



Anadolu Mandası Dışkılarından İzole Edilen Termofilik *Campylobacter* Türlerinin Moleküler Karakterizasyonu

Timur GÜLHAN * Merve Gizem SEZENER Serhan AKGÖZ
Volkan Enes ERGÜDEN Arzu FINDIK Alper ÇİFTÇİ
Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye

Geliş/Received: 12.02.2000

Kabul/Accepted: 11.03.2020

Atıf yapmak için: Gülhan, T., Sezener, M.G., Akgöz, S., Ergüden, V.E., Arzu Fındık, A. & Çiftçi, A. (2020). Anadolu mandası dışkılarından izole edilen termofilik *Campylobacter* türlerinin moleküler karakterizasyonu. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 5(1), 86-92.

How to cite: Gülhan, T., Sezener, M.G., Akgöz, S., Ergüden, V.E., Arzu Fındık, A. & Çiftçi, A. (2020). Molecular characterization of thermophilic *Campylobacter* species isolated from Anatolian buffalo feces. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(1), 86-92.

*ID: <https://orcid.org/0000-0003-4798-1427>
ID: <https://orcid.org/0000-0003-0487-7515>
ID: <https://orcid.org/0000-0002-5130-7120>
ID: <https://orcid.org/0000-0003-2215-2868>
ID: <https://orcid.org/0000-0002-9123-6160>
ID: <https://orcid.org/0000-0001-8370-8677>

***Sorumlu yazarın:**

Prof. Dr. Timur GÜLHAN
Ondokuz Mayıs Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
55220 Atakum, Samsun, Türkiye
✉: timur.gulhan@omu.edu.tr
Cep telefonu : +90 (544) 4463329
Telefon : +90 (362) 312 19 19-1449
Faks : +90 (362) 457 69 22

Öz: Mandaların diğer hayvanlarda olduğu gibi bazı hastalıkların duyarlı hayvan popülasyonlarına ve insanlara bulaştırılmasında rol oynadıkları ortaya konulmuştur. Bu çalışmada Amasya ili ve ilçelerinde yetiştiriciliği yapılmakta olan Anadolu Mandalarından toplanan 140 dışkı örneği termofilik *Campylobacter* türleri açısından incelendi. Dışkı örneklerinden termofilik *Campylobacter* türlerinin izolasyonu amacıyla standart selektif zenginleştirme tekniği kullanıldı. *Campylobacter* şüpheli izolatların cins ve tür düzeyinde identifikasyonları PCR ile yapıldı. 140 dışkı örneğinden 13 (% 9,3) termofilik *Campylobacter* cins düzeyinde identifiye edildi. İdentifiye edilen 13 izolatın 2 (% 15,4)'si *C. jejuni*, 1 (% 7,7)'i *C. coli* olarak isimlendirilirken, geriye kalan 10 izolat *Campylobacter* spp. olarak tanımlandı. *C. jejuni* izolatlarında *ctx* (cytolethal distending toxin) genlerinin (*cdtA*, *cdtB* ve *cdtC*) tespiti mPCR ile gerçekleştirildi. İzolatların hiç birinde *cdt* geni saptanmadı. Bu araştırma ile bölgemizde ilk kez Anadolu Mandalarından sağlanan dışkı örnekleri termofilik *Campylobacter* türleri yönünden incelendi. Araştırmadan elde edilen verilerin, yöremizde yapılacak benzer çalışmalara kaynak teşkil edebileceği kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: Anadolu mandası, dışkı, PCR, termofilik *Campylobacter*.

Molecular Characterization of Thermophilic *Campylobacter* Species Isolated From Anatolian Buffalo Feces

***Corresponding author's:**

Prof. Dr. Timur GÜLHAN
Ondokuz Mayıs University,
Faculty of veterinary medicine,
Department of Microbiology,
55 220 Atakum, Samsun, Turkey
✉: timur.gulhan@omu.edu.tr
Mobile telephone : +90 (544) 446 33 29
Telephone : +90 (362) 312 19 19-1449
Fax : +90 (362) 457 69 22

Abstract: Buffaloes as in other animals have been demonstrated to play a role in certain diseases transmitted to susceptible animals and human populations. In this study, 140 fecal samples collected from Anatolian Buffaloes in breeding Amasya and around were examined for thermophilic *Campylobacter* species. Standard selective enrichment methods were used for isolation of thermophilic *Campylobacter* species from fecal samples. Identification of *Campylobacter* suspected isolates at the genus and species levels was performed by PCR. Of the 140 stool samples, 13 (9.3 %) thermophilic *Campylobacter* were identified at the genus level. While 2 (15.4%) of the 13 isolated isolates were named *C. jejuni* and 1 (7.7 %) as *C. coli*, the remaining 10 isolates were defined as *Campylobacter* spp. Detection of *ctx* (cytolethal distending toxin) genes (*cdtA*, *cdtB* and *cdtC*) in *C. jejuni* isolate was performed by mPCR. The *ctx* genes were not detected in any of the isolates. Fecal samples obtained from Anatolian Buffaloes were examined first time in our region respect to thermophilic *Campylobacter* species. We concluded that the data obtained of research can constitute a resource to similar studies in our region.

