının klorlanması ile etken inaktive olabilir. Ancak uygunsuz klorlama prosedürü ya da klorlama işleminden sonra tekrar kontaminasyon gerçekleşme olasılığı etkenin halk sağlığı yönünden önemini ortaya koymaktadır (Phillips 2001a, Moreno ve ark 2004).

Ayrıca *Arcobacter* türleri, paslanmaz çelik, bakır ya da plastik gibi çeşitli su dağıtım borularının yüzeyine kolonize olabilir (On ve ark 2003a, Lehner ve ark 2005). Su borularının yüzeyine kolonizasyondan 72 saat sonra boruların iç kısımlarında ekstraselüler fibriller oluşturabilir (Lehner va ark 2005). *Arcobacter* ile kontamine içme suları gastroenteritise neden olmaktadır (Anderson ve ark 1993, Morita ve ark 2004)

2.1.7. Semptomlar

Arcobacter türlerinin epidemiyolojisi tam olarak anlaşılamamıştır. Etken enteritisli insan ile enteritis ve abort şekillenen evcil hayvan vakalarından izole edilmektedir (Wesley 1997). Evcil hayvanlar *Arcobacter*'lerin taşınması için önemli rezervuarlardır (Snelling ve ark 2006).

A. butzleri ve insan hastalıkları arasındaki epidemiyolojik ilişki, İtalya'daki hemşirelik okulu ve bir ilkokulda meydana gelen abdominal kramp ve akut diyare ile seyreden hastalıkların araştırılması ile başlatılmıştır. Bu araştırmada elde edilen sonuçlar, bu ilişkiye ilk kanıt olarak gösterilmiştir (Wesley 1999, Atabay ve ark 2002, Scullion ve ark 2004, Darka 2004, Hansen ve ark 2007).

Doğu Almanya'da aborte evcil hayvan fetüslarından, mastitisli sığırlardan, domuz ürünlerinden ve domuz mide örneklerinden (Öngör ve ark 2004), İtalya'da bataklık bitkilerinden, Tayland'da nehir sularından, A.B.D'de ise kampta gastroenteritis vakalı bir kız çocuğundan *Arcobacter* spp. izole edilmiştir (Rice ve ark 1999, Hume ve ark 2001). Avusturalya'da abdominal ağrı ve ishal ile karakterize belirtiler gösteren yetişkinlerden ise *A. cryaerophilus* izole edilmiştir (Ho ve ark 2006b).

Arcobacter türleri, fenotipik olarak benzerlik gösterdiği *Campylobacter* türleri gibi insanlarda çoğunlukla gastroenteritise neden olmaktadır (Phillips 2001b, Rivas ve ark 2004).

A. butzleri ve daha az sıklıkla *A. cryaerophilus* ve *A. skirrowi* ile kontaminasyon sonucunda insanlarda enteritis ve bazende bakteriyemi ve kronik diyare şekillenir (Engeberg ve ark 2000, Hume ve ark 2001, Atabay ve ark 2002, 2003,2006, Vandenberg ve ark 2004, Snelling ve ark 2006).

A. cryaerophilus, trafik kazasında ölen bir kişinin, pnemonili bir kişi ve üremik sendromlu bir hastanın kanlarından izole edilmiştir (Hsueh ve ark 1997, Carbone ve ark 2003, Fera ve ark 2004).

A. cryaerophilus 1B tarafından meydana getirilen üremik hastalık vakalarında etkenin invazif karakterli infeksiyon tablosuna sebep olabileceği bildirilmiştir (Phillips 2001a,b, Carbone ve ark 2003, Lehner ve ark 2005).

Etken, çeşitli çiftlik hayvanlarında enteritis ve reprodüktif problemlerle karakterize hastalık tablosu meydana getirir (On ve ark 2002, Van Driessche ve ark 2003, D'sa ve Harrison 2005).

İnsanlarda *Arcobacter* infeksiyonlarında en yaygın belirtiler akut sulu diyare ile ilişkili olarak, karın ağrısı, mide bulantısı ve kusmadır (Wesley ve ark 1996, Atabay ve ark 2001, Phillips 2001b, Long ve Phillips 2003a, Stoeva ve ark 2006). Ayrıca endokarditis, peritonitis gibi belirtiler de şekillenir (Anderson ve ark 1993, Nachamkin 2000, Hume ve ark 2001, Phillips 2001a,b, On ve ark 2002). Enteritis, şiddetli ishal, karın ağrısı, septisemi ve bakteriyemi semptomları gösteren insanlardan en çok *A. butzleri* izole edilmiştir (Vandamme ve ark 1992, Wesley ve ark 2000, Van Drissche ve ark 2004, Houf ve ark 2001b, Rivas ve ark 2004).

Ayrıca, *A. butzleri* şiddetli diyareli ve kronik hastalıklardan ve neonatal hastalıkları içeren bakteriyemi, enteritis, diyare, abdominal kramplar, ateş, kusma, karaciğer sirozu ve akut gangrenöz apandisit vakalarından da izole edilmiştir (Anderson ve ark 1993, Harmon ve Wesley 1997, Hsueh ve ark 1997, Wesley ve ark 2000, Phillips 2001a,b, Lau ve ark 2002, Carbone ve ark 2003, Fera ve ark 2004, Vandenberg ve ark 2004, Wybo ve ark 2004, Otth ve ark 2004, Snelling ve ark 2006). International Commission on Microbiological Specifications for Food (ICMSF) *A. butzleri'*nin insan sağlığı için önemli bir tehlike olduğunu öngörmüştür (On ve ark 2003a,b,2004, Atabay ve ark 2006, Stoeva ve ark 2006). Fransa'da evcil hayvanlardan izole edilen *A. butzleri*'nin biyotip ve serotiplerinin benzer şekilde diyareli insanlardan da izole edilmesi hayvansal besinlerin hastalık için önemli bir rezervuar olduğunu göstermiştir (Corry ve Atabay 2001, Phillips 2002, Long ve Phillips 2003, Rivas ve ark 2004).

2.1.8. *Arcobacter* Türlerinin İzolasyonu

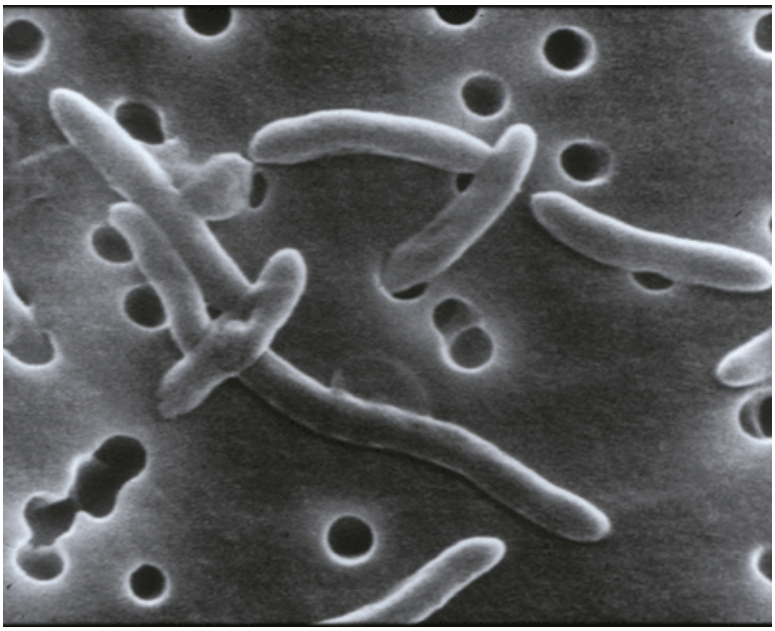
İnsanlardaki hastalık sebebi olan *Arcobacter* türlerinin önemi konusunda henüz yaygın bir fikir birliği oluşmamıştır. Bunun nedeni *Campylobacter* spp.

izolasyonu için kullanılan standart prosedürün klinik materyal, dışkı, hayvansal orjinli gıda gibi ortamlardan *Arcobacter*'lerin izolasyonu için yeterli olmamasına bağlanabilir (Atabay ve Corry 1997,1998, Atabay ve ark 2001, Phillips 2003).

Arcobacter'ler ilk defa 1977 yılında domuz ve sığır fetuslarından spiroketler için kullanılan yarıkatı agarlarda geliştirilmek sureti ile izole edilmiştir. Bu amaçla *Leptospira* için kullanılan EMJH P-80 (Ellinghausen McCullough Johnson Harris Polysorbate – 80) yarı katı besiyeri 5 fluorouracil (100 µg /ml) ilave edilerek kullanılmıştır (Harmon ve Wesley 1997, Atabay ve Corry 1998, Wesley ve Baetz 1999, Wesley ve ark 2000, Houf ve ark 2001a, Van Driessche ve ark 2003, Atabay ve ark 2003). Mikroaerofilik ortamda 25 °C'de 5–7 gün inkubasyondan sonra *Campylobacter* 'lere benzeyen hareketli bakteriler karanlık saha mikroskobunda gözlenmiştir. Hareket kontrolünden sonra kültür membran filtre tekniği ile 0,45 um çapındaki filtreden kanlı agar yüzeyine filtre edilmiş ve kanlı agar aerobik ortamda 25–30 °C 2–3 gün inkübe edilmiştir. Bu süre sonucunda oluşan *Campylobacter* benzeri koloniler *Arcobacter* olarak değerlendirilmiştir (Wesley ve Baetz 1999).

Arcobacter izolasyonu için kullanılan diğer bir metot ise cefoperazone, amfoterisin ve teikoplanin katkılı selektif CAT besiyerinin kullanılmasıdır. *Arcobacter* türlerinin spesifik izolasyonu için termofilik *Campylobacter* türleri için uyarlanan selektif ya da non selektif besiyeri üzerine filtrasyon işlemini içeren geleneksel yöntem kullanılmaktadır. İzolasyon besiyerlerindeki antimikrobiyal ajanların konsantrasyonunun, geleneksel selektif saplementlerindekinden daha fazla olduğu belirtilmektedir. Bununla birlikte *Arcobacter* türlerinin spesifik izolasyonu için mevcut selektif bir saplement yoktur (Houf ve ark 2001, Phillips 2001b).

Membran filtrasyon tekniği daha önceden tavuklardan *Arcobacter* türlerinin izolasyonu için başarı ile kullanılmış olup, yöntem *Arcobacter* türlerinin hareket yeteneklerini kullanarak membran filtrelerden geçmesi prensbine dayanmaktadır. Filtrasyonda kompetatif floranın büyük bir kısmı filtreyi geçemeyip filtre üzerinde kalmaktadır (Nachamkin 2000, Atabay ve ark 2001). Resim 2.8.'de *A. butzleri'*nin elekron mikroskobunda porlardan filtre olurken resimlenmiş görünümü belirtilmektedir (James Dickson 2005).



Resim 2.8. *A. butzleri'* nin Elekron Mikroskobunda Porlardan Filtre Olurken Resimlenmiş Görünümü

*Arcobacter'*lerin kültür metodu ile belirlenmesi 4-5 gün süren zenginleştirme işlemi uygulanılarak gerçekleştirilmektedir (Snelling ve ark 2006).

*Arcobacter'*ler, *Campylobacter* türlerinin izolasyonu için kullanılan inhibitörler karşı duyarlıdır. Bu nedenle bu ortamlar *Arcobacter'*ler için uygun değildir. Ancak *Campylobacter'*lerin izolasyonunda kullanılan ortam ve metotların modifiye edilmesi ile geliştirilmiş yeni metot ve ortamlar kullanılmaktadır (Aydın ve Atabay 2001).

Arcobacter türlerinin izolasyonu için *Arcobacter* Selektif Broth (ASB), Arcobacter Enrichment Broth (AEB), Cefoperazone Amfoterisin Teikoplanin (CAT) agar, modified Charcoal Cefoperazone Desoxycholate Agar (mCCDA), Cefsulodin Irgasan Novonibosin (CIN) agar, Johnson ve Murano (JM) agar gibi besiyerleri kullanılmaktadır (Corry ve Atabay 1997, Atabay ve Corry 1997, Ridsdale ve ark 1999, Engberg ve ark 2000, Corry ve Atabay 2001, Phillips 2001b, Atabay ve ark. 2003). Yine Arcobacter Selective Semisolid Medium (ASM) etkenin izolasyonu için kullanılmaktadır (Atabay ve Corry 1998, Phillips 2001b, Golla ve ark 2002).

mCCDA ve CAT agar tavuk karkaslarından *Arcobacter* ve *Helicobacter* türlerinin izolasyonu için önerilmektedir. Ancak *Arcobacter* türleri CAT agarda mCCDA'ya göre daha iyi bir şekilde üremektedirler (Corry ve Atabay 1997, Hilton ve ark 2001, Lehner veark 2005). Çiğ etlerden *Arcobacter'*lerin izolasyonu amacı ile ASB'ta ön zenginleştirme işlemini takiben cefoperazone, trimetopirim ve siklohekzamid içeren yarı katı Arcobacter selektif mediumun kullanılması önerilir (Ridsale ve ark 1999, Phillips 2001b).

Domuzlarda ve insanlardaki enteritis olgularından *Arcobacter* türlerinin izolasyonunda *Yersina* türleri için geliştirilen CIN agar kullanılır (Phillips 2001b).

CAT ya da mCCD saplementi içeren Arcobacter Zenginleştirme Broth, *A.butzleri*, *A. cryaerophilus* ve *A. skirrowi'*nin gelişimini desteklerken *A. nitrofigilus*'un üremesi zayıf olur (Phillips 2001b).

Kanatlılardan *Arcobacter* türlerinin izolasyonu için kullanılan besiyerlerine ilave edilen saplementler, kanatlı derisi ve göğüs etindeki mevcut kontamine florayı tamamen inhibe ederek etkenin izolasyonunu kolaylaştırır (Houf ve ark 2001). Gıda maddelerinden *Arcobacter*'lerin izolasyonu için kullanılan kantitatif metotlar kanatlılardaki *Arcobacter* türlerinin sayısını belirlemek için kullanılmaktadır. Arcobacter Broth (AB) ve CAT saplementleri kanatlı etlerinden *Arcobacter*'lerin izolasyonunu artırmak için geliştirilmiştir (Atabay ve Corry 1998, Houf ve ark. 2001).

Günümüzde Arcobacter Zenginleştirme Broth (AZB) ve Arcobacter Selektif Agar (ASA), kümes hayvanlarının deri ve etlerinden bütün *Arcobacter* türlerinin kalitatif ve kantitatif değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (Van Driessche ve ark 2003).

Çiftlik hayvanlarının dışkılarında *Arcobacter* türlerinin varlığını belirlemek için çeşitli izolasyon metotları ve moleküler teknikler uygulanmaktadır. Bu teknikler gıda maddelerinden de etkenin izolasyonu ve identifikasyonu için geliştirilmiştir (Harmon ve Wesley 1997, Van Driessche ve ark 2003).

Belçika'da sağlıklı domuzlardan ve sağlıklı sığırların dışkılarından *Arcobacter* türlerinin izolasyonu amacı ile % 5 oranında lize edilmiş defibrine at kanı içeren Arcobacter Selektif İzolasyon Broth (ASIB) ve Arcobacter Selektif İzolasyon Agar (ASIA) başarı ile kullanılmıştır (Van Driessche ve ark 2004,2005).

Scullion ve ark (2004) *Arcobacter* türlerinin izolasyonunda kullanılan CAT Broth, *Arcobacter* Broth ve JM Broth besiyerlerini kıyaslamışlardır. Araştırmacılar, *A. butzleri*'nin üç besiyerinde de ürediğini, *A. cryaerophilus*'un *A. butzleri'*ye göre daha zayıf ürediğini, *A. skirrowi* ise sadece JM Broth'ta ürediğini belirtmişlerdir.

İnsanlar için patojen olan *Arcobacter* türlerinin belirlenmesi için kullanılan teknikler insan dışkısı gibi klinik örneklerden *Campylobacter* türlerinin izolasyon tekniğine göre dizayn edilmiştir. Bir çok araştırma (Atabay ve Corry 1998, Corry ve Atabay 2001, Atabay ve ark 2002, Houf ve ark 2001a,b, Long ve Phillips 2003) *Campylobacter* ve *Arcobacter*'lerin aynı medium üzerinde farklı düzeylerde üremelerinin, etkenlerin selektif besiyerlerindeki antimikrobiyal ajanlara olan duyarlılıkları ile ilişkili olduğunu göstermiştir .