Keywords: Anatolian buffaloes, feces, PCR, thermophilic *Campylobacter*.

GİRİŞ

Manda (*Bubalus bubalis*), dünya çapında büyük bir çoğunluğu Asya kıtasında bulunan (%97,4), başlıca süt, et, deri ve iş gücünden yararlanmak amacıyla yetiştirilen, *Artiodactyla* takımında, *Bovidae* ailesinde *Bubalus* sınıfında bir türdür. Mandalar, Afrika yabani mandası (*Syncerus caffer*) ve Asya mandası (*Bubalus bubalis*) olarak gruplandırılmaktadırlar. Evcil ve yabani formlardan köken alan mandaların yaklaşık 74 ırkı bulunmaktadır. Bu ırklar kabaca, bataklık ve nehir (ırmak) mandaları olarak ikiye ayrılmaktadır. Türkiye'deki mandalar, nehir mandalarının bir alt grubu olan Akdeniz mandalarından köken almakta ve Anadolu mandası olarak isimlendirilmektedir. Dünya çapında son verilere göre yaklaşık 194 milyon manda bulunmaktadır. Ülkemizde Eylül 2019 verilerine göre 180,826 manda yetiştirildiği, Amasya ilinde ise yaklaşık 5,974 manda bulunduğu bildirilmektedir (TÜİK, 2019).

Campylobacter cinsinde sınıflandırılan bakteriler, zoonoz bakteriyel etkenler arasında en yaygın grubu oluşturmaktadır. Güncel olarak 25 türde sınıflandırılan *Campylobacter*ler içerisinde, termofilik olanlar *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* ve *C. upsalensis* insanlarda, özellikle gastrointestinal olmak üzere, çeşitli hastalıklardan izole edilmektedir. Termofilik *Campylobacter* türlerinin insanlara bulaştırılmasında kümes hayvanları, çiğ süt, içme suyu, çiftlik hayvanları ve yabani kanatlı hayvanlar önemli rol oynamaktadır (Crawshaw, 2019; Jansen vd., 2019; Willis vd., 2017).

Termofilik *Campylobacter* türleri, hayvanlarda çok geniş bir yelpazede (gastroenteritis-abortus) enfeksiyonlardan izole edilmektedir. Gastrointestinal sistemde (barsak ve safra kesesi) kommensal olarak bulunmakla birlikte özellikle koyunlarda enzootik, diğer ruminantlarda ise sporadik abortuslara neden oldukları ortaya konulmuştur (Sahin vd., 2008). *Campylobacter* kökenli abortus vakalarının çoğunda herhangi bir klinik belirti olmaksızın yavru atımları şekillenmektedir. Hijyenik şartların iyi olmadığı bölgelerde manda etlerinde yüksek oranda *Campylobacter* kontaminasyonları bildirilmektedir (Rahimi vd., 2013). Bu nedenle taşıyıcı ve saçıcı konumundaki hayvanlarda etkenin varlığı ve sıklığının ortaya konulması önem arz etmektedir.

Ülkemizde farklı hayvan türlerinde termofilik *Campylobacter* türlerinin tespitine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Ancak, Anadolu Mandaları ile ilgili araştırmalar son derece sınırlıdır. Bu çalışma, Amasya ili ve ilçelerinde halk elinde yoğun olarak yetiştiriciliği yapılmakta olan Anadolu Mandalarına ait dışkı örneklerinde termofilik *Campylobacter* türlerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirildi.

MATERYAL VE METOT

Dışkı Örnekleri: Çalışmanın materyalini Amasya ilçelerinde yetiştiriciliği yapılan Anadolu Mandalarından sağlanan 140 adet dışkı örneği oluşturdu (Şekil 1). Bu amaçla, içerisinde modifiye Cary-Blair besi yeri bulunan steril dışkı toplama kaplarına alınan dışkı örnekleri kısa sürede ve soğuk zincirde, OMÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına ulaştırıldı. Örnekleme yapacağı hayvan popülasyonlarına göre mandalardaki oranın bilinmesi (Thrusfield, 2018) için toplam hayvan sayısı (5974) baz alınarak % 95 güven aralığında % 2,34 tahmini prevalans bazında 140 dışkı örneği toplandı (Tablo 1).



Şekil 1. Anadolu Mandası dışkı örneklerinin toplandığı merkezler.

Figure 1. Origins of collected Anatolian Buffaloes stool samples.

Tablo 1. Anadolu Mandası dışkı örneklerinin toplandığı merkezler ve dışkı sayıları.

Table 1. Origins of collected Anatolian Buffaloes stool samples and stool numbers.

Merkez	Manda sayısı	Alınan dışkı sayısı
Suluova	2059	20
Taşova	1124	20
Amasya merkez	1008	20
Göynücek	753	20
Gümüshacıköy	517	20
Merzifon	323	20
Hamamözü	190	20
Toplam	5974	140

Besiyerleri ve Suplementler: Dışkı örneklerinden termofilik *Campylobacter* türlerinin selektif izolasyonu amacıyla modifiye Cary-Blair besi yeri, modifiye preston broth (Oxoid), modified charcoal cefoperazone desoxycholate agar (mCCD agar, Oxoid), blood agar base, brain heart infüzyon broth besiyerleri kullanıldı. Selektif besi yeri elde etmek için ise modifiye preston supplementi (X114, Acumedia), sefoperazon+amfotersin suplamenti (X112, Acumedia) supplementlerinden, mikroaerobik ortam elde etmek için ise campygen (Thermo) kitinden yararlanıldı.

İzolasyon ve İdentifikasyon: Dışkı örneklerinden termofilik *Campylobacter* türlerinin selektif izolasyonu ISO 10272 standartlarına göre yapıldı. Bu amaçla dışkı örnekleri preston sıvı besi yerine ekildi ve mikroaerobik olarak 42°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Sıvı besiyerinden bir öze dolusu alınarak mCCD agara ekildi ve 42°C'de 5 gün süreyle mikroaerobik şartlarda inkübe edildi. Mikroskopik ve makroskopik olarak *Campylobacter* morfolojisine sahip bakteri kolonileri %7'lik koyun kanlı agara ekilerek saflaştırıldı. *Campylobacter* şüpheli izolatlar moleküler olarak PCR ile cins ve tür tayini yapılmaya kadar 200 µl'lik TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH:8.0) bufferde -20 °C'de ve % 15 gliserol içeren BHI'de -70 °C'de saklandı (Wisessombat vd., 2009).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR): Anadolu Mandallarından toplanan dışkı örneklerinden izole edilen termofilik *Campylobacter* şüpheli izolatların tür düzeyinde

(*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni* ve *C. upsaliensis*) identifikasyonunda koloni mPCR tekniği kullanıldı (Wang vd., 2002).

İzolatlardan DNA ekstraksiyonunda kaynatma prosedüründen yararlanıldı. Saf olarak üretilen kültürlerden bir öze dolusu alınarak 0.5 ml'lik steril distile su ile süspanse edildi. Süspanسیونlar 100 °C'de 10 dakika tutulduktan sonra 4 °C'de, 10.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar PCR'da templeyt DNA olarak kullanıldı.

İzolatların termofilik *Campylobacter* türleri açısından identifikasyonu ve ayırımında Wang vd., (2002) tarafından bildirilen primer ve PCR şartları kullanıldı. Kullanılan metot *C. fetus* primerleri çıkartılarak modifiye edildi. Böylece *hipO* geni (*C. jejuni*), *glyA* geni (*C. coli*, *C. lari* ve *C. upsaliensis*) ve 23S rRNA internal kontrolden oluşan 5 farklı primer çifti ile identifikasyon gerçekleştirildi (Tablo 2).

Tablo 2. Termofilik *Campylobacter* türlerinin mPCR ile ayırımında kullanılan primer çiftleri ve baz büyüklükleri.

Table 2. Primer pairs and base sizes used for separation of Thermophilic *Campylobacter* species by mPCR.

Primer	Boyut (bp)	Sekans (5'-3')	Hedef gen	Gen lokasyonu
CJF	323	ACTTCTTTATTGCTTGCTGC	<i>C. jejuni hipO</i>	1662-1681
CJR		GCCACAACAAGTAAAGAAGC		1984-1965
CCF	126	GTAACAACAAAGCTTATCGTG	<i>C. coli glyA</i>	337-357
CCR		TCCAGCAATGTGTGCAATG		462-444
CLF	251	TAGAGAGATAGCAAAGAGA	<i>C. lari glyA</i>	318-337
CLR		TACACATAATAATCCACCC		568-549
CUF	204	AATTGAAACTCTTGCTATCC	<i>C. upsaliensis glyA</i>	63-82
CUR		TCATACATTTTACCCGAGCT		266-247
23SF	650	TATACCGGTAAGGAGTGCTGGAG	<i>C. jejuni 23S rRNA</i>	3807-3829
23SR		ATCAATTAACCTTCGAGCACCC		4456-4435