Wesley ve Harmon (1997) tarafından yapılan bir çalışmada 1236 süt sığırının dışkı örneği *Arcobacter* türleri yönünden incelenmiştir. Araştırmacılar EMJH-80 besiyeri kullanarak yaptıkları çalışmada inceledikleri 1236 dışkı örneğinin % 10,2'sinden etkeni izole etmişlerdir.

De Oliveira ve ark (2001), inceledikleri 80 kanatlı karkas örneğinin 37'sinden (%46.25) *Arcobacter* izole etmişlerdir. Çalışmada bütün izolatların MacConkey agarda değişik büyüklükte koloniler oluşturduğu, biyokimyasal testlerden oksidazın pozitif, katalaz testinin değişken sonuç verdiği belirtilmiştir. Araştırmacılar izolatları karanlık saha mikroskobunda incelemiş ve helikal şekilli, hareketli etkenler gözlemlemişlerdir.

İnsanlardaki hastalık sebebi olan *Arcobacter* türlerinin önemi henüz belirlenememiştir. Etkenin insanlardan izolasyonu için mikroaerofilik koşullarda nonselektif besiyerleri kullanılmaktadır. Bu besiyerlerinin kullanıldığı prosedür ile bir yıl süren çalışmada 468 yaşlı hastadan elde edilen 879 dışkı örneğinden etken izole edilememiştir (Phillips 2002).

2.1.9. *Arcobacter* Türlerinin İdentifikasyonu

İzolasyonu yapılan *Arcobacter'*lerin tür düzeyinde identifikasyonlarının yapılmasında biyokimyasal ve üreme testlerini içeren fenotipik özellikler ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır (Atabay ve ark 2003). *Arcobacter* türlerinin fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan biyokimyasal testler sınırlıdır (Wesley ve ark 1995, 1996, Wesley ve Baetz 1999, Antolin ve ark 2001, Atabay ve ark 2001). Ayrıca biyokimyasal testler zaman aldığı ve spesifitesi sınırlı olduğu için hızlı, güvenilir ve duyarlı metot olan moleküler yöntemler tercih edilmektedir (Gonzalez ve ark 2000, Fera ve ark 2004, Öngör ve ark 2004, Hill ve ark 2006, Brightwell ve ark 2007, Samie ve ark 2007).

Son zamanlarda besinlerden *Arcobacter* türlerinin identifikasyonu için PCR, DNA-DNA Hibridizasyon (Rashid ve ark 2000, Antolin ve ark 2001, Winter ve Slavik 2000), Restrictin Fragment Length Polymorphsm (RFLP), Amplified Fragment Length Polimorphism (AFLP) (Vandamme ve ark 1993, On ve ark 2003a,b, Samie ve ak 2007) gibi moleküler identifikasyon yöntemleri kullanılmaktadır.

Polimerase Chain Reaction (PCR), dizisi bilinen bir DNA bölgesinin in vitro olarak çoğaltılmasını sağlayan ve DNA molekülünün milyonlarca, hatta milyarlarca kopyasını kısa zamanda yapmaya olanak sağlayan bir tekniktir. İlk olarak Kary Mullis bu tekniğe bugünkü ismini vermiş ve uygulamaya koymuştur ve bu fikri ile 1993 yılında Nobel Kimya Ödülü'nü kazanmıştır (Birben 2006).

PCR, DNA'nin iki zincirinin yüksek sıcaklıkta uygulanan ısı işlemiyle birbirinden ayrılmasını (denatürasyon) takiben sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanmasını (hibridizasyonu) sonra zincirin uzamasını (polimerizasyonu) (çift iplikçikli DNA'larin sentezi) ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır. Bu üç adım (denatürasyon / primer bağlanması / DNA sentezi) bir PCR siklusunu oluşturur. Her adım farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilir (Birben 2006, Higuchi ve ark 1992).

PCR, oldukça hassas, hızlı ve spesifik bir metot olduğu için günümüzde bakteri türlerinin identifikasyonu ve ayırımı için geleneksel yöntemlerin alternatifi

olmaya aday bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Wesley 1997, Gonzalez ve ark 2000, Wesley ve ark 2000, Winter ve Slavik 2000, Houf ve ark 2002b, Morita ve ark 2004).

Günümüzde *Arcobacter* türlerinin identifikasyonu amacı ile, mPCR, Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Hurtado ve ark 1997, Marshall ve ark 1999, Rashid ve ark 2000, Atabay ve ark 2002, Houf ve ark 2002b), Enterobacterial Repetetive Intergenic Consensus PCR (ERIC-PCR) (Houf ve ark 2002b, Aydın ve ark 2007) gibi çeşitli PCR yöntemleri kullanılmaktadır.

PCR'ın bir çeşiti olan Chamberlian ve arkadaşları tarafından 1988 yılında tanımlanan mPCR, birden fazla primer çifti kullanılarak tek reaksiyonda birçok hedef bölgenin aynı anda çoğaltılması işlemidir (Phillips 2001b, Öngör ve ark 2004, Neubauer ve Hess 2006).

mPCR, *Arcobacter* türlerinin kısa sürede izolasyonu için oldukça kullanışlı bir yöntemdir ve *Campylobacterieceae* familyasındaki diğer bakteriler ile karışmasından kaynaklanabilecek yanlış pozitif sonuç riski de yoktur. mPCR yöntemiyle tek aşamalı PCR işlemi ile bütün *Arcobacter* türleri identifiye edilebilir (Öngör ve ark 2004, Snelling ve ark 2006, Neubaur ve Hess 2006, Snelling ve ark 2006). Bu nedenle bu metot günümüzde kullanılan diğer mikrobiyolojik identifikasyon metotlarına göre daha çok tercih edilir (Vandamme ve ark 1993, Hurtado ve ark 1997, Rashid ve ark 2000, Antolin ve ark 2001, Atabay ve ark 2002, Houf ve ark 2002 b, On ve ark 2003a).

2.1.10. Kontrol

Arcobacter ve *Campylobacter* türleri yakın ilişkili olmalarına rağmen besinlerden *Campylobacter* ve *Arcobacter* türlerini elimine etmek için uygulanan teknolojik yöntemler her iki tür üzerine aynı etkiyi göstermez. Örneğin *A. butzleri, C. jejuni'ye* göre radyasyon işlemine daha dayanıklıdır (Wesley1999, Phillips 2001a,b). Domuz etinin radyoaktif ışınlamaya maruz bırakılması sonucunda etkenin azaldığı (Wesley ve Baetz 1999, Cevenka ve ark 2006) ancak tamamen elimine olmadığı gözlemlenmiştir (Wesley ve Baetz 1999).

Yine et ürünlerinde antimikrobiyal olarak kullanılan sodyum laktat, sitrik asit ve laktik asit tuzları gibi organik asitler ve onların tuzları *Arcobacter'*ler üzerine de inhibe edici özelliğe sahiptir. Sodyum laktat, nisin ya da sodyum sitrat ile kombine olarak kullanıldığında *A. butzleri'*ye karşı etkili olmaktadır (Phillips 2001a,b Phillips ve Duggan 2001,2002, Lee ve ark 2002, Long ve Philips 2003a, Cervenka ve ark 2006). Et yüzeyinin bu asitlerin karışımı ile yıkanması ile başlangıçtaki kontaminasyonun azaldığı bildirilmiştir (Long ve Phillips 2003a, Cervanka ve ark 2006, Snelling ve ark 2006).

Nisin tek başına 5 saat içinde *A. butzleri*'yi inhibe eder (Lehner ve ark 2005). Ancak sodyum laktat tek başına besinlerde *A. butzleri'*nin gelişimini azaltıcı etkiye sahip değildir (Phillips 2001a,b, Lehner ve ark 2005, Cervanka ve ark 2006, Snelling ve ark 2006). Trisodyum fosfat ve Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) tek başına ya da nisin birlikte *A. butzleri'*nin gelişimini baskılar (Phillips 2001a, Phillips ve Duggan 2001, Lehner ve ark 2005).

Fisher ve ark (2007) limon, portakal ve bergomat esaslı yağların *A. butzleri* üzerine etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar turunçgil yağının direk kendisinin ya da buğusunun *A. butzleri* üzerine antibakteriyel etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Arcobacter'ler insanlara çiğ et ve et ürünleri ile çiğ süt ya da pastörize olmamış süt ve süt ürünleri gibi hayvansal gıdalar vasıtası ile bulaşabilmektedir (Scullion ve ark 2006, Ho ve ark 2007, Pianta ve ark 2007). *Arcobacter* türleri sıcaklığa duyarlıdır (Wesley1997, 1999, Hsueh ve ark 1997, Cervenka ve ark 2006, Son ve ark 2007a). Etken 55 °C ve üzerinde kolaylıkla inaktive olur. Bu nedenle et ve süt gibi hayvansal ürünlere ısı işlemi uygulanması etkenin inhibisyonunda etkilidir (Wesley 1999, Darka ve ark 2004, Lehner ve ark 2005, Snelling ve ark 2006, Hansen ve ark 2007). *Arcobacter* türleri arasında sıcaklık değişikliklerine en hassas olanı *A. butzleri*'dir (Wesley 1999, Lehner ve ark 2005, Hansen ve ark 2007)

Dondurma işleminde *Arcobacter* türlerinin sayısı azalır. Ancak dondurma işlemi tek başına etkenden korunmak için yeterli değildir (Wesley 1999, Hilton ve ark 2001, Hansen ve ark 2007).

Besinlerin pH'sını etkenin üreyebildiği optimal pH derecelerinden uzaklaştırmanın *Arcobacter* türlerinin besinlerdeki gelişimini azaltıcı etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Hsueh ve ark 1997, D'sa ve Harrison, 2005, Snelling ve ark 2006).

% 3.5-4'lük tuz konsantrasyonları (*A. halophilus* hariç) ve % 0,02'lik trisodyum polifosfat *Arcobacter*'lerin gelişiminin inhibisyonunda etkilidir (Hansen ve ark 2007).

Karkasın mikroorganizmalarla kontaminasyonu kesimhanelerde oluşmaktadır. Bu nedenle kesim boyunca karkasın kontaminasyonunu önlemek amacı ile hijyenik koşullara dikkat edilerek kesim yapılmalıdır (Lehner ve ark 2005, Hansen ve ark 2007). Besin işletmelerinde Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) programlarının uygulanması *Arcobacter* ve diğer besin kaynaklı patojenlerin kontrol altına alınmasında oldukça önemlidir (Phillips 2001a, Lehner ve ark 2005). Besin işletmelerinde çapraz kontaminasyonun engellenmesi için kullanılan materyallerin ayrılması, kullanılan plastik ve metal eşyanın sabunlu ve sıcak su ile temizlenmesine dikkat edilmelidir (Forbes ve ark 2002, Darka ve ark 2004).

Diğer bir önemli kontaminasyon kaynağı olan sulardan bulaşmayı önlemek için içme sularının düzenli klorlanması gerekmektedir (Wesley 1997, 1999, Rice ve ark 1999, Forbes ve ark 2002, Darka ve ark 2004 Percival ve ark 2004) Etken klorlama işlemiyle 5 dakika içerisinde inaktive olabilmektedir (Andersen ve ark 2006).

Arcobacter türlerine bağlı gastroenteritlerde sıvı ve elektrolit takviyesi tedavinin temelini oluşturmaktadır (Darka ve ark 2004, Samie ve ark 2007). Kanlı diyare ve yüksek ateş, bir gün içinde sekizden fazla dışkılaması olan ve semptomları bir haftadan uzun süren ayrıcas tanı konduğu andan itibaren düzelme olmayan veya ağırlaşan hastaların antibiyotikle tedavisi önerilmektedir. (Phillips 2001b, Houf ve ark 2001, Samie ve ark 2007). Etken, nalidiksik asit, sefalotin (Percival ve ark 2004), kanamisin, streptomisin gibi aminoglikozitlere ve tetrasikline duyarlıdır (Hseuh ve ark 1997, Atabay ve Aydın 2001, Fera ve ark 2003, Kabeya ve ark 2004, Otth ve ark 2004, Cervenka ve ark 2006, Snelling ve ark 2006).

Fera ve ark (2003) ciprofloxacin'in *A. butzleri* ve *A. cryaerophilus* üzerine inhibitör etkili olduğunu belirtmişlerdir. Ancak, Abdelbaqi ve ark (2007) bu antibiyotiğe karşı mutasyonlar sonucu direnç şekillenebileceğini bildirmişlerdir. Tetrasiklinlerin, aminoglikozitler ve enroflaksasinlerin *Arcobacter* infeksiyonlarında sağaltım amaçlı olarak kullanılabileceği bazı araştırmacılar (Hsueh ve ark 1997, Snelling ve ark 2006, Vandenberg ve ark 2006) tarafından ifade edilmiştir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1.MATERYAL

3.1.1. Numuneler

Çalışmada, Kayseri ilinde, farklı perakende satış noktalarından Ocak-Mart 2007 tarihleri arasında alınan 100 adet dana kıyma ve 100 adet koyun kıyma olmak üzere toplam 200 adet kıyma örneği incelendi. Numuneler, alındıktan sonra soğuk zincirde en kısa süre içerisinde laboratuara getirildi ve bir saat içerisinde incelemeye alındı.

3.1.2.Besiyerleri

3.1.2.1. Arcobacter Zenginleştirme Broth (AZB)

Peptone	18,0 g
Sodium chloride	5,0 g
Yeast Extract	1,0 g
pH 7,2 ±0,2	

AZB (Oxoid CM965)'den 24 g tartılarak 500 ml distile su içerisinde karıştırıldı. Elde edilen karışım 121°C'de 15 dk otoklavlanarak steril edildi. Sterilizasyon işleminden sonra 50 °C'ye kadar soğutuldu. Karışıma iki vial CAT selektif saplement ilave edildikten sonra ağzı vida kapaklı steril tüplere 10'ar ml ölçü ile dağıtıldı. Kullanılıncaya kadar 4 °C'de muhafaza edildi.

3.1.2.2. Kanlı Agar

Pepton	15 g
Heart extract	5 g
Sodium chloride	5 g
Agar	15 g
pH 6,8± 0,2	

Kanlı agardan (Merck 1.10886.0500) 40 g tartılarak 1 lt distile suda homojenize edildi. Homojenizat 121 °C'de 15 dk steril edildi. Sterilizasyon işleminden sonra agar 50°C'ye soğutuldu. Besiyerine % 5 steril defibrine koyun kanı ilave edilerek steril petrilere döküldü. Kullanılıncaya kadar 4 °C'de muhafaza edildi.

3.1.2.3. Nitrat Buyyon

Beef extract	3,0 g
Pancreatic digest of gelatin	5,0 g
Potassium nitrate	1,0 g
pH 7,0±0,2	

Nitrat buyyondan (Acumedia 7321) 4,5 g tartılarak 500 ml distile su içerisinde homojenize edildi. Ağzı vida kapaklı deney tüplerine 5'şer ml ilave edilerek 121 °C'de 15 dk sterilizasyon işlemi uygulandı. Kullanılıncaya kadar 4 °C'de muhafaza edildi.

3. 1.2.4. Mac Conkey Agar

Peptone	17 g
Polipepton	3 g
NaCl	5 g
Laktoz	10 g
Safra tuzları	1,5 g
Nötral kırmızısı	0,03 g
Agar	13,5 g
pH 7,1±0,2	

Mac Conkey agardan (Merck 1.05465.0500) 50g tartılarak 1 lt distile suda homojenize edildi. Homojenizat 121 °C'de 15 dk steril edildi. Sterilizasyon işleminden

sonra agar 50°C'ye soğutularak steril petrilere döküldü. Kullanılıncaya kadar 4 °C'de muhafaza edildi.

3. 1.2.5. Üre Agar

Peptone	1 g
d- Glukoz	1 g
NaCl	5 g
KH_2PO_4	2 g
Safra tuzları	1,5 g
Fenol kırmızısı	0,012 g
Agar	12 g
pH 7,1±0,2	

Üre agardan (Merck 8492) 21 g alınarak 1 litre distile su ile homojenize edildi ve 121 °C'de 15 dk steril edildi. Sterilizasyon işleminden sonra agar 50 °C'ye soğutularak 50 ml/l olacak şekilde % 40'lık steril üre ilave edildi. Daha sonra steril tüplere 9'ar ml ilave edilerek yatık agar olarak hazırlandı ve kullanılıncaya kadar 4 °C'de muhafaza edildi.