Her mPCR tüpünde 200 µM deoksinüklosid trifosfat (dNTP), 2.5 µl 10x reaksiyon bufferi (500 mM Tris-HCl [pH 8.3], 100 mM KCl, ve 50 mM [NH₄]₂SO₄), 20 mM MgCl₂, 0.5 µM *C. jejuni* ve *C. lari* primerleri, 1 µM *C. coli* primeri, 2 µM *C. upsaliensis* primeri; 0.2 µM 23S rRNA primeri; 1.25 U FastStart Taq DNA polimerase ve 5 µl templeyt DNA olacak şekilde PCR karışımı hazırlandı. PCR tüplerindeki son hacim 25 µl olacak şekilde steril distile su ile ayarlandı. DNA amplifikasyonu 95°C'de 6 dakika ilk denaturasyon, 95°C'de 30 saniye denaturasyon, 59°C'de 30 saniye bağlanma (annealing), 72 °C'de 30 saniye uzama (extension) 30 siklus ve 72°C'de 7 dak. son uzama (extension) şartlarında Termal Cycler (Thermo) cihazında gerçekleştirildi. Elde edilen amplikonlar, % 0.5 etidyum bromür içeren %1.5'lük agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutuldu. Oluşan bantlar jel görüntüleme sisteminde (Digi-Doc-IT-Darkroom) incelendi.

C. jejuni izolatlarında *cdt* (cytolethal distending toxin) genlerinin mPCR ile belirlenmesinde Pickett vd., (1996) ve Martinez vd., (2006) tarafından bildirilen yöntem uygulandı. mPCR'da *C. jejuni* için kullanılan *cdtA*, *cdtB* ve *cdtC* primer dizilimleri Tablo 3'de gösterildi.

Tablo 3. mPCR'da *cdt* genlerinin belirlenmesinde kullanılan primer çiftleri ve baz büyüklükleri.

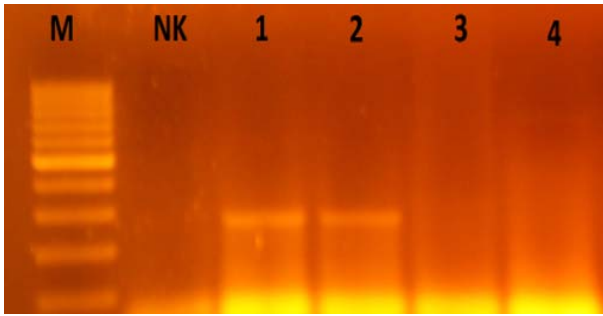
Table 3. Primer pairs and base sizes used in determining the *cdt* genes in mPCR.

Primer	Sekans (5'-3')	Boyut (bp)	Hedef gen
DTA-F	CTA TTA CTC CTA TTA CCC CAC C	22	<i>dtA</i>
DTA-R	AAT TTG AAC CGC TGT ATT GCT C		
DTB-F	AGG AAC TTT ACC AAG AAC AGC C	31	<i>dtB</i>
DTB-R	GGT GGA GTA TAG GTT TGT TGT C		
DTC-F	ACT CCT ACT GGA GAT TTG AAA G	39	<i>cdtC</i>
DTC-R	CAC AGC TGA AGT TGT TGT TGG C		

Toplam hacim 25 µl olacak şekilde 1XPCR buffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,3), 3 mM MgCl₂, 0,2 µM primer, 200 µM deoksinükleotid, 2U taq polimeraz ve 80 ng genomik DNA mPCR karışımı hazırlandı. Amplikasyon reaksiyonu Bio Rad thermocycler kullanılarak 94°C'de 5 dakika ilk denaturasyon (1 siklus), 94°C'de 1 dakika denaturasyon, 54°C'de 1 dakika bağlanma (annealing), 72°C'de 1 dakika uzama (extension) (30 siklus) ve 72°C'de 5 dak. son uzama (extension, 1 siklus) program dahilinde yapıldı. Elde edilen PCR ürünlerinden 10 µl alınıp, ethidium bromide ile boyanmış %2 agaroz jele aktarıldı, 100V'da 2 saat elektroforez işlemine tabi tutuldu. Oluşan bantlar jel görüntüleme sisteminde (Digi-Doc-IT-Darkroom) incelendi.

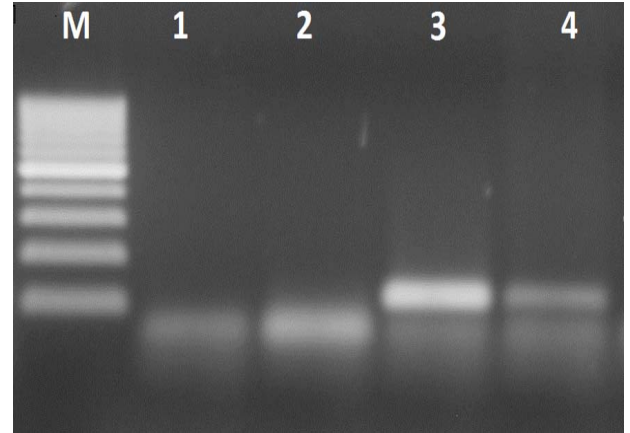
BULGULAR

Manda dışkı örneklerinden termofilik *Campylobacter* türlerinin selektif izolasyonu sonucu, mCDD besi yerinde gri-saydam renkli şekillenen S formundaki kolonilerden yapılan Gram boyamada tipik olarak Gram negatif S şeklinde kıvrımlı morfolojiye sahip olanlar *Campylobacter* şüpheli olarak tanımlandı. Şüpheli kolonilerden saflaştırılan izolatlar cins ve tür düzeyinde PCR ile tanımlanarak edildi. Böylece incelenen 140 dışkı örneğinden 13 (% 9,3) termofilik *Campylobacter* spp. izole ve tanımlanarak edildi. PCR ile izolatların 2'si *C. jejuni* (Şekil 2) ve 1'i *C. coli* (Şekil 3) olarak tanımlanırken, diğer izolatlar tür düzeyinde isimlendirilemedi ve *Campylobacter* spp. (Şekil 4) şeklinde ifade edildi. İzolatların dışkı örneklerinin sağlandığı merkezlere göre dağılımı Tablo 4'de sunuldu. *C. jejuni* izolatlarında ctx (cytolethal distending toxin) genlerinin (*cdtA*, *cdtB* ve *cdtC*) tespiti mPCR ile gerçekleştirildi. İzolatların hiç birinde *cdt* geni saptanamadı.



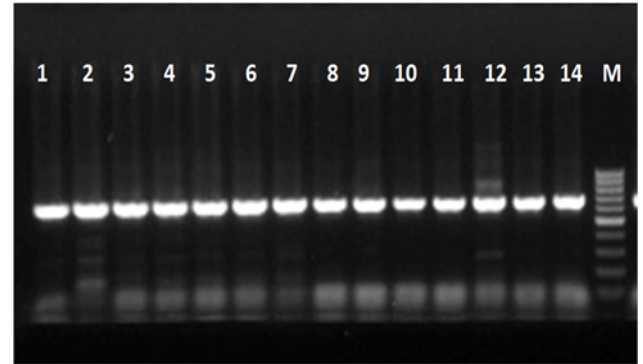
Şekil 2. *C. jejuni* PCR görüntüsü (M: Moleküler marker 100 bp, Fermentas; NK: Negatif Kontrol; 1 ve 2: *C. jejuni*, 323 bp; 3 ve 4: Negatif örnekler).

Figure 2. *C. jejuni* PCR image (M: Molecular marker 100 bp, Fermentas; NK: Negative Control; 1 and 2: *C. jejuni*, 323 bp; 3 and 4: Negative samples).



Şekil 3. *C. coli* PCR görüntüsü (M: Moleküler marker 100 bp, Fermentas; 1: Negatif kontrol; 2: Negatif örnek; 3: Pozitif kontrol; 4: *C. coli*, 126 bp)

Figure 3. *C. coli* PCR image (M: Molecular marker 100 bp, Fermentas; 1: Negative control; 2: Negative sample; 3: Positive control; 4: *C. coli*, 126 bp).



Şekil 4. *Campylobacter* spp. PCR görüntüsü (1-13 Pozitif örnekler, 650 bp; 14: Pozitif kontrol; M: Moleküler marker 100 bp, Fermentas).

Figure 4. *Campylobacter* spp. PCR image (1-13 Positive samples, 650 bp; 14: Positive control; M: Molecular marker 100 bp, Fermentas).

Tablo 4. Termofilik *Campylobacter* türlerinin izole edildiği merkezlere göre dağılımı.

Table 4. Distribution of thermophilic *Campylobacter* species according to the centers where they are isolated.

Merkez	Dışkı sayısı	<i>Campylobacter</i> spp. (%)	<i>C. jejuni</i> (%)	<i>C. coli</i> (%)	<i>C. lari</i> (%)	<i>C. upsaliensis</i> (%)	Toplam (%)
Suluova	20	3 (15)	1 (5)	0	0	0	4 (20)
Taşova	20	2 (10)	0	0	0	0	2 (10)
Amasya merkez	20	2 (10)	1 (5)	0	0	0	3 (15)
Göynücek	20	1 (5)	0	0	0	0	1 (5)
Gümüşhacıköy	20	0	0	0	0	0	0
Merzifon	20	2 (10)	0	1 (5)	0	0	3 (15)
Hamamözü	20	0	0	0	0	0	0
Toplam	140	10 (7.2)	2 (1.4)	1 (0.7)	0	0	13 (9.3)

TARTIŞMA VE SONUÇ

Termofilik *Campylobacter* türleri pek çok memeli ve kanatlı hayvan türünün normal barsak florasını oluşturmakla birlikte özellikle *C. jejuni* ve *C. coli* gibi türlerin, insan ve çok sayıda hayvan türünde önemli enfeksiyonlara yol açtıkları ortaya konulmuştur (Rahimi vd., 2017). Buzağular başta olmak üzere genç hayvanlarda,

başka klinik belirti oluşturmaksızın, ishallere neden olmaktadır (Klein vd., 2013). Pek çok termofilik *Campylobacter* türünün zoonotik öneme sahip olduğu belirlenmiştir (Weis vd., 2014; Zhao vd., 2015).