3. 1.2.6. Muller-Hinton Agar

Sığır Et suyu (B-21)	300 ml
Casein Hydrolysate	17,5 g
Nişasta	1,5 g
Agar	10 g
pH 7,4±0,2	

Muller-Hinton Agar (Merck 1.05437)'dan 34 g tartılarak 1 lt distile suda homojenize edildi. Homojenizat 121 °C'de 15 dk steril edildi. Sterilizasyon işleminden sonra agar 50

°C'ye soğutularak besiyerine % 5 steril defibrine koyun kanı ilave edilerek steril petrilere döküldü. Kullanılıncaya kadar 4 °C'de muhafaza edildi.

3.1.3. Saplement

3.1.3.1. Cefoperazone amphotericin teicoplanin (CAT)

Cefoperazone	4,0 mg
Teicoplanine	2,0 mg
Amphotericine B	5,0 mg

2 vial CAT selektif supplementi (Oxoid SR174E) 2'şer ml steril distile su ile sulandırıldı ve 500 ml AZB içerisine ilave edildi. Kullanılıncaya kadar 4 °C'de muhafaza edildi.

3.1.4. Filtre

3.1.4.1. Selüloz Asetat Membran Filtre

Gözenek çapı 0,45 μm ve 47 mm büyüklüğe sahip olan selüloz asetat membran filtreler (Sartorius AG 37070) AZB'ta üreyen şüpheli kültürlerin kanlı agar üzerine süzülmesi amacı ile kullanılmıştır. Steril selüloz astat membran filtreler steril bir pens yardımı ile kanlı agar üzerine yerleştirildi.

3.1.5. Antibiyotik Diskleri

3.1.5.1. Nalidiksik Asit (Bioanalyse ASD0600, 30 μg)

Antibiyotik duyarlılık testi için kullanıldı.

3.1.5.2. Sefalotin (Bioanalyse ASD0260, 30 μg)

Antibiyotik duyarlılık testi için kullanıldı.

3.1.6. Ayıraçlar

3.1.6.1. Oksidaz Test Çubuğu (Oxoid BR 0064 A)

Oksidaz testinin yapılmasında kullanıldı.

3.1.6.2. Katalaz Test Ayıracı

Hidrojen Peroksit	3 g
Distile su	100 ml

3.1.6.3. Nitrat Redüksiyon Test Ayıracı

A Ayıracı :

ά-Naftil amin	0,5 g
Asetik Asit (5N), % 30	100 ml

B Ayıracı

Sülfanilik asit	0,8 g
Asetik Asit (5N), % 30	100 ml

Nitrat redüksiyon testinin yapılmasında kullanıldı.

3.1.6.4. Sodyum Hippurat Ayıracı

Sodyum Hippurat	1,0 g
Distile su	100 ml

3.1.6.5. Ninhydrine Ayıracı

Ninhydrine	0,1 g
Butanol	50 ml
Aseton	50 ml

3.1.7. Gas Generating Kit

Arcobacter Zenginleştirme broth'unda gerçekleştirilen inkübasyonda mikroaerofilik koşulları oluşturmak amacı ile 2,5 l'lik Anaerobik jar (Merck 1.16387.0001) içerisine CampyGen (Oxoid CN0025A) kiti yerleştirildi.

3.1.8. Boyalar

3.1.8.1. Gram Boyama Seti (GBL 5026/01,02,03,04)

Hucker Kristal Moru Çözeltisi (5026/01)	
Kristal Moru	1 g
Distile su	100 ml

Burke İyot Çözeltisi (5026/02)	
İyot	1 g
Potasyum İyodür	2 g
Distile Su	100 ml

Denatüre Alkol-Aseton (5026/03)	
Aseton	50 ml
Alkol (%96'lık)	50 ml

Safranin Çözeltisi (5026/04)	
Safranin	1 g
Distile Su	100 ml

3.1.9. Standart Suş

Çalışmada izolasyon işleminin her aşamasında kullanılan kontrol suşları Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalına ait kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.1.10. PCR Reaktifleri

3.1.10.1. 10X PCR Buffer (Vivantis RB0202)

KCl	500mM
Tris-HCl (pH 9,1)	100mM
Triton^{TM}X-100	% 0,1
$MgCl_2$	15 mM

3.1.10.2. dNTP Mix

dNTP mix (Vivantis NP2409, 10Mm), eşit miktarlarda dATP, dCTP, dGTP ve dTTP içeren konsantrasyonu 10 mM olan sıvı solusyon, amplifikasyon esnasında denatüre edilen zincirlerin tamamlanması için PCR reaksiyonunda kullanıldı. Kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

3.1.10.3. Taq Polimerase

Konsantrasyonu 5U/µl olan ısıya dayanıklı DNA enzimi (Vivantis PL1202, 500U), moleküler aşamada PCR reaksiyonunda çift zincirli DNA'nın 5'-3' yönünde nükleotidlerine ayrılmasını ve tek iplikçikli hale gelmesini sağlamak amacı ile kullanıldı. Kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

3.1.10.4. $MgCl_2$

Konsantrasyonu 50 mM olan $MgCl_2$ (Vivantis RB0204, 50mM), PCR reaksiyonunda Taq polimeraz enzimi ile birlikte kullanıldı. Kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

3.1.10.5. Primerler

Çalışmada, mPCR reaksiyonu sonucunda yapılan agaroz jel elektroforezinde *A. cryaerophilus* için 257 bp (base pair), *A. butzleri* için 401 bp, *A. skirrowi* için ise 641 bp büyüklüğünde bandlar oluşturması primerler kullanıldı. Çalışmada kullanılan primerler Tablo 3.1'de belirtilmektedir.

Tablo. 3.1. Çalışmada Kullanılan Primerlerin Dizilimi

Primer	Primer Dizilimi	Kaynak
ARCO	5'-CGT ATT CAC CGT AGC ATA GC-3'	Houf ve ark 2000
BUTZ	5'-CCT GGA CTT GAC ATA GTA AGA ATGA-3'	Houf ve ark 2000
CRY1	5'-TGC TGG AGC GGA TAG AAG TA-3'	Houf ve ark 2000
CRY2	5'-AAC AAC CTA CGT CCT TCG AC-3'	Houf ve ark 2000
SKIR	5'-GGC GAT TTA CTG GAA CAC A-3'	Houf ve ark 2000

Çalışmada elde edilen izolatlar beş adet primer kullanılarak m-PCR tekniği ile incelenmiştir (ARCO, BUTZ, SKIR, CRY1 ve CRY2). ARCO-BUTZ primerleri bütün *A. butzleri*'lerin, ARCO-SKIR primerleri *A. skirrowi*'nin, CRY1 ve CRY2 primerleri ise *A. cryaerophilus* 1 ve *A. cryaerophilus* 2'nin identifikasyonu için kullanıldı.

Çoğaltılması istenen bölgenin iki ucundaki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp ona bağlanacak olan sentetik DNA parçaları olan liyofilize primerler 25 pmol/µl (SKIR primeri) ve 50 pmol/µl (ARCO, BUTZ, CRY1 ve CRY2 primerleri) olacak şekilde sulandırıldı. Sulandırılan primerler PCR reaksiyonunda kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

3.1.10.6. VC 100 bp Plus DNA Ladder (Marker)

Konsantrasyonu 0,5 µg/µl olan VC 100 bp Plus DNA ladder (Vivantis NL0401), elektroforez sonucunda oluşan bandların büyüklüklerini belirlemek için kullanıldı. Kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

3.1.10.7. 6 X Loading Dye

6 X Loading Dye'ın (Vivantis NM0410) bileşiminde bromophenol blue ve xylene cyanol FF boyaları bulunmaktadır. Elektroforez boyunca DNA göçünün izlenmesi amacı DNA ladderlerin ve örneklerin agaroz jele yüklenmesinde kullanıldı. Kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

3.1.10.8. 10 X TBE Electrophoresis Buffer

Tris	89 mM
Birk asit	89 mM
EDTA	2 Mm

50 ml 10 X TBE Buffer (Fermentas B 52) 950 ml distile su ile 1000'e tamamlanarak 0.5 X TBE buffer hazırlandı. 0,5 X TBE buffer agaroz jel hazırlamasında ve elektroforez aşamasında kullanıldı.

3.1.10.9. Agarose

Agaroz'dan (Vivantis PC0701) 1,5 gr tartılarak 10 ml 0,5X TBE ile homojenize edildi. Mikro dalga fırında bir dk 400W'ta bekletilerek eritildi. 5–6 dk soğumaya bırakıldı. 50 °C civarına kadar soğutulan agaroza 3 µl ethidium bromid ilave edildi ve jel haline getirilerek elektroforez aşamasında kullanıldı.

3.1.10.10. Ethidium Bromide

Jelde DNA bandlarının görülebilmesi amacı ile kullanılan ethidium bromid'ten (Merck 1.11615.0001) 10 mg tartılarak 10 ml distile su ile sulandırıldı ve agaroz jel hazırlanmasında kullanıldı.

3.2. METOT

3.2.1. *Arcobacter* spp. İzolasyonu

Arcobacter spp. izolasyonu amacı ile 25 g kıyma numunesi alınarak steril plastik poşet içerisine tartıldı ve numune üzerine 225 ml steril distile su ilave edilerek numune karıştırıcıda (Stomacher-Bagmixer) yaklaşık 2 dakika karıştırılmak süretiyle homojenize edildi. Daha sonra homojenize sıvıdan aseptik şartlarda 10 ml alınarak içerisinde çift katlı 10 ml AZB (Oxoid CM965) bulunan tüplere konuldu. Tüpler vorteks kullanılarak homojen hale getirildi. Homojenizasyon sağlandıktan sonra tüpler mikroaerofilik şartlarda 30 ^{o}C'de 48 saat ön zenginleştirme için inkübe edildi. Ön zenginleştirme işleminden sonra

AZB'de üreyen şüpheli kültürler, selüloz asetat membran filtreler kullanılarak kanlı agara (% 5 steril defibrine koyun kanı içeren) inoküle edildi ve membran filtrasyon tekniğine göre ekim yapıldı (Atabay ve ark 2003).

3.2.2. Membran Filtrasyon Tekniği

Çalışmada, 47 mm büyüklüğe ve 0,45 µm gözenek çapına sahip selüloz asetat membran filtreler (Sartorius AG 37070) aseptik koşullarda steril pens yardımı ile kanlı agar üzerine yerleştirildi. Mikroaerofilik koşullarda AZB'de 48 saat ön zenginleştirme işlemi için inkübasyona bırakılan şüpheli kültürün bir kısmı pastör pipeti yardımı ile alındı. *Arcobacter* türlerinin hareket yeteneklerini kullanarak membran filtrelerden geçmesi prensibine dayanarak pastör pipeti yardımı ile alınan şüpheli kültürden 5–8 damla kanlı agar üzerine yerleştirilmiş bulunan membran filtreler üzerine farklı noktalara damlatıldı ve aerobik olarak oda ısısında yaklaşık 45 dakika bekletildi (Resim 3.1). Bu aşamadan sonra aseptik koşullar altında steril bir pens yardımı ile filtreler uzaklaştırıldı. İnokülasyon yapılmış kanlı agarlar steril öze aracılığı ile çizme plak yöntemi uygulandıktan sonra aerobik koşullarda 30 ^{o}C'de 2–7 gün inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda üreyen kolonilere mikroskobik muayene ve biyokimyasal testler uygulandı (Atabay ve ark 2003).



Resim. 3.1. Membran filtarasyon yöntemi ile yapılan ekimler (Aseptik koşullarda kanlı agar üzerine yerleştirilen 47 mm çapta büyüklüğe ve 0,45 µm gözenek çapına sahip selüloz asetat membran filtrelere AZB'de üreyen şüpheli kültürden yapılan ekimler fotograflanmıştır).

3.2.3. Mikroskobik Muayene

Arcobacter türlerinin morfolojik yapısının ve sahip olduğu hareket özelliğinin belirlenmesi amacı ile kanlı agarda üreyen her bir şüpheli koloniden hazırlanan preparatlar mikroskop altında incelendi. Bu amaçla, etkenin morfolojik yapısı Gram boyama yöntemi ile saptandı. Karanlık saha mikroskobunda hareket muayenesi yapılarak mikroskobik muayene tamamlandı (Atabay ve Corry 1998, Atabay ve ark 2003)

3.2.3.1. Gram Boyama Yöntemi

Lam üzerine bir damla fizyolojik tuzlu su (FTS) çözeltisi konuldu. Daha sonra her bir agardan şüpheli bir koloni iğne uçlu öze ile alınarak lam üzerindeki FTS'de karıştırılarak belirli bir alana yayıldı. Preparat havada kurutulduktan sonra üç kez alevden geçirilerek tespit işlemi gerçekleştirildi. Preparat kristal violet boyası ile 1-2 dakika boyandı. Boya uzaklaştırıldıktan sonra distile su ile yıkandı. Daha sonra lugol çözeltisi ile 1–2 dakika boyandı. Boya dökülerek distile su ile yıkandı. Preparatın üzerine absolüt alkol dökülerek 10 saniye dekolere edildi. Distile su ile yıkandı ve safranin çözeltisi ile 30 saniye boyandı. Preparat distile su ile yıkandı ve kurutuldu. İmmersiyon yağı damlatılarak mikroskop altında 100'lük objektifte incelendi (Bilgehan 2002).

3.2.3.2. Hareket Muayenesi

Şüpheli kolonilerdeki hareketi gözlemlemek için lam-lamel arası muayene yöntemi uygulandı. Lam üzerine bir damla FTS çözeltisi konuldu. Şüpheli koloni bir öze yardımı ile alınarak lam üzerindeki FTS ile karıştırılarak homojenize edildi. Daha sonra lam üzerine lamel kapatıldı. Preparat karanlık saha mikroskobunda *Arcobacter'*ler için karakteristik olan " kurbağa larvası" veya " spiral" hareket yönünden incelendi (Bilgehan 2002).

3.2.4. Biyokimyasal Testler

Kanlı agarda izole edilerek Gram boyama ve hareket kontrolü yapılan izolatlara fenotipik özelliklerini belirlemek amacı ile biyokimyasal testlerden oksidaz, katalaz, nitrat

redüksiyon, üreaz, hippurat, nalidiksik asit ve sefalotin'e duyarlılık testleri yapıldı ve Mac Conkey agarda üreyebilme, 42 ve 37°C'de üreme özellikleri yönünden incelendi.

3.2.4.1. Oksidaz testi

Bu amaçla oksidaz tez çubuğundan yararlanıldı. Bir öze yardımı ile kanlı agardan alınan şüpheli koloniler oksidaz test çubuğunun ayıraçlı kısmına sürüldü. Ayıraçlı kısımda mor rengin oluşması pozitif olarak değerlendirildi (Bilgehan 2002).

3.2.4.2. Katalaz Testi

İncelenecek saf kültürden içerisinde 5 ml AZB bulunan tüpe 0,1 ml inokülasyon yapılarak 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda tüp içerisine % 3'lük hidrojen peroksitten 1 ml ilave edildi. Hava kabarcığı görülen tüpler pozitif olarak değerlendirildi (Koneman ve ark 1992).

3.2.4.3. Nitrat Redüksiyon Testi

Arcobacter spp. şüpheli saf kültürden bir öze dolusu alınarak nitrat buyyona ekim yapıldı. Kültürler 25 °C'de 18–24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda kültürlere sırası ile önce A sonra da B ayıracından 1'er ml ilave edildi. Tüplerde kırmızı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirildi (Bilgehan 2002).

3.2.4.4. Üreaz Testi

Yatık üre agara şüpheli kolonilerden ekim yapıldı. 37 °C'de 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda besiyerinin renginin pembeye dönüşmesi pozitif olarak değerlendirildi (Bilgehan 2002).

3.2.4.5. Hippurat Testi

Şüpheli kültür 0,4 ml sodyum hippurat ayıracı içeren tüpe yoğun olarak inokule edildikten sonra 37°C'de 2 saat su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüpe 0,2 ml ninhidrin ayıracı ilave edilerek iyice karıştırılarak tekrar su banyosunda 10 dk bekletildi. Bu süre sonunda tüplerde koyu mor renk oluşumu pozitif olarak değerlendirildi (Bilgehan 2002).