Mandaların diğer hayvanlarda olduğu gibi pek çok patojen etkeni taşıdıkları, bazı hastalıkların duyarlı hayvan popülasyonlarına ve insanlara bulaştırılmasında rol oynadıkları ortaya konulmuştur (Maktabi vd., 2019). Farklı

hayvan türlerine ait dışkı örneklerinden termofilik *Campylobacter* türlerinin izolasyonu ve karakterizasyonu amacıyla çok sayıda çalışma yapılmıştır (Abay vd., 2014; Adıgüzel vd., 2018; Aslantaş, 2019; Kim vd., 2016; Kojima vd., 2015; Rahimi vd., 2017; Viswanathan vd., 2017; Weis vd., 2014). Mandalara ait çeşitli materyallerden farklı bakterilerin tespitine yönelik çalışmalar bulunmaktadır (Ak ve Gülhan, 2018; Gandahi vd., 2010; Nizza vd., 2010; Nuhay ve Gülhan, 2017; Saka ve Terzi Gülel, 2018; Zimmer vd., 2010). Ancak manda dışkılarından termofilik *Campylobacter* türlerinin tespitine yönelik çalışma sayısının sınırlı olduğu görülmektedir (Baserisalehi vd., 2005; Boonmar vd., 2007; Hassanain, 2011; Kakkar ve Dogra, 1990; Osbjer vd., 2016). Diğer yandan, yürütülen çalışmalar daha çok manda et, süt ve atık materyallerinden termofilik *Campylobacter* türlerinin belirlenmesine yöneliktir (Modi vd., 2015; Maktabi vd., 2019; Rahimi vd., 2013; Serraino vd., 2013; Willis vd., 2017). Mandalarda yapılan çalışmaların sınırlı kalmasının belki de en önemli nedenleri; mandaların spesifik coğrafik bölgelerde lokalize olması ve popülasyonunun ülkeden ülkeye değişkenlik göstermesinden kaynaklanabilir.

Hindistan'da sağlıklı ve ishali hayvanlarda yapılan bir çalışmada (Kakkar ve Dogra, 1990) incelenen 5 sağlıklı ve 25 ishali olmak üzere toplam 30 manda dışkı örneğinden 5 (% 16,7) termofilik *Campylobacter* türü izole edilmiştir. İzolatların tamamı ishali hayvanlardan gerçekleştirilmiş ve 3'ü *C. jejuni*, 2'si de *C. coli* olarak tanımlanmıştır.

Aynı ülkede klinik olarak sağlıklı evcil hayvanlarda termofilik *Campylobacter* türlerinin tespitine yönelik gerçekleştirilen bir çalışmada (Baserisalehi vd., 2005), incelenen 21 manda dışkısı örneğinin 6 (% 28,6)'sında termofilik *Campylobacter* spp. izole edilmiştir. Araştırmada, izolatların 3'ü *C. jejuni*, 2'si *C. coli* ve 1'i de *C. lari* olarak tanımlanmıştır.

Japonya'da kesimhanelerde sığır ve mandalarda *Campylobacter* spp. prevalansını tespit etmek amacıyla yapılan bir çalışmada (Boonmar vd., 2007), mandalardan alınan 184 sekum örneğinin 3'ünde (% 1,6) ve 100 safranın 1'inde (% 1) *Campylobacter* spp. belirlenmiştir. Sekal kökenli 3 izolatın 2'si ve safradan izole edilen tek izolat *C. jejuni* olarak tanımlanmıştır.

Diğer yandan, Mısır'da yapılan bir çalışmada (Hassanain, 2011) incelenen 55 manda bağırsak içeriği örneğinin tamamı *Campylobacter* spp. açısından negatif bulunmuştur. Benzer bir çalışmada (Osbyer vd., 2016) sağlıklı mandalardan alınan 25 dışkı örneği termofilik *Campylobacter* spp. açısından incelenmiş, örneklerin hiçbirinde kültür ve PCR ile pozitiflik belirlenmemiştir.

Bu çalışmada, incelenen 140 Anadolu mandası dışkı örneğinden 13 (% 9,3) termofilik *Campylobacter* cins düzeyine tanımlanmıştır. İzolatların 2'si *C. jejuni* ve 1'i

C. coli olarak tanımlanırken, geriye kalan 10 izolat çalışma kapsamında kullanılan *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* ve *C. upsaliensis* türlerine spesifik primerler ile tanımlanamamıştır ve *Campylobacter* spp. olarak tanımlanmıştır.

Manda dışkılarından termofilik *Campylobacter* türlerinin tespitine yönelik gerçekleştirilen çalışmalarda farklı sonuçlar alınmıştır. Bazı çalışmalarda etkenlerin çalışılan manda popülasyonlarında belirlenemediği (Hassanain, 2011; Osbyer vd., 2016) bazılarındaki ise yüksek seviyelerde (Baserisalehi vd., 2005; Kakkar ve Dogra, 1990) saptandığı görülmektedir. Çalışma kapsamında örnek alınan manda popülasyonlarında belirlenen toplam pozitiflik oranının farklı ülkelerde bildirilen oranlardan genelde düşük olduğu görüldü. Diğer yandan çalışma popülasyonları arasında örnek alınan bazı manda popülasyonlarından izolasyon yapılamaması negatif bildirim yapılan çalışmalarla (Hassanain, 2011; Osbyer vd., 2016) uyumlu bulundu. İzolasyon oranlarının diğer ülkelerdekilerden düşük olması, araştırma kapsamında alınan dışkı örneklerinin klinik olarak sağlıklı mandalardan sağlanmış olmasından kaynaklanabilir. Ayrıca çalışmalarda kullanılan metodların, örnek toplanan merkezlerin farklı coğrafik alanlara ait olması ve popülasyon içi bireysel farklılıklar da sonuçları etkileyebilmektedir. Bu durum, önceki yıllarda aynı ülkedeki çalışma bulgularında görülebildiği gibi, farklı ülkeler arasındaki bildirilen değerlerde de saptanabilmektedir.

Bu çalışmada Amasya ili ve ilçelerinde halk elinde yetiştiriciliği yapılan Anadolu Mandalarının dışkı örneklerinde termofilik *Campylobacter* türlerinin varlığı, yaygınlığı ve hedef hayvan popülasyonlarındaki taşıyıcılık oranları ilk kez incelendi. Çalışma kapsamındaki bazı Anadolu Mandası popülasyonlarından sağlanan dışkılarından etken izole edilemezken, bazı popülasyonlarda değişken oranlarda tespit edildi. Toplam hayvan popülasyonlarından izole edilen etkenin prevalansı ise %9,3 olarak saptandı. Zoonotik öneme sahip etkenin mandalardaki taşıyıcılık oranının yüksek olması önem arz etmektedir.

Sonuç olarak, Ülkemizde diğer hayvan türlerinde zoonotik öneme sahip etkenlerin belirlenmesine yönelik çok sayıda çalışma bulunmakla birlikte, mandalara ait verilerin çok yetersiz olduğu görülmektedir. Yapılan literatür taramalarında manda dışkılarından termofilik *Campylobacter* türlerinin tespiti amacıyla gerçekleştirilen herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Bu araştırma ile bölgemizdeki manda popülasyonları sınırlı dahi olsa termofilik *Campylobacter* türleri açısından incelendi. Zoonoz karaktere sahip etkenlerin düşük düzeylerde de olsa bazı manda popülasyonlarında tespit edilmesinin önemli olduğu kanısına varıldı. Bu nedenle, örnek alınan manda sahipleri hastalıkla ilgili olarak detaylıca