3.2.4.8. Nalidiksik asit ve Sefalotin'e Duyarlılık Testi

Bu amaçla disk difuzyon metodu kullanıldı. Kanlı agarda pasajlar yapılarak saflaştırılmış şüpheli koloni öze ile steril fizyolojik tuzlu su (FTS) ile yoğunluğu Mcfarland 0.5 (Bulanıklık derecesi) olacak şekilde süspanse edildi. Elde edilen süspansiyondan % 5 defibrine koyun kanı içeren MHA'a 0,1 ml ilave edilerek dragalski çubuğu yardımı ile besiyerine yayıldı. Daha sonra besiyerine nalidiksik asit (Bioanalyse ASD0600, 30 µg) ve sefalotin (Bioanalyse ASD0260, 30 µg) antibiyotik diskleri belirli uzaklıklarda yerleştirildi. Besiyeri 30 °C'de mikroaerofilik ortamda 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda zon oluşumu yönünden gözlemlendi (Atabay ve Aydın 2001, Otth ve ark 2004, Vandenberg ve ark 2006).

3.2.4.9. Mac Conkey Agarda Üreyebilme Yeteneği

Saflaştırılmış şüpheli kolonilerden Mac Conkey agara inokülasyonlar yapılarak 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda üreme durumu değerlendirildi (Bilgehan 2002)

3.2.4.10. 37°C ve 42°C'de Üreyebilme Testi

Şüpheli saf kültürlerden kanlı agara inokülasyonlar yapıldı. Her bir örnek için besiyerleri hem 37°C'de hem de 42°C'de aerobik ve mikroerobik ortamda 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda petri plakları koloni oluşumu yönünden değerlendirildi (Atabay ve ark 2003).

3.2.5. Moleküler İdentifikasyon

3.2.5.1. DNA Ekstraksiyonu

Bakteri DNA'sını elde etmek için ekstraksiyon işlemi Houf ve ark (2000)'nın bildirdiği şekilde yapıldı.

Ekstraksiyon için kullanılan 1,5 ml'lik DNase/RNase free ependorflara 1 ml steril distile su ilave edildi. Kanlı agarda üreyen şüpheli 8-10 koloni öze yardımı ile DNase/RNase free ependrofların içerisindeki 1 ml steril distile su içerisine çözündürülüp

vorteks ile karıştırılarak homojen hale getirildi. Homojenize edilen numuneler 13000 rpm (revolution per minute= dak/devir)'de 5 dakika santifüj işlemine tabi tutuldu. Santifüj sonrası üstteki sıvı atıldı. Ependrof tüpünün dibinde kalan çöküntü üzerine 500 µl steril distile su ilave edilerek süspanse edildi. Süspansiyon 100 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 10 dakika kaynatıldı. Kaynatılan örneklerin 13000 rpm'de 10 dakika santifüjü sonunda üst kısımda toplanan DNA süspansiyonu alındı. Elde edilen DNA ekstraktları PCR işlemine tabi tutulana kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

3.2.5.2 Multipleks PCR

Multiplex Polimerase Chain Reaction için Thermal cycler (Techne TC-512) kullanılmıştır. Reaksiyonda primer olarak *Arcobacter* cinsindeki bakterilerin 16 S RNA gen bölgesinden büyüklüğü 257 ile 654 bp (base pair = baz çifti) arasında değişen parçaları amplifiye eden tür spesifik primerler kullanıldı (Tablo. 3.1.10.5.1).

Reaksiyon karışımı final konsantrasyonu 50 µl olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon karışımı; 2 µl DNA örneği, 5 µl 10x PCR buffer (Vivantis),1.25 mM $MgCl_2$ (Vivantis), 0.2 mM dNTP Mix (Vivantis), 50 pmol ARCO, BUTZ, CRY1, CRY2 primerleri, 25 pmol SKIR primeri, 1.5 U Taq polymerase (Vivantis) şeklinde hazırlandı (Houf ve ark 2000). Karışımın her biri 200 µl'lik ısıya dayanıklı DNase-RNase free özel PCR tüplerine 48 µl reaksiyon karışımı 2µl DNA örneği içerecek şekilde dağıtıldı.

m-PCR reaksiyonu için tüpler thermal cyclere yerleştirildi. DNA amplifikasyonu, 94°C'de 2 dk ön denatürasyon işlemi uyguladıktan sonra 94°C'de 45 s, 61°C'de 45 s ve 72°C'de 30 s olmak üzere toplam 32 siklusta gerçekleştirildi (Houf ve ark. 2000).

3.2.5.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Amplifikasyon sonucunda elde edilen PCR ürünleri % 1,5'lik agaroz jelde 90 V gerilimde 45 dk elektroforez (Thermo EC 330) işlemine tabi tutulduktan sonra, UVP jel dökümantasyon sistemi (Vilber Laurmat ECX-20-M) kullanılarak görüntülendi (Houf ve ark 2000).

3.3.İstatistiksel Metot

Çalışmada sığır ve koyun kıymalarında *Arcobacter* spp., *A. butzleri*'nin varlığı Pearson Chi-Square (χ^2) testi ile, *A. skirrowi*'nin varlığı ise Fisher's Exact Test ile değerlendirilmiştir (Özdamar 2001).

4. BULGULAR

Çalışmada, Kayseri ilindeki beş farklı satış noktasından bir hafta aralıklar ile alınan kıyma numuneleri *Arcobacter* türlerinin varlığı bakımından araştırıldı. Çalışmada 100 adet sığır ve 100 adet koyun kıyması incelendi.

Sığır ve koyun kıyma numunelerinin membran filtrasyon metodu ile kanlı agara yapılan ekimleri sonucunda üreyen kolonilere mikroskobik muayene ve biyokimyasal testler uygulandı.

4.1. Mikroskobik Muayene Sonuçları

Çalışmada şüpheli kolonilerden hazırlanan preparatların Gram boya yöntemi ile boyanması sonucunda yapılan mikroskobik muayenede, sığır kıyma numunesinin 42'sinde (% 42), koyun kıyma numunesinden 43'ünde (% 43), pembe renkli çomak şeklinde, hareketli Gram negatif bakteriler tespit edildi.

Resim 4.1'de membran filtrasyon tekniği ile kanlı agarda yapılan ekim sonucu üreyen koloniler belirtilmektedir.



Resim 4.1. Kanlı Agardaki *Arcobacter* Kolonileri (Aseptik koşullarda kanlı agar üzerine yerleştirilen 47 mm çapta büyüklüğe ve 0,45 µm gözenek çapına sahip selüloz asetat membran filtrelerden geçerek kanlı agarda üreyen koloniler fotograflanmıştır).

4.2. Biyokimyasal Test Sonuçları

Çalışmada yapılan biyokimyasal testler ve sonuçları Tablo 4.1'de özetlenmiştir.

Tablo 4.1. Kıyma Numunelerinden Elde Edilen İzolatların Fenotipik Özellikleri

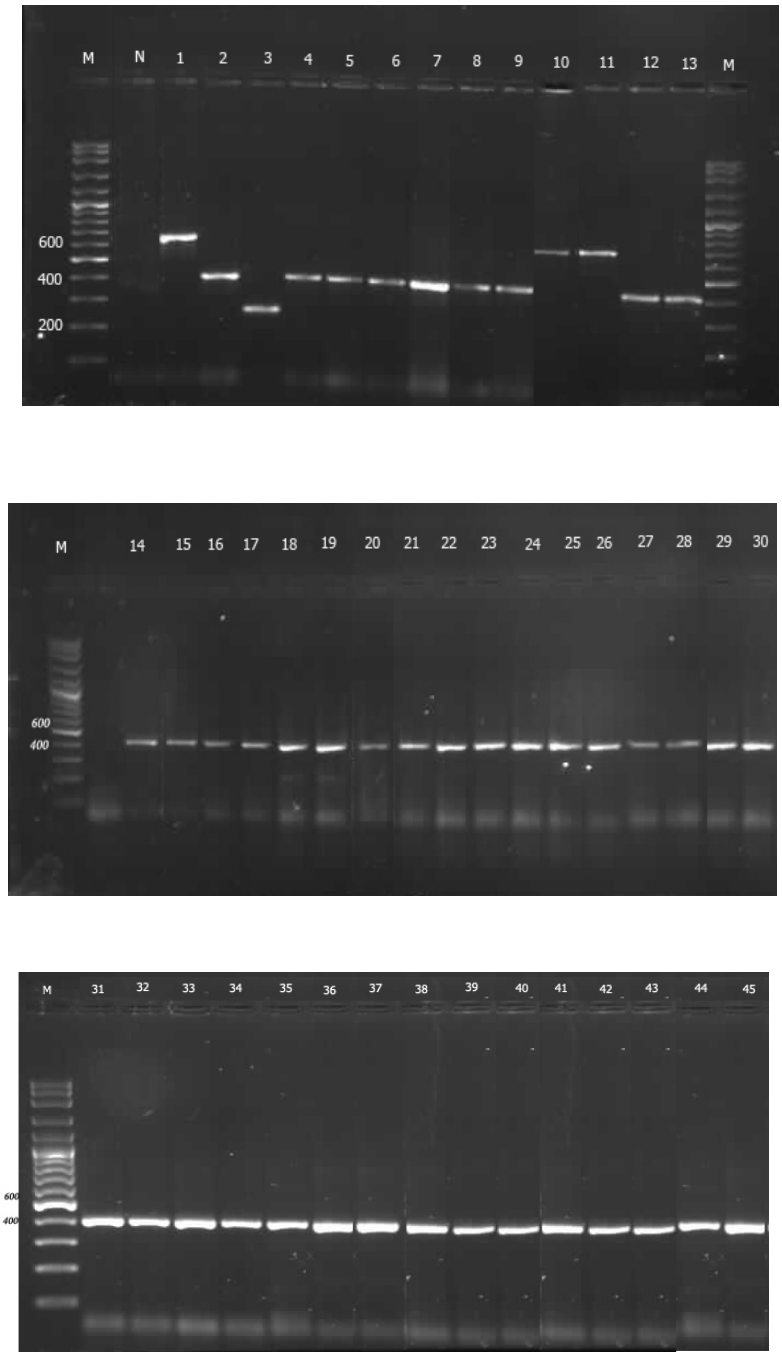
Fenotipik Testler	*A. butzleri*	*A. skirrowi*
Gram negatif (+)	79	6
Hareket (+)	79	6
Oksidaz (+)	79	6
Katalaz (+)	79	6
Üreaz (+)	0	0
Hippurat Hidroliz (+)	0	0
Nitrat Redüksiyon (+)	79	6
Üreme Yeteneği		
30 °C'de mikroaerofilik (+)	79	6
37 °C'de mikroaerofilik (+)	79	6
37 °C'de aerobik (+)	79	6
42 °C'de aerobik (+)	0	0
42 °C'de mikroaerofilik (+)	0	0
MacConkey Agarda (+)	79	0
Nalidiksik asite direnç (30µ) (+)	0	0
Sefalotin'e direnç (30µ) (+)	79	0

4.3. Multipleks PCR Sonuçları

Çalışmada, mPCR reaksiyonu sonucunda yapılan agaroz jel elektroforezinde *A. cryaerophilus* için 257 bp (base pair), *A. butzleri* için 401 bp, *A. skirrowi* için ise 641 bp büyüklüğünde bandların oluşumu beklendi.

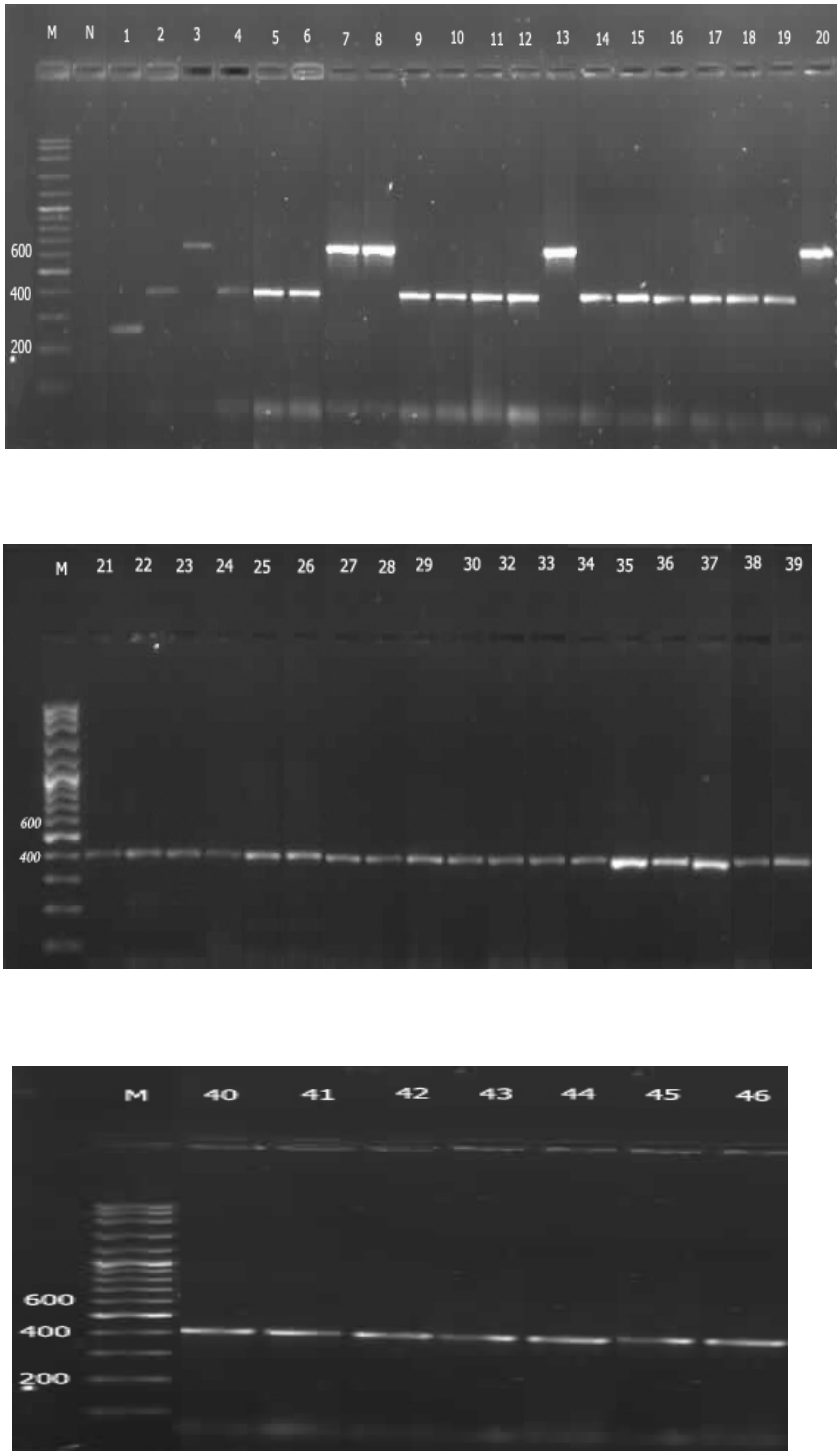
mPCR işlemi sonucunda 100 adet sığır kıyma örneğinin 40'ı (% 40) *A. butzleri*, 2'si (% 2) *A. skirrowi* olarak identifiye edildi (Resim 4.2).

Koyun kıyma numunelerinden elde edilen izolatların m-PCR işlemi uygulanmasından sonra oluşan amplikonlara uygulanan agaroz jel elektroforezinde ise 39'u (% 39) *A. butzleri* olarak, 4'ü (% 4) *A. skirrowi* olarak identifiye edildi (Resim 4.3).



Resim 4.2. Sığır Kıyma Numunelerinde mPCR Ürünleri (%1,5 Agaroz Jel)

M : Marker, N: Negatif kontrol, 1nolu band: *A. skirrowi* için pozitif kontrol, 2 nolu band: *A. butzleri* için pozitif kontrol, 3 nolu band: *A. cryaerophilus* için pozitif kontrol, 4-9 nolu bandlar : *A. butzleri* pozitif numuneler, 10-11 nolu bandlar : *A. skirrowi* pozitif numuneler , 12-45 nolu bandlar : *A. butzleri* pozitif numuneler.



Resim 4.3. Koyun Kıyma Numunelerinde mPCR Ürünleri (%1,5 Agaroz Jel)

M : Marker, N: Negatif kontrol, 1nolu band: *A. cryaerophilus* için pozitif kontrol, 2 nolu band: *A. butzleri* için pozitif kontrol, 3 nolu band: *A. skirrowi* için pozitif kontrol, 4-5 nolu bandlar : *A. butzleri* pozitif numuneler, 7-8 nolu bandlar : *A. skirrowi* pozitif numuneler , 9-12 nolu bandlar : *A. butzleri* pozitif numuneler, 13 nolu band : *A. skirrowi* pozitif numune, 14-19 nolu bandlar : *A. butzleri* pozitif numuneler, 20 nolu band: *A. skirrowi* pozitif numune, 21-46 nolu bandlar:. *A. butzleri* pozitif numuneler.

Çalışmada 200 adet kıyma numunesinde *A. cryaerophilus* 1 ve 2'e rastlanmadı. m-PCR işlemi sonucunda yapılan agaroz jel elektroforezinde de *A. cryaerophilus* 1 ve 2 spesifik olan 257 bp büyüklüğünde band oluşumu gözlenmedi.

4.4. Kıyma Numunelerinde *Arcobacter* spp. Prevalansı

Çalışmada incelenen 200 kıyma numunesinin 85'inde (% 42,5) *Arcobacter* türleri izole edildi. 85 pozitif örneğin 79'u (% 92,9) *A. butzleri,* 6'sı (% 7,1) *A. skirrowi* olarak belirlendi (Şekil 4.1). *A. butzleri,* sığır kıyma numunelerinin 40'ından (% 40), koyun kıyma numunesinin 39'undan (% 39) izole edilirken, *A skirrowi* ise, sığır kıyma numunelerinin 2'sinden (% 2), koyun kıyma numunesinin 4'ünden (% 4) izole edildi (Şekil 4.2). Tablo 4.2.'de çalışmada kullanılan sığır ve koyun kıymalarındaki *Arcobacter* türlerinin prevalansı belirtilmektedir.

Tablo 4.2. Sığır ve Koyun Kıymalarında *Arcobacter* Türlerinin Prevalansı

Numune		Pozitif Örnek Sayısı ve Yüzdesi								
		Arcobacter spp.		(χ^2) *	*A. butzleri*		(χ^2) *	*A. skirrowi*		(χ^2) **
		Sayısı	%		Sayısı	%		Sayısı	%	
Sığır kıyma	(n= 100)	42	42[a]	0,020	40	95,2[b]	0,021	2	4,8[c]	0,687
Koyun kıyma	(n= 100)	43	43[a]		39	90,6[b]		4	9,4[c]	
Total	(n= 200)	85	42,5		79	92,9		6	7,1	

* Pearson Chi-Square

** Fisher's Exact Test

[a,b,c] Aynı sütunda aynı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılık önemsizdir (p>0,05).

[b,c] Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılık önemlidir (p<0,05)

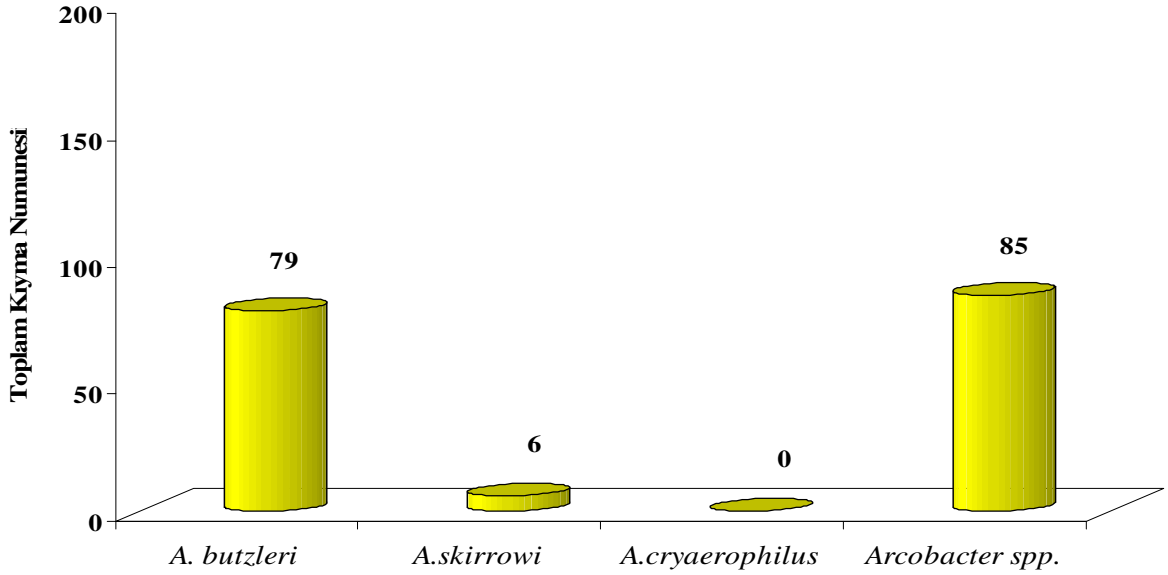
Tablo 4.3'de çalışmada *Arcobacter* pozitif olarak tespit edilen numunelerdeki *A. butzleri* ve *A. skirrowi*'nin prevalansları gösterilmektedir.

Tablo 4.3. *Arcobacter* Pozitif Numunelerdeki *A.butzleri* ve A. *skirrowi*'nin Prevalansı

Arcobacter spp. pozitif numune sayısı	*A. butzleri* pozitif numune sayısı	%	*A. skirrowi* pozitif numune sayısı	%	(χ^2)
85	79	92,9[a]	6	7,1[b]	125,39

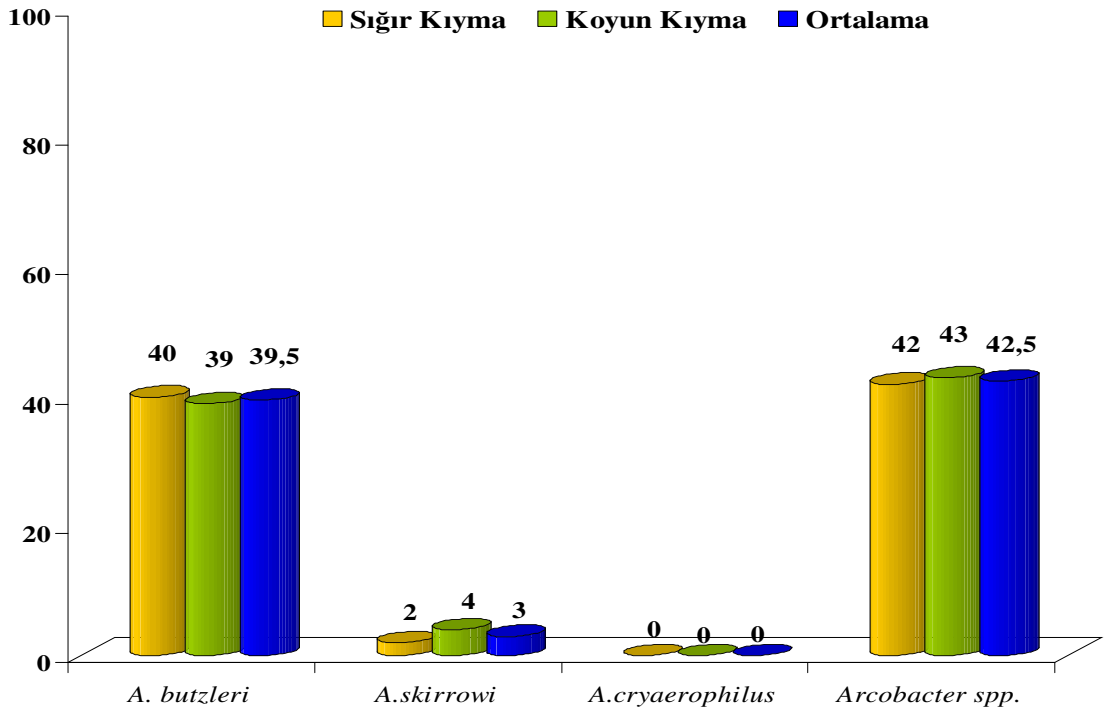
[a,b] Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılık önemlidir (p<0,001)

. Şekil 4.1'de *Arcobacter* türlerinin kıyma numunelerindeki dağılımı belirtilmektedir.



Şekil 4.1. *Arcobacter* Türlerinin Toplam Kıyma Numunelerinde Dağılımı

Şekil 4.2'de *Arcobacter* türlerinin koyun ve sığır kıyma numunelerindeki dağılımı gösterilmektedir.



Şekil 4.2. *Arcobacter* Türlerinin Koyun ve Sığır Kıyma Numunelerinde Dağılımı

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

İnsan ve hayvanlarda bazı önemli hastalıkların nedeni olan *Arcobacter* türleri için kanatlı etleri, kırmızı etler ve süt gibi hayvansal gıdalar ile su en önemli bulaşma kaynakları olarak kabul edilmektedir.

Arcobacter türlerinin faklı hayvan türlerinden ve değişik kaynaklardan izolasyon ve identifikasyonunda bir çok araştırmacı çeşitli yöntemler kullanmıştır (Corry ve Atabay 1997, Atabay ve Corry 1998, Houf ve ark 2001a, Atabay ve ark 2001, Ongor ve ark 2004, Rivas ve ark 2004).

Bu çalışmada, *Arcobacter* türlerinin izolasyonunda Atabay ve ark (2001) tarafından önerilen CAT saplementli AZB besiyerinden yararlanıldı. Numuneler ön zenginleştirme amacı ile AZB'ye inoküle edildikten sonra inkübasyona alındı. İnküsbasyon sonrası ön zenginleştirmede üreyen şüpheli kültürden membran filtrasyon tekniği kullanılarak kanlı agarda etkenin izolasyonu gerçekleştirildi.

Çalışmada incelenen 200 adet kıyma numunesinin 85'inde (% 42,5) *Arcobacter* spp. izole edildi. Elde edilen izolatlardan yapılan mPCR reaksiyonu sonucunda koyun kıymalarının % 39'undan *A. butzleri*, % 4'ünden *A. skirrowi*, sığır kıymalarının % 40'ından *A. butzleri*, % 2'sinden *A. skirrowi* identifiye edildi. Araştırmada, sığır ve koyun kıymalarında *Arcobacter* spp.'nin prevalanslarının istatistiksel analizinde iki grup kıyma arasındaki farkın önemsiz olduğu belirlendi ($p>0,05$) (Tablo 4.2). Çalışmada kıyma numunelerinden elde edilen izolatların biyokimyasal test sonuçlarının (Tablo 4.1), uygulanan mPCR sonuçları ile uyumlu olduğu gözlemlendi (Resim 4.1,4.2).

Araştırma sonucunda, sığır ve koyun kıyma numunelerinden izole edilen *Arcobacter* türlerinin prevalansının (Şekil 4.2) yüksek olmasında, etkenlerin sağlıklı evcil hayvanların dışkısında bulunabilmesinin de etkili olduğu ifade edilebilir. Kesim sırasında ve kesim sonrasında yetersiz hijyen uygulamaları ile karkas dışkı ile kontaminasyona maruz kalabilir. Etkenin sağlıklı hayvanlardan izolasyonu için yapılan çalışmalarda Kabeya ve ark (2003b) 332 adet sığır dışkı örneğinin 12'sinden (%3,6), Van Driessche ve ark (2003) kesimhanelerden topladıkları sığır

dışkı örneklerinin % 39,2'sinden, koyun dışkı örneklerinin % 16,1'inden *Arcobacter* türlerini izole etmişlerdir.

Türkiye'de yapılan çalışmalarda ise Öngör ve ark (2004) 200 adet sığır dışkı örneğinin14'ünde (% 7) *Arcobacter* türlerini belirlerken, Aydın ve ark (2007) ise 173 adet sığır rektal sıvab örneğinin 12'sinden (% 6,9), *Arcobacter* spp. izole etmişler, inceledikleri 68 adet koyun dışkı örneğininde ise etkeni tespit edememişlerdir.

Koyun ve sığır kıyma numunelerinde *A. butzleri* dağılımındaki fark istatistiksel yönden önemsiz bulundu ($p>0,05$) (Şekil 4.2). Ancak, kıyma numunelerinde *A. skirrowi* ve *A. buztleri*' nin izolasyon sıklıkları oransal açıdan değerlendirildiğinde; *A. buztleri*'nin daha yoğun olarak izole edilmesi nedeni ile diğerlerinden belirgin bir farklılığa sahip olduğu belirtilmelidir (Tablo 4.3). Belirlenen bu farklılık istatistiksel olarak ta önemli bulunmuştur ($p<0,001$). *A. cryaerophilus* ise numunelerinin hiçbirinden izole edilememiştir (Şekil 4.1, 4.2).

Sığır ve koyun kıymaları kendi içlerinde *Arcobacter* türlerinin izolasyon oranları bakımından ayrı ayrı değerlendirildiğinde, her iki grup kıyma numunelerinde de *A. butzleri* ve *A. skirrowi* varlığı açısından istatistiksel fark önemli olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Tablo 4.2).

Çalışmada *A. skirrowi*'nin çok düşük miktarlarda *A. cryaerophilus*'un ise izole edilememesinin nedeni antimikrobiyal maddelerin düşük konsantrasyonlarına bile duyarlı olmaları ile açıklanabilir. Nitekim bu durum bir çok araştırmacı (Atabay ve Corry 1998, Atabay ve ark 1998, Houf ve ark 2001, Kabeya ve ark 2004, Ho ve ark 2006b) tarafından da ifade edilmiştir.

Ayrıca, *A. skirrowi*'nin kıyma numunelerindeki izolasyon oranının düşük olması, etkenin etlerdeki prevalansının düşük olmasıylada ifade edilebilir. Bu durum bazı araştırmacılar (Atabay ve ark 2003, Kabeya ve ark 2004, Gude ve ark 2005) tarafından da tespit edilmiştir. Kabeya ve ark (2004) *A. skirrowi*'nin düşük izolasyon sıklığını, ette bulunan diğer *Arcobacter* türleri tarafından kompetitif inhibisyona maruz kalmasına bağlamıştır.

Koyun kıymalarından izole edilen *A. skirrowi* oranı (% 4) sığır kıymalarındaki orana (% 2) göre yüzde olarak farklılık göstermesine karşın (Tablo 4.2) bu farklılık istatistiksel açıdan önemsiz bulundu (P>0,05).

Bu araştırmada, *A. skirrowi* türünün sadece bir satış noktasındaki sığır ve koyun kıymalarından izole edilmesinin nedeni, bazı araştırmacılar (Wesley ve ark 1997, 1999b, Golla ve ark 2002, Rivas ve ark 2004) tarafından belirtildiği gibi, gıda işletmesindeki hijyenik uygulama yetersizliklerine bağlı olarak ürünlerin çapraz kontaminasyona maruz kalması, hayvan sürüsünde etkenin endemik olarak bulunabilmesi, hayvanların temin edildiği çiftliklerin etken ile bulaşma ihtimali gibi bir ya da birkaç tane sebebe bağlı olarak meydana gelmiş olabilmesiyle açıklanabilir.

Besin işletmelerinde et ve et ürünleri tüketiciye ulaşana kadar buzdolabı sıcaklığında depolanmaktadır. Olumsuz depolama koşullarında, sığır ve koyun etlerinin birlikte muhafaza edildiği ortamlarda çapraz kontaminasyonlar gerçekleşebilir. Villarruel-Lopez ve ark (2003), sığır ve domuz etinin aynı ortamda, uygunsuz depolama koşullarında, birlikte bulundurulduklarında domuz ve sığır etleri arasında *Arcobacter* türlerinin çapraz kontaminasyon riskinin yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Bu durumlara ilave olarak mezbahanelerde, kesim işlemi sırası ve sonrasında hijyenik koşullara uyulmamasına bağlı olarak karkasın fekal kontaminasyona maruz kalmasının da karkasın *Arcobacter* türleri ile kontaminasyonunun bir nedeni olabileceğini de vurgulamak gerekmektedir (Wesley ve ark 2000, Golla ve ark 2002, Kabeya ve ark 2003a,b). Fakat bu çalışmada incelenen örneklerde *Arcobacter* türlerinin bulunma sıklığı üzerine, numunelerinin toplandığı et işletmelerinde ürün işleme sürecindeki hijyenik koşulların yetersiz olmasının da etkili olabileceğini ifade etmek doğru bir yaklaşım olacaktır.

Sığır, özellikle de koyun kıymalarından *Arcobacter* türlerinin izolasyon ve identifikasyonuna yönelik olarak dünyada ve Türkiye'de ve diğer ülkelerde gerçekleştirilmiş yeterli sayıda araştırma bilgisine rastlanılamamıştır. Çalışmalar daha ziyade kanatlı etleri, domuz etleri ve evcil hayvanların dışkıları ile kanatlıların sekum ve kloakal örneklerden etkenin izolasyon ve identifikasyonu üzerinde yoğunlaşmıştır.

Rivas ve ark (2004) tarafından Avusturya'da tavuk, dana, sığır ve domuz et örneklerinden *A. butzleri* izolasyonu ve karakterizasyonu amacı ile yapılan çalışmada araştırmacılar 88 et örneğinin % 35'inden *A. butzleri* izole etmişlerdir. Araştırmacılar, çoğunlukla kanatlı etlerinde (% 73) daha az sıklıkla domuz (% 29), sığır (% 22) ve kuzu etlerinde (% 15) *A. butzleri* saptamışlardır.

Rivas ve ark (2004) tarafından sığır ve koyun etlerinde kullanılan izolasyon ve identifikasyon prosedürü ile elde edilen bulgular, bu çalışmanın metot ve sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Araştırmacılar *Arcobacter* türlerinin izolasyonu amacı ile et numunelerini önce CAT saplementi içeren AZB'de inkübe ederek ön zenginleştirme işlemini takiben kanlı agar kullanarak *Arcobacter* türlerinin izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Daha sonra et örneklerinden *A. butzleri* identifiye etmek amacı ile kanlı agarda üreyen izolatlara mPCR reaksiyonu uygulamışlardır.

Villarruel-Lopez ve ark (2003) Meksika'da inceledikleri 45 adet sığır eti numunesinin % 28,8'inden *Arcobacter* türlerini izole etmişlerdir. Araştırmacılar etkenin izolasyonunda JM broth ve JM agar kullanmışlardır. Çalışmada elde edilen izolatlara uygulanan PCR reaksiyonu sonucunda izolatların % 80'i *A. butzleri*, % 4'ü ise *A. skirrowi* olarak identifiye edilirken, *A. cryaerophilus* identifiye edilememiştir. Araştırma sonucunda izole edilen *Arcobacter* türlerinin sığır etindeki prevalansının yüksek olması bu çalışma ile uyumludur.

Scullion ve ark (2006) Kuzey İrlanda'da 108 adet sığır etinin 37'sinde (% 34) *Arcobacter* türlerini tespit etmişlerdir. Araştırmada sığır eti numunelerinden elde edilen izolatlardan yapılan PCR sonucunda, 22'sinin (% 59,4) *A. butzleri*, 17'sinin (% 45,9) *A. cryaerophilus* ve 2'sinin (% 5,4) ise *A. skirrowi* olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar, *Arcobacter* türlerinin izolasyonu amacı ile modifiye JM broth ve JM agar kullanmıştır. Scullion ve ark (2006) tarafından yapılan araştırmada da sığır etlerinde üç *Arcobacter* türü de izole edilmiştir. İzole edilen türler arasında en yoğun olarak, bu çalışma ve diğer araştırmalarda da olduğu gibi *A. butzleri* bulunmuştur. Ayrıca araştırma sonucunda sığır etlerinde bulunan *Arcobacter* türlerinin prevalans bulguları, bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile uyum göstermektedir.

Japonya'da 1998-2001 yılları arasında Kabeya ve ark (2004), 90 adet sığır eti, 100 adet domuz eti ve 100 adet tavuk eti olmak üzere toplam 290 adet et numunesini *Arcobacter* türlerinin varlığı yönünden incelemişlerdir. Araştırmacılar, inceledikleri sığır eti numunesinin % 2,2'sinden *Arcobacter* izole etmişleridir. Elde edilen izolatlara uygulanan PCR reaksiyonu sonucunda, sığır etindeki izolatlardan sadece *A. butzleri* identifiye edilmiştir. Kabeya ve ark (2004) tarafından gerçekleştirilen araştırmada sığır etlerindeki *Arcobacter* türlerinin prevalansı bu çalışmada elde edilen sonuçlarından farklıdır. Bunun nedeni, çalışmada kullanılan izolasyon metodunlarındaki farklılığı ile açıklanabilir. Araştırmacılar, izolasyon amacı ile ASB, CIN agar ve % 5 defibrine at kanı içeren Skirrow agar kullanmışlardır. Ayrıca çalışmalardaki numune alma aralıklarının farklı olması sonuçların farklı olmasında etkili olabilir

Arcobacter türlerinin, kırmızı et ve et ürünlerinden izolasyonu amacı ile Türkiye'de yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Öngör ve ark (2004) tarafından yapılan bir çalışmada 97 adet sığır kıyma ve 200 adet sığır dışkı örneği *Arcobacter* türlerinin varlığı yönünden incelenmiştir. Araştırmacılar kıyma numunelerinden etkeni izole etmek amacı ile üç farklı izolasyon metodu uygulamışlardır. Araştırma sonucunda sığır kıyma numunelerinde uyguladıkları ikinci metotta etken izole edilemezken, birinci ve üçüncü metotta sığır kıyma numunelerinin 5'inden (%5), sığır dışkı numunelerinin ise 19'undan (% 9,5) *Arcobacter* türleri izole edilmiştir. Araştırmacılar tarafından yapılan mPCR sonucunda kıyma izolatlarının hepsinin *A. butzleri* olduğu tespit edilmiştir. Öngör ve ark (2004) izolasyon amacı ile kullandıkları birinci metotta kıyma numuneleri CAT saplementi içeren Brusella broth ve CAT saplement ve % 5 lize edilmiş at kanı içeren Muller-Hinton agar, ikinci metotta antibiyotik ve % 5 lize edilmiş at kanı içeren Brusella broth ve antibiyotik içeren Muller-Hinton agar, üçüncü metotta ise CAT saplemetli Brusella broth, % 5 defibrine koyun kanı içeren kanlı agar, 0.7 µm por büyüklüğünde selüloz asetat membran filtreler kullanılmıştır. Öngör ve ark (2004) tarafından yapılan araştırmada elde edilen veriler bu çalışmada sığır kıyma numunelerindeki verilere oranla oldukça düşüktür. Buna neden olarak, Öngör ve ark (2004)'nın inceledikleri etlerde *Arcobacter* türlerinin prevalansının düşük olma ihtimali gösterilebilir.

Bir çok araştırmacı (Atabay ve Corry 1997, Engeberg ve ark 2000, Atabay ve ark 2002) membran filtrasyon metodunun diğer izolasyon metotlarına göre daha üstün olduğunu belirtmişlerdir. Membran filtrasyon işleminde *Arcobacter* türleri haricinde istenilmeyen diğer bakteriler filtreyi geçememektedir (Atabay ve ark 2002). Yine *Arcobacter* türlerinin izolasyonu amacı ile kullanılan besiyerlerine ilave edilen CAT saplementi de diğer bakterilerin AZB'de üreme şansını azaltmaktadır (Gonzalez ve ark 2000).

Aydın ve ark (2007), Kayseri ilinde farklı satış noktalarından aldıkları kanatlı etlerinde, sığır kıyma numunelerinde, içme sularında ve sığır, koyun ve köpek rektal sıvabları ile kanatlı kloakal örneklerinde *Arcobacter* türlerinin prevalansını araştırmışlardır. Bu amaçla araştırmacılar CAT saplementli AZB, % 5'lik defibrine koyun kanı içeren kanlı agar kullanılarak membran filtrasyon tekniği ile *Arcobacter* şüpheli türleri izole etmişlerdir. Araştırmacılar çalışmaları sonucunda elde ettikleri izolatlara mPCR ve ERIC-PCR uygulayarak *Arcobacter* türlerini identifiye etmişlerdir.

Aydın ve ark (2007) inceledikleri toplam 806 numunenin 98'inden (% 12) *Arcobacter* türlerini izole etmişlerdir. Araştırmacılar, çalışmalarında 27 adet sığır kıyma numunesi kullanmış ve numunelerin 10'unda (% 37) *Arcobacter* türlerini izole etmişlerdir. İzolatlarla yapılan mPCR ve ERIC-PCR'la kıyma numunelerinin 9'unda (% 33,3) *A. butzleri*, 1'inde (% 3,7) ise *A. cryaerophilus* identifiye etmişlerdir. Bu çalışmada sığır kıyma numunelerinin % 40'ından *A. butzleri* identifiye edildi. Aydın ve ark (2007) tarafından sığır kıyma numunelerinden identifiye edilen *A. butzleri* miktarı (% 37) ile bu çalışmada elde edilen bulgular uyuşmaktadır. Araştırmacılardan farklı olarak bu çalışmada sığır kıyma numunelerinin % 2'sinden *A. skirrowi* identifiye edildi. Ancak *A. cryaerophilus*'a rastlanılamadı.

Bazı araştırmacılar (Scullion ve ark 2006, Rivas ve ark 2004, Kabeya ve ark 2004, Öngör ve ark 2004, Villarruel-Lopez ve ark 2003) tarafından yapılan çalışmalarda parça et numunesi kullanılmasına karşın bu çalışmada materyal olarak kıyma numunesi kullanılmıştır. Kıyma, parça etlere göre bozulmaya daha elverişlidir. Etin yüzeyinde normal olarak bulunan mikroorganizmalar, kıymanın

hazırlanmasında özellikle çekme ve karıştırma esnasında ürünün her tarafına dağılarak ve uygun koşullarda gelişerek ürünün bozulmasına neden olur. Dolayısı ile kıyma numunelerinde et numunelerine göre kontaminasyon riskinin daha fazla olduğu kabul edilmektedir. Bu çalışmada *Arcobacter* türlerinin prevalansının yüksek olması araştırmada kullanılan materyalin kıyma olmasına bağlanabilir. Aydın ve ark (2007) tarafından yapılan araştırmada bu düşünceyi desteklemektedir.

Bu çalışmada uygulanan mPCR tekniği ile her bir *Arcobacter* türü için spesifik primerler (ARCO, SKİR, BUTZ, CRY1 ve CRY2) kullanılarak tür düzeyinde identifikasyon yapıldı. Ayrıca çalışmada kullanılan bu teknik sayesinde, morfolojileri ve fenotipik özelliklerinin benzer olmasından dolayı *Campylobacter* türleri ile karışma ihtimali ortadan kaldırılmıştır. Bu sayede yanlış pozitif sonuç elde etme ihtimali en aza indirilmiştir.

Harmon ve Wesley (1997), kanatlı ve domuzlardan elde edilen izolatlardan *Arcobacter* türlerini identifiye etmek ve *A. butzleri*'yi diğer *Arcobacter* türlerinden ayırt etmek amacı ile mPCR tekniğini başarı ile kullanmışlardır.

Houf ve ark (2000), 37 adet kanatlı boyun derisi ve 14 adet kanatlı et örneklerinden *Arcobacter* türlerinin identifikasyonu amacı ile her bir *Arcobacter* türü için spesifik primerler (ARCO, SKİR, BUTZ, CRY1 ve CRY2) kullanarak mPCR tekniğini kullanmışlardır.

De Oliveira ve ark (2001) 80 adet kanatlı karkasından *Arcobacter* türlerinin identifikasyonu amacı ile mPCR tekniğinden yararlanmışlardır. Araştırmacılar kanatlı karkas örneklerinin 41'inden *A. butzleri*'yi izole etmişlerdir.

Yukarıda belirtilen bu çalışmalar sonucunda mPCR tekniğinin, geleneksel metotlara göre hızlı, spesifik ve yorumlanmasının daha kolay olduğu vurgulanabilir.

mPCR tekniği kullanılarak yapılan bu çalışmada, diğer araştırmalara (Atabay ve ark 2002, Villarruel-Lopez ve ark 2003, Kabeya ve ark 2004, Öngör ve ark 2004, Scullion ve ark 2006, Aydın ve ark 2007) paralel olarak kanatlı etleri ve diğer hayvansal ürünler yanında kıymalarda da *A. butzleri*'nin diğer türlere göre dominant olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, Kayseri ilinde satışa sunulan kıymaların *Arcobacter* türlerinden özellikle *A. butzleri* ve az sıklıkta *A. skirrowi* ile kontamine olduğu belirlendi. Bu

araştırma ile kıyma numunelerinin toplandığı satış noktalarının, Kayseri ilindeki et işletmelerinin ve kesimhanelerinin *A. butzleri* için önemli bir bulaşma kaynağı olduğu gerçeği vurgulanabilir. *Arcobacter* türlerinin özellikle *A. butzleri'*nin insanlarda enteritis, kronik diyare ve septisemi vakalarından izole edilmesi nedeni ile kıymalardaki *A. butzleri* oranı halk sağlığı açısından önemli bir risk faktörü olabileceği belirlendi. Ayrıca bu çalışma sonucunda mPCR tekniğinin, geleneksel metotlara göre hızlı, spesifik ve yorumlanmasının daha kolay olduğu vurgulanabilir

Besinlerin etken ile kontaminasyonunda, hammadde-pazarlama zincirinde çok sayıda bulaşma kaynağı olabilir. Bu nedenle etkenin bulaşma kaynaklarının belirlenmesi ve bu kaynakların ortadan kaldırılması, insanlarda hastalık vakalarının önlenmesi açısından oldukça önemlidir. Bu amaçla hayvanların kesim işleminden etlerin satışa sunulmasına kadar olan bütün aşamalarda hijyenik koşulların yerine getirilmesine dikkat edilmelidir.

Besinlerin güvenli üretimi ve pazarlanması hakkında personelin eğitilmesi besin kaynaklı hastalıkların önlenmesinde önemli bir faktördür. Kıyma hazırlanması esnasında direk et ile temas halinde olunduğu için kıymayı hazırlayan bireyin kişisel temizliği ve hijyenik kurallara uyması *Arcobacter* türleri ile kontaminasyonu önlemede oldukça önemlidir.

Ayrıca besin işletmelerinde kullanılan alet ve ekipmanlar, etkenin bulaşmasında önemli rol oynadığından bunların her gün düzenli olarak temizlenmesi ve dezenfekte edilmesi gerekmektedir.

Yine *Arcobacter* türleri için en önemli kontaminasyon kaynaklarından birisi olan kesimhanelerde hijyenik koşulların düzeltilmesi gerekmektedir. Ayrıca kesim esnasında karkasın, barsak içeriğinde bulunabilecek etken ile bulaşmasının önüne geçilmelidir. Hayvanların kesiminden sonra etlerin parçalanma ve işlenme sürecinde hijyenik koşulların mutlaka yerine getirilmesi sağlanmalıdır.

6. ÖZET

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Besin Hijyeni ve Teknolojisi (VET) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ/KONYA-2007

Sığır ve Koyun Kıymalarında *Arcobacter* Türlerinin Prevalansı ve Multipleks PCR Tekniği İle İdentifiye Edilmesi

Bu çalışmada, Kayseri ilinde tüketime sunulan koyun ve sığır kıymalarında *Arcobacter* türlerinin varlığı araştırılmıştır. Ayrıca çalışma sonucunda elde edilen izolatlardan multiplex Polimerase Chain Reaction (m PCR) tekniği ile tür düzeyinde identifikasyon gerçekleştirlmiştir.

Araştırmada, toplam 200 adet (100 adet sığır kıyma ve 100 adet koyun kıyma) kıyma numunesi incelenmiştir. Numuneler steril distile su ile homojenize edildikten sonra Arcobacter Zenginleştirme Besiyeri (AZB) içerisinde 30° C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda AZB'de üreyen şüpheli kültürler Membran Filtrasyon Tekniği kullanılarak kanlı agar üzerine inoküle edildi.

Çalışmada incelenen 200 kıyma numunesinin 85'inde *Arcobacter* spp. izole edildi. Elde edilen izolatlar uygulanan mPCR işlemi sonucunda 85 pozitif örneğin 79'unda (% 92,9) *A. butzleri,* 6'sı (% 7,1) *A.skirrowi* olarak tespit edildi. 100 adet sığır kıyma örneğinin 40'ı (% 40) *A. butzleri*, 2'si (% 2) *A. skirrowi* olarak identifiye edildi. Koyun kıyma örneğinin 39'u (% 39) *A. butzleri* olarak, 4'ü (% 4) *A. skirrowi* olarak identifiye edildi.

Sonuç olarak Kayseri ilinde satışa sunulan kıymaların *Arcobacter* türlerinden özellikle *A. butzleri* ve az sıklıkta *A. skirrowi* ile kontamine olduğu belirlenmiştir. *Arcobacter* türlerinin insanlarda hastalık yapmaları özellikle *A. butzleri'*nin insanlarda enteritis, kronik diyare ve septisemi vakalarından izole edilmesi nedeni ile kıymalardaki *A. butzleri* oranı halk sağlığı açısından önemli bir risk faktörü olabileceği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler : Kıyma, *Arcobacter* spp., izolasyon, identifikasyon, mPCR

7. SUMMARY

Selcuk University, institute of Health Sciences

Food Hygiene and Technology Department

DISSERTATION / KONYA - 2007

Prevalance and Identification of *Arcobacter* Species in Ground Meat from Cattle and Sheep by Multiplex PCR Techniques

In this study, presence of *Arcobacter* species in ground meat from cattle and sheep in Kayseri province (Turkey) were investigated. Identification of *Arcobacter* species in isolates of ground meat from cattle and sheep using multiplex PCR (mPCR) techniques were carried out.

A total of 200 samples (100 cattle ground meat and 100 sheep ground meat) were examined. The samples were homogenized with distilled water and incubated in Arcobacter Enrichment Media (AZB) at 30 ^{o}C for 48 hours. After the incubation in AZB, grown suspected cultures were inoculated into agar using membrane Filtration Techniques.

Eighty-five out of 200 meat samples were isolated *Arcobacter* spp. positive. Of these positive samples, 79 (92.9%) *A. butzleri* and 6 (7.1%) *A. skirrow* were detected. Forty out of 100 cattle meat ground were identified with *A. butzleri* (40%) and only 2 (2%) with *A. skirrow*, whereas 39 (39%) with *A. butzleri* and 4 (4%) with *A. skirrow* in ground sheep meat samples.

In conclusion, marketed ground meat samples in Kayseri province were contaminated with *Arcobacter*, particularly very often with *A. butzleri* but less often with *A. skirrowi*. It was also concluded that *Arcobacter* species particularly *A. butzleri* may have a risk factor for human health with the fact that *A. butzleri* causes enteritis, chronic diarrhea, and septicemia in humans.

Key Words: Ground meat, *Arcobacter* spp., isolation, identification, mPCR

8. KAYNAKLAR

Abdelbaqi K, Ménard A, Prouzet-Mauleon V, Bringaud F, Lehours P, Mégraud F (2007) *Nucleotide sequence of the gyrA gene of Arcobacter species and characterization of human ciprofloxacin-resistant clinical isolates,* FEMS Immunol Med Microbiol, 49(3), 337-45.

Andersen MME, Wesley IV, Nestor E, Trampel DW (2006) *Prevalence of Arcobacter species in market-weight commercial turkeys,* Antonie van Leeuwenhoek, 9153-9157.

Anderson KF, Kiehlbauch A, Anderson DC, McClure HM, Wachsmuth IK (1993) *Arcobacter (Campylobacter) butzleri-associated diarrheal illness in nonhuman primate population,* Infection and Immunity, 61(5), 2220-2223.

Antolin A, Gonzalez I, Garcia T, Hernandez PE, Martin R (2001) *Arcobacter spp. enumeration in poultry meat using a combined PCR-ELISA assay,* Meat Sci, 59, 169-174.

Atabay HI, Corry JEL (1997) *The prevalence of campylobacters and arcobacters in broiler chickens,* J Appl Microbiol, 83(5), 619-626.

Atabay HI, Corry JEL (1998) *Evaluation of a new arcobacter enrichment medium and comparison with two media developed for enrichment of Campylobacter* spp*,* Int J Food Microbiol, 41, 53-58.

Atabay HI, Corry JEL On SLW (1998) *Diversity and prevalence of Arcobacter spp. in broiler chickens*, J Appl Microbiol, 84, 1007-1016.

Atabay HI, Aydin F, Helps C, Şahin M(2001) *Identification of Arcobacter isolates using 16S rDNA restriction endonuclease analysis of PCR products (ARDRA),* Vet Hek Mikrobiol Derg, 1(1), 70-77.

Atabay HI, Aydin F (2001) *Susceptibility of Arcobacter butzleri isolates to 23 antimicrobial agents,* Lett in Appl Microbiol, 33, 430-433.

Atabay HI, Bang DD, Aydin F, Erdogan HM, Madsen M(2002) *Discrimination of Arcobacter butzleri isolates by polymerase chain reaction mediated DNA fingerpriting*, Lett Appl Microbiol, 35, 141-145.

Atabay HI, Aydin F, Houf K, Şahin M, Vandamme P (2003) *The prevalance of Arcobacter spp. on chicken carcases sold in retail markets in Turkey, and identification of the isolates using SDS-PAGE,* Int J Food Microiol, 81, 21-28.

Atabay HI, Wainø M, Madsen M (2006) *Detection and diversity of various Arcobacter species in Danish poultry,* International J Food Microbiol, 109, 139-145.

Aydin F, Atabay Hİ(2001) *Arcobacter türleri: Sınıflandırma, genel özellikler, izolasyon ve identifikasyon metotları,* Vet Hek Mikrobiol Derg, 2(1) 71-76.

Aydin F, Gumussoy KS, Atabay HI, Iça T, Abay S (2007) *Prevalence and distribution of Arcobacter species in various sources in Turkey and moleculer analysis of isolated strains by ERIC-PCR,* J Appl Microbiol, 103, 27-35.

Bilgehan H (2002) *Klinik Mikrobiyolojik Tanı,* 67-680 Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, İzmir 1995.

Birben E (2006) *Polimeraz Zincir Reaksiyonu,* Astım Allerji İmmünoloji 4(2), 92-94.

Boudreau M, Higgins R, and Mittal KR (1991) *Biochemical and Serological Characterization of Campylobacter cryaerophila,* J Clin Microbiol, 29 (1), 54-58.

Brightwell G, Mowat E, Clemens R, Boerema J, Pulford DJ, Stephen LO (2007) *Development of a multiplex and real time PCR assay for the specific detection of Arcobacter butzleri and Arcobacter cryaerophilus,* J Microbiol Methods, 68, 318-325.

Burnens A P and Nicolet J (1993) *Three supplementary diagnostic tests for Campylobacter species and related organisms,* J Clin Microbiol, 31(3): 708-710.

Carbone M, Maugeri T L, Giannone M, Gugliandolo C, Midiri A, Fera MT (2003) *Adherence of environmental Arcobacter butzleri and Vibrio* spp. *isolates to epithelial cells in vitro,* Food Microbiol, 20(5), 611-616.

Cervenka L, Peskova I, Foltynova E, Pejchalova M, Brozkova I, Vytrasova J (2006) *Inhibitory effects of some spice and herb extracts against Arcobacter butzleri, A. cryaerophilus, and A. skirrowii,* Curr-Microbiol, 53(5), 435-9.

Chinivasagam HN, Corney BG, Wright LL, Diallo IS, Blackall PJ (2007) *Detection of Arcobacter spp. in piggery effluent and effluent-irrigated soils in southeast Queensland,* J Appl Microbiol,103(2), 418-26.

Corry JEL, Atabay HI (1997) *Comparasion of the productivity of cefoperazone amphotericin teicoplanin (CAT) agar and modified charcoal cefoperazone*

deoxycholate (mCCD) agar for various strains of Campylobacter, Arcobacter and Helicobacter pullorum, Int J Food Microbiol, 38, 201-209.

Corry JEL, Atabay HI (2001) *Poultry as a source of Campylobacter and related organisms,* J Appl Microbiol, 90, 96-114.

Çelik S (2000) *Arcobacter*, Seminer, Ankara Üniv Sağ Bil Enst Mikrobiyoloji ABD, Ankara, 1-19.

Darka Ö, Yılmaz YA (2004) *Tavuk eti ve Campylobacteriosis*, Hacettepe Tıp Derg, 35, 100-102.

Diker S (1997) *Gram negatif mikroaerofilik hareketli bakteriler*. Alınmıştır "Özel Mikrobiyoloji" Edt. Arda M, Minbay A, Leloğlu M, Aydın N, Kahraman M, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür M, Diker KS, 137-139, Medisan yayınları Ankara.

De Oliveira JS, Baetz AL, Wesley IV, Harmon KM (1997) *Classification of Arcobacter species isolated from aborted pig fetuses and sows with reproductive problems in Brazil,* Vet Microbiol, 57, 347-35.

De Oliveria SJ, Wesley IV, Baetz AL, Harmon KM, Kader IITA, de Uzeda M (1999) *Arcobacter cryaerophilus and Arcobacter butzleri isolated from preputial fluid of boars and fattening pigs in Brazil*, J Vet Diagn Invest 11, 462–464.

De Oliveira JS, Moraes HLS, Kuchenbecker BS, Ikuta N, Lunge V, Fonseca A, Coiro JR (2001) *Isolation of Arcobacter spp. from poultry carcases in Brazil*, Ciencia Rural, Santa Maria 31 (4), 639-643.

D'sa EM, Harrison M A (2005) *Effect of pH, NaCl Content, and Temperature on growth and survival of Arcobacter* spp*.,* J Food Protect 68 (1),18-25.

Donachie SP, Bowman JP, On SLW, Alam M (2005) *Arcobacter halophilus spp. nov., the first obligate halophile in the genus Arcobacter,* Int J Syst Evol Microbiol, 55, 1271-1277.

Engberg J, On SLW, Harrington CS, Gerner- Smidt P (2000) *Prevalence of campylobacter, Arcobacter, Helicobacter, and Sutterella spp. in human fecal samples as estimated by a reevaluation of ısolation methods for campylobacters,* J Clin Microbiol, 38(1), 286-291.

Eifert JD, Castle RM, Pierson FW, Larsen CT, Hackney CR (2003) *Comparison of sampling techniques for detection of Arcobacter butzleri from chickens.* Poult Sci, 82 (12), 1898-1902.

Fera MT, Maugeri TL, Giannone M, Gugliandolo C, La Camera E, Blandino G, Carbone M (2003) *In vitro susceptibility of Arcobacter butzleri and Arcobacter cryaerophilus to different antimicrobial agents*, Int J Antimicrobial Agent, 21, 488-491.

Fera MT, Maugeri TL, Gugliandolo C, Beninati C, Giannone M, La Camera E, Carbone M (2004) *Detection of Arcobacter spp. in the coastal environment of the Mediterranean Sea,* Appl and Environ Microbiol,70(3), 1271-1276.

Fisher K, Rowe C, Phillips CA (2007) *The survival of three strains of Arcobacter butzleri in the presence of lemon, orange and bergamot essential oils and their components in vitro and on food,* Lett Appl Microbiol 44(5), 495-499.

Forbes BA, Sahm DF, Weisssfeld AS (2002) *Campylobacter, Arcobacter and Helicobacter* In **"**Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology" , 476-481.

Gonzalez I, Antolin GA, Hernandez PE, Martin R (2000) *Development of a combined PCR-culture technique for the rapid detection of Arcobacter spp. in chicken meat,* Lett Appl Microbiol, 30 (3), 207-212.

Gude A, Hillman TJ, Helps CR, Allen VM, Corry JEL (2005) *Ecology of Arcobacter species in chicken rearing and processing,* Lett Appl Microbiol. 41, 82-87.

Hansen F, Olsen KEP (2007) *Arcobacter – an emerging food borne pathogen?.* NMKL Technical Report, 1-10.

Harmon KM, Wesley IV (1997) *Multiplex PCR for the identification of Arcobacter and differentiation of Arcobacter butzleri from other Arcobacters,* Vet Microbiol, 58, 215-227.

Higgins R, Messier S, Daignault D, lorange M (1999) *Arcobacter butzleri isolated from a diarrhoeic non-human primate,* Laboratory Animals (1999) 33, 87-90.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992) *Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequence*s, Biotechnol (N Y), 10,413-7.

Hill JE, Paccagnella A, Law K, Melito PL, Woodward DL, Price L, Leung AH, Ng L-K, Hemmingsen SM, Goh SH (2006) *Identification of Campylobacter spp. and discrimination from Helicobacter and Arcobacter spp. by direct sequencing of PCR-amplified cpn60 sequences and comparison to cpnDB, a chaperonin reference sequence database,* J Med Microbiol 55, 393-399.

Hilton CL, Mackey BM, Hargreaves AJ, Forsythe SJ (2001) *The recovery of Arcobacter butzleri NCTC 12481 from various temperature treatments*, J Appl Microbiol, 91, 929–932.

Ho TKH, Lipman LJA, van der Graaf-van Bloois L, van Bergen M, Gaastra W (2006a) *Potential routes of acquisition of Arcobacter species by piglets,* Vet Microbiol, 114, 123-133.

Ho TKH, Lipman LJA, Gaastra W (2006b) *Arcobacter, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent,* Vet Microbiol, 115, 1-13.

Ho TKH, Lipman LJA, Hendriks HGCJM, Tooten, PCJUltee T, Gaastra W (2007) *Interaction of Arcobacter spp. with human and porcine intestinal epithelial cells,* FEMS Immunol & Med Microbiol 50, 51-58.

Houf K, Tutenel A, de Zutter L, Hoof JV, Vandamme P (2000) *Devolopment of a multiplex PCR assay for smultaneous detection and identification of Arcobacter butzleri, Arcobacter cryaerophilus and Arcobacter skirrowii,* FEMS Microbiol Lett, 193, 89-94.

Houf K, Devriese LA, de Zutter L, Hoof JV, Vandamme P (2001a) *Devolopment of a new protocol for the isolation and quantification of Arcobacter species from poultry products*, Int J Food Microbiol, 71, 189-196.

Houf K, Devriese LA, de Zutter L, Hoof JV, Vandamme P (2001b) *Susceptibility of Arcobacter butzleri, Arcobacter cryaerophilus and Arcobacter skirrowii to antimicrobial agents used in selective media,* J Clin Microbiol, 39 (4), 1654-1656.

Houf K, de Zutter L, Hoof JV, Vandamme P (2002a) *Occurrence and distribution of Arcobacter species in poultry processing,* J Food Protect, 65(8), 1233-1239.

Houf K, de Zutter L, Hoof JV, Vandamme P (2002b) *Assesment of the genetic diversity among Arcobacter isolated from poultry products by using two PCR- Based typing methods,* Appl Environ Microbiol, 68 (5), 2172-2178.

Houf K, On SLW, Coenye T, Mast J, Hoof JV, Vandamme P (2005) *Arcobacter cibarius sp. nov., isolated from broiler carcasses,* Int J Syst Evol Microbiol, 55, 713–717.

Houf K, Stephan R (2007) *Isolation and characterization of the emerging food born pathogen Arcobacter from human stool*, J Microbiol Methods, 68, 408–413

Hsueh PR, Teng LJ, Yang PC, Wang SK, Chang SC, Ho SW, Hsieh WC, Luh KT (1997) *Bacteremia caused by Arcobacter cryaerophilus 1B,* J Clin Microbiol, 35 (2), 489-491.

Hume ME, Harvey RB, Stanker LH, Droleskey RE, Poole TL, Zhang H-B (2001) *Genotypic variation among Arcobacter isolates from a farrow-to-finishs swine Facility,* J Food Protect, 64(5), 645-651.

Hurtado A, Owen RJ (1997) *A molecular scheme based on 23S rRNA gene polymorphisms for rapid identification of Campylobacter and Arcobacter species,* J Clin Microbiol, 35 (9), 2401-2404.

Hügler M, Wirsen CO, Fuchs G, Taylor CD, Sievert SM (2001) *Evidence for autotrophic CO2 fixation via the reductive tricarboxylic acid cycle by members of the epsilon subdivision of proteobacteria,* J Bacteriol, 187(9), 3020-3027

Jelinek D, Miketova P, Khailova L, Schram KH, Moore IM, Vytrasova J (2006) *Identification of Arcobacter species using phospholipid and total fatty acid profiles,* Folia Microbial, 51 (4), 329-336

Kabeya H, Maruyama S, Morita Y, Kubo M, Yamamoto K, Arai S, Izumi T, Kobayashi Y, Abe M, Katsube Y, Mikami T (2003a) *Distribution of Arcobacter species among livestock in Japan*, Vet Microbiol, 93, 153-158.

Kabeya H, Kobayashi Y, Maruyama S, Mikami T (2003b) *One-step polymerase chain reaction-based typing of Arcobacter species*, Int J Food Microbiol, 81, 163-168.

Kabeya H, Maruyama S, Morita Y, Ohsuga T, Ozawa S, Kobayashi Y, Abe M, Katsube Y, Mikami T (2004) *Prevalence of Arcobacter species in retail meats and antimicrobial susceptibilitiy of the isolatesin Japan,* Int J Food Microbiol, 90, 303-308.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn CW (1997) *Curved gram negative bacilli and oxidase-positive fermenters: Campylobactereae and*

Vibrionaceae In "Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology" 243-260, 332-333, Lippincott Press, New York.

Lau SKP, Woo PCY, Teng JLL, Leung KW, Yuen K Y (2002) *Identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of Arcobacter butzleri bacteraemia in a patient with acute gangrenous appendicitis,* Mol Pathol, 55, 182-185.

Lee YL, Cesario T, Owens J, Shanbrom E, Thrupp LD (2002) *Antibacterial activity of citrate and acetate,* Nutrition, 18(7-8), 665-666.

Lehner A, Tasara T, Stephan R (2005) *Relevant aspects of Arcobacter spp. as potential foodborne pathogen,* Int J Food Microbiol, 102(2), 127-135.

Long C, Phillips CA (2003) *The effect of sodium citrate, sodium lactate and nisin on the survival of Arcobacter butzleri NCTC 12481 on chicken*, Food Microbiol, 20, 495-502.

Mansfield LM, Forsyth SJ (2000) *Arcobacter butzleri, A. skirrowi ve A. cryaerophilus-potential emerging human pathogens*, Rew Med Microbiol 11(3), 161-170.

Marshall SM, Melıto PL, Woodward DL, Johnson WM, Rodgers FG, Mulvey MR (1999) *Rapid identification of Campylobacter, Arcobacter, and Helicobacteri isolates by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of the 16S rRNA gene,* J Clin Mıcrobıol, 37(12), 4158–4160.

Mauléon VP, Labadi L, Bouges N, Ménard A, Mégraud F (2006) *Arcobacter butzleri: underestimated enteropathogen,* Emerg Infect Dis, 12 (2), 307-309.

Maugeri TL, Carbone M, Fera MT, Irrera GP, Gugliandolo C (2004) *Distribution of potentially pathogenic bacteria as free living and plankton associated in a marine coastal zone,* J Appl Microbiol, 97, 354–361.

Moreno Y, Botella S, Alonso JL, , Ferru's MA, Herna'ndez M, Herna'ndez J (2003) *Specific Detection of Arcobacter and Campylobacter srains in water and sewage by PCR and fluorescent in situ hybridization,* Appl Environ Microbiol, 69(2),1181–1186.

Moreno Y, Alonso JL, Botella S, Ferrus MA, Hernandez J (2004) *Survival and injury of Arcobacter after artificial inoculation into drinking water,* Research in Microbiol,155, 726-730.

Morita Y, Maruyama S, Kabeya H, Boonmar S, Nimsuphan B, Nagai A, Kozawa K, Nakajima T, Mikami T, Kimura H (2004) *Isolation and phylogenetic analysis of Arcobacter spp. in ground chicken meat and environmental water in Japan and Thailand,* Microbiol Immunol 48 (7), 527-533.

Nachamkin I (2000) *Campylobacter* and *Arcobacter*, In "Manual of Clinical Microbiology" Ed. by Murray PR, Baron EJ, Pfaller MC, Tenover FE, Yolken RH, 716-722, ASM Press, Washington.

Neubauer C and Hess M (2006) *Detection and identification of food-borne pathogens of the genera Campylobacter, Arcobacter and Helicobacter by multiplex PCR in poultry and poultry products,* J Vet Med B 53, 376–381.

On SLW (2001) *Taxonomy of Campylobacter, Arcobacter, Helicobacter and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns,* J Appl Microbiol, 90, 1-15.

On SLW, Jensen TK, Hansen VB, Jorsal SE, Vandamme P(2002) *Prevalence and diversity of Arcobacter spp. isolated from the internal organs of spontaneous porcine abortions in Denmark,* Vet Microbiol, 85, 159-167.

On SLW, Harrington CS, Atabay HI (2003) *Differentiation of Arcobacter species by numerical analysis of AFLP profiles and description of a novel Arcobacter from pig abortions and turkey faeces,* J Appl Microbiol, 95, 1096–1105.

On SLW, Atabay HI, Amisu KO, Coker AO, Harrington CS (2004) *Genotyping and genetic diversity of Arcobacter butzleri by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis*, Lett Appl Microbiol, 39, 347–352.

Otth I, Wilson M, Cancina R, Fernandez H (2004) *In vitro susceptibility of Arcobacter butzleri to six antimicrobial drugs,* Arch Med Vet 2, 207-210.

Öngör H, Cetinkaya B, Acik MN, Atabay HI (2004) *Investigation of arcobacters in meat and faecal samples of clinically healthy cattle in Turkey,* Lett Appl Microbiol, 38, 339–344.

Özdamar K (2001) *SPSS ile Biyoistatistik*, 343-360, Kaan Kitabevi, Eskişehir.

Percival S, Chalmers R, Embrey M, Hunter P, Sellwood J, Jones PW (2004) *Arcobacter,* Microbiol Waterborne Dis, 43-48.

Phillips CA (2001a) *Arcobacter as emerging human foodborne pathogens*, Food Control, 12, 1-6.

Phillips CA (2001b) *Arcobacter spp. in food: isolation, identification and control*, Trends in Food Sci & Technol, 12, 263-275.

Phillips CA, Duggan J (2001) *The effect of EDTA and trisodium phosphate, alone and in combination with nisin, on the growth of Arcobacter butzleri in culture,* Food Microbiol,18, 547-554.

Phillips CA, Duggan J (2002) *The effect of temperature and citric acid, alone, and in combination with nisin, on the growth of Arcobacter butzleri in culture*, Food Control,13, 463-468.

Pianta C, Passos DT, Hepp D, de Oliveira SJ (2007) *Isolation of Arcobacter spp from the milk dairy cows in Brazil,* Ciencia Rural, Santa Maria 37 (1), 171-174.

Rashid ST, Dakuna I, Louie H, Ng D, Vandamme P, Johnson W, Chan VL (2000) *Identification of Campylobacter jejuni, C. coli, C. lari, C. upsaliensis, Arcobacter butzleri, and A. butzleri-Like Species Based on the glyA Gene,* J Clin Mıcrobıol, 38(4),1488–1494.

Rice EW, Rodgers MR, Wesley IV, Johnson CH, Tanner SA (1999) *Isolation of Arcobacter butzleri from ground water,* Lett Appl Microbiol, 28, 31-35.

Ridsdale JA, Atabay HI, Corry JEL (1998) *Prevalence of Campylobacters and Arcobacters in ducks at the abbattoir,* J Appl Microbiol 85, 567-573.

Ridsdale JA, Atabay HI, Corry JEL (1999) *Campylobacter and Arcobacter spp. isolated from the carcasses and caeca of commercially reared duck*, Anaerobe, 5, 317-320.

Rivas L, Fegan N, Vanderline P (2004) *Isolation and characterisation of Arcobacter butzleri from meat,* Int J Food Microbiol, 91, 31-44.

Romero J, Varela MG, Laclette JP, Espejo1 RT (2002) *Bacterial 16S rRNA gene analysis revealed that bacteria related to Arcobacter spp. constitute an abundant and common component of the Oyster Microbiota (Tiostrea chilensis),* Microb Ecol, 44, 365–371.

Samie A, Obi CL, Barrett LJ, Powell SM, Guerrant RL (2007) *Prevalence of Campylobacter species, Helicobacter pylori and Arcobacter species in stool samples*

from the Venda region, Limpopo, South Africa:Studies using moleculer diagnostic method, J Infect, 54, 558-566.

Savaşan S, Çiftçi A (2003) *Arcobacter türleri: Genel özellikler ve sınıflandırma,* Orlab On-Line Mikrobiol Derg, 2(1), 37-48.

Scullion R, Harrington CS, Madden RH (2004) *A comparison of three methods for the isolation of Arcobacter spp. from retail raw poultry in Northern Ireland,* J Food Protect, 67(4), 799–804.

Scullion R, Harrington CS, Madden RH (2006) *Prevalence of Arcobacter spp. in raw milk and retail raw meats in Northern Ireland,* J Food Protect, 69(8), 1986–1990.

Sievert SM, Wieringa EBA, Wirsen CO, Taylor CD (2006) *Growth and mechanism of filamentous-sulfur formation by Candidatus Arcobacter sulfidicus in opposing oxygen-sulfide gradients,* Appl Environ Microbiol, 9, 81-92.

Snelling WL, Matsuda M, Moore JE, Dooley JSG (2006) *Under the microscope: Arcobacter,* Lett Appl Microbiol, 42, 7-14.

Son I, Englen MD, Berrang ME, Cray PJF, Harrison MA (200a) *Prevalence of Arcobacter and Campylobacter on broiler carcasses during processing,* Int J Food Microbiol, 113, 16-22.

Son I, Englen MD, Berrang ME, Cray PJF, Harrison MA (2007b) *Antimicrobial resistance of Arcobacter and Campylobacter from broiler carcasses,* Int J Antimicrob Agents, 29, 451-455.

Stoeva K, Ward FB (2006) *Genome mapping of Arcobacter butzleri,* FEMS Microbiol Lett, 256, 290–297.

Suarez DL, Wesley IV, Larson DV (1997) Detection *of Arcobacter species in gastric samples from swine*, Vet Microbiol, 57, 325-336.

Vandamme P, **Pugina P**, **Benzi G**, **Van Etterijck R**, **Vlaes L**, **Kersters K**, **Butzler JP**, **Lior H**, **Lauwers S (1992)** *Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with Arcobacter butzleri in an Italian school*, J Clin Microbiol, 30(9), 2335-2337.

Vandamme P, Giesendorf BA, van Belkum A, Pierard D, Lauwers S, Kersters K, Butzler JP, Goossens H and Quint WG (1993) *Discrimination of epidemic and sporadic isolates of Arcobacter butzleri by polymerase chain reaction-mediated DNA fingerprinting,* J Clin Microbiol, 31(12), 3317-3319.

Vandenberg O, Dediste A, Houf K, Ibekwem S, Souayah H, Cadranel S, Douat N, Zissis G, Butzler JP, and Vandamme P (2004) *Arcobacter species in human.* Emerg Infect Dis, 10(10), 1863-1867.

Vandenberg O, Houf K, Douat N, Vlaes L, Retore P, Butzler JP, and Dediste A (2006) *Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of non-jejuni/coli campylobacters and arcobacters from Belgium,* J Antimicrob Chemother, 57, 908-913.

Van Driessche E, Houf K, Hoof JV, De Zutter L, Vandamme P, (2003) *Isolation of Arcobacter species from animal feces,* FEMS Microbiol Lett, 229, 243-248.

Van Driessche E, Houf K, Vangroenweghe F, Nollet N, De Zutter L, Vandamme P, Hoof JV (2004) *Occurence and strain diversity of Arcobacter species isolated from healthy Belgian pigs*, Research in Microbiol, 155, 662-666.

Van Driessche E, Houf K, Vangroenweghe F, Nollet N, De Zutter L, Hoof JV (2005) *Prevalence, enumeration and strain variation of Arcobacter species in the faeces of healthy cattle in Belgium,* Vet Microbiol, 105,149-154.

Van Driessche E, Houf K (2007) *Characterization of the Arcobacter contamination on Belgian pork carcasses and raw retail pork,* International J Food Microbiol,118 (1), 20-26.

Villarruel-Lopez A, Marquez-Gonzales M, Garay-Martinez LE, Zepeda H, Castillo A, Mota de la Garza L, Murano EA, and Torres-Vitela R (2003) *Isolation of Arcobacter spp. from retail meats and cytotoxic effects of isolates against Vero cells*, J Food Protect, 66, 1374–1378.

Wesley IV, Schroeder-Tucker L, Baetz AL, Dewhirst FE and Paster BJ (1995) *Arcobacter-specific and Arcobacter butzleri-specific 16S rRNA-based DNA probes,* J Clin Microbiol, 33(7)1691-1698.

Wesley IV, Baetz AL, and Larson DJ (1996) *Infection of cesarean-derived colostrum-deprived 1-day-old piglets with Arcobacter butzleri, Arcobacter cryaerophilus, and Arcobacter skirrowii,* Infect Immun, 64(6), 2295–2299.

Wesley IV(1997) *Helicobacter and Arcobacter: Potential human foodborne pathogens,* Trends in Food Sci & Technol, 8, 293-298.

Wesley IV(1999) *Arcobacter* In "Encyclopedia of Food Microbiology" Ed. by Robinson RK, Batt CA and Pradip D, 50-54, Patel Academic Press, USA.

Wesley IV, Baetz AL (1999) *Natural and experimental infections of Arcobacter in poultry,* Poult Sci, 4, 536-545.

Wesley IV, Wells SJ, Harmon KM, Green A, Schroeder-Tucker L, Glover M and Siddique I (2000) *Fecal shedding of Campylobacter and Arcobacter spp. in dairy cattle,* Appl Environ Microbiol, 66,1994–2000.

Winters DK, Slavik MF (2000) *Multiplex PCR detection of Campylobacter jejuni and Arcobacter butzleri in food products,* Mol Cell Probes, 14 (2), 95-99.

Wirsen CO, Sievert SM, Cavanaugh CM, Molyneaux SJ, Ahmad A, Taylor LT, DeLong EF, and Taylor CD (2002) *Characterization of an autotrophic sulfide-oxidizing marine Arcobacter spp. that produces filamentous sulfur,* Appl Environ Microbiol, 68(1), 316-325.

Woo PCY, Chong KTK, Leung K, Que T, Yuen K (2001) *Identification of Arcobacter cryaerofilus isolated from a traffic accident victim with bactermia by 16s ribosomal RNA gene sequencing*, Diag Microbiol and Infect,40, 125-127.

Wybo I, Breynaert J, Lauwers S, Lindenburg F, Houf K (2004) *Isolation of Arcobacter skirrowii from a patient with chronic diarrhea,* J Clin Microbiol, 42(4), 1851-1852.

9. ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Kayseri'de doğdu. İlköğrenimini Kayseri Fatih İlkokulunda, orta öğrenimini Kayseri 60. Yıl İlköğretim Okulu'nda tamamladı. 1995 yılında Kayseri Sümer Lisesi'nden mezun oldu. Aynı yıl içinde Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesine giriş yaptı ve 2000 yılında mezun oldu. 2003 yılında Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Ana Bilim Dalında Doktora eğitimine başladı

10. TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında değerli bilgi, öneri ve eleştirileri ile çalışmalarıma yön veren, her konuda destek olan, büyük ilgi yardımlarından dolayı değerli hocalarım Doç. Dr. Zafer GÖNÜLALAN'a ve Doç. Dr. Ahmet GÜNER'e tezimin labaratuvar aşamasındaki yardımlarından dolayı çok sevgili arkadaşım Araş. Gör. Seçil ABAY'a, tezimin moleküler analiz aşamasındaki yardımlarından dolayı sevgili hocam Yard. Doç. Dr. Tuba İÇA'ya, tezimin yazım aşamasında her türlü destek ve yardımlarından ötürü sevgili arkadaşım Yard. Doç. Dr. Ali Cesur ONMAZ'a ayrıca istatistiksel değerlendirmede fikir ve bilgilerini paylaştığı için değerli hocam Yard. Doç. Dr. Alparslan YILDIRIM'a ve en başından beri tez çalışmamın her aşamasında bana maddi ve manevi her türlü desteği veren aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.