bilgilendirildi. Ülkemizin farklı bölgelerinde, manda yetiştiriciliğinin yapıldığı alanlarda konuyla ilgili kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulduğu sonucuna ulaşıldı.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmaya PYO.VET. 1904.18.019 nolu proje kapsamında maddi destek sağlayan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığına teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Abay, S., Aydın, F., Hızlısoy, H. & Güneş, V. (2014).** Recovery of thermophilic *Campylobacter* spp. in healthy and diarrhoeic pets by three culture methods and identification of the isolates by multiplex Polymerase Chain Reaction (mPCR). *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **20(5)**, 735-741.
- Adiguzel, M.C., Kahraman, B.B., Sigirci, B.D., Celik, B., Bağcıgil, A.F., Metiner, K., İkiz, S., Ak, S. & Özgür, N.Y. (2018).** Phenotypic and genotypic examination of antimicrobial resistance in thermophilic *Campylobacter* species isolated from poultry in Turkey. *Journal of Veterinary Research*, **62**, 463-468.
- Ak, S. & Gülhan, T. (2018).** Anadolu mandası dışkılarından Enterekok türlerinin izolasyonu ve antibiyotik dirençliliklerinin tespiti. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, **29(1)**, 40-45.
- Aslantaş, Ö. (2019).** Isolation and molecular characterization of thermophilic *Campylobacter* spp. in Dogs and Cats. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **25(3)**, 341-348.
- Baserisalehi, M., Al-Mahdi, A.Y. & Kapadnis, B.P. (2005).** Antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* spp. isolated from environmental samples. *Indian Journal of Medical Microbiology*, **23**, 48-51.
- Boonmar, S., Chanda, C., Markvichitr, K., Chauchom, S., Yingsakmongkon, S., Yamamoto, S. & Morita, Y. (2007).** Prevalence of *Campylobacter* spp. in slaughtered cattle and buffaloes in Vientiane, Lao People's Democratic Republic. *Journal of Veterinary Medicine Science*, **69(8)**, 853-855.
- Crawshaw, T. (2019).** A review of the novel thermophilic *Campylobacter*, *Campylobacter hepaticus*, a pathogen of poultry. *Transboundary and Emerging Diseases*, **66**, 1481-1492.
- Gandahi, A., Chen, Q.S., Yang, P., Shah, M.G., Kamboh, A.A., Malhi, M. & Detho, Z.A. (2010).** Antibiotic sensitivity profile of bacterial isolates from buffalo uteri. *Proceedings 9th World Buffalo Congress*, 20 April 2010, Buenos Aires, Argentina, 432-437.
- Hassanain, N.A. (2011).** Antimicrobial resistant *Campylobacter jejuni* isolated from humans and animals in Egypt. *Global Veterinaria*, **6(2)**, 195-200.
- Jansen, W., Müller, A., Grabowski, N.T., Kehrenberg, C., Muylkens, B. & Al Dahouk, S. (2019).** Foodborne diseases do not respect borders: Zoonotic pathogens and antimicrobial resistant bacteria in food products of animal origin illegally imported into the European Union. *The Veterinary Journal*, **244**, 75-82.
- Kakkar, M. & Dogra, S.C. (1990).** Prevalence of *Campylobacter* infections in animals and children in Haryana, India. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research*, **8(1-2)**, 34-36.
- Kim, J.S., Lee, M.Y., Kim, S.J., Jeon, S.E., Cha, I., Hong, S., Chung, G.T., Huh, M.J., Kang, Y.H., Yoo, C.K. & Kim, J. (2016).** High-level ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* isolates circulating in humans and animals in Incheon, Republic of Korea. *Zoonoses and Public Health*, **63**, 545-554.
- Klein, D., Alispahic, M., Sofka, D., Iwersen, M., Drillich, M. & Hilbert, F. (2013).** Prevalence and risk factors for shedding of thermophilic *Campylobacter* in calves with and without diarrhea in Austrian dairy herds. *Journal of Dairy Science*, **96**, 1203-1210.
- Kojima, C., Kishimoto, M. & Ezaki, T. (2015).** Distribution of antimicrobial resistance in *Campylobacter* strains isolated from poultry at a slaughterhouse and supermarkets in Japan. *Biocontrol Science*, **20(3)**, 179-184.
- Maktabi, S., Ghorbanpoor, M., Hossaini, M. & Motavalibashi, A. (2019).** Detection of multi-antibiotic resistant *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in beef, mutton, chicken and water buffalo meat in Ahvaz, Iran. *Vet. Res. Forum*, **10(1)**, 37-42.
- Martinez, I., Mateo, E., Churrua, E., Girbau, C., Alonso, R. & Astorga, A.F. (2006).** Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. *International Journal of Medical Microbiology*, **296**, 45-48.
- Modi, S., Brahmabhatt, M.N., Chatur, Y.A. & Nayak, J.B. (2015).** Prevalence of *Campylobacter* species in milk and milk products, their virulence gene profile and antibiogram. *Veterinary World*, **8(1)**, 1-8.
- Nizza, S., Mallardo, K., Manco, E., Marullo, A., Pisanelli, G., De Martino, L., Iovane, G. & Pagnini, U. (2010).** Lethal co-infection of rotavirus and *E. coli* O157:H7 in Mediterranean buffalo calves of a closed community in Italy. *Proceedings 9th World Buffalo Congress*, 20 April 2010, Buenos Aires, Argentina, 470-472.
- Nuhay, Ç. & Gülhan, T. (2017).** Samsun ili ve ilçelerinde yetiştirilen Anadolu Mandalarının dışkı örneklerinde *Escherichia coli* O157:H7'nin tespiti. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, **28(1)**, 39-45.

- Osbjert, K., Tano, E., Chhayheng, L., Mac-Kwashie, A.O., Fernström, L.L., Ellström, P., Sokerya, S., Sokheng, C., Mom, V., Chheng, K., San, S., Davun, H., Boqvist, S., Rautelin, H. & Magnusson, U. (2016).** Detection of *Campylobacter* in human and animal field samples in Cambodia. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, *124*, 508-515.
- Pamuk, Ş., Yıldırım, Y., Seker, E., Gürler, Z. & Kara, R. (2012).** A survey of the occurrence and properties of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* in water buffalo milk and dairy products in Turkey. *International Journal of Dairy Technology*, *65*(3), 416-422.
- Pickett, C.L., Pesci, E.C., Cottle, D.L., Russel, G., Erdem, A.N. & Zeytin, H. (1996).** Prevalence of cytotoxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. *cdtB* genes. *Infection and Immunity*, *64*(6), 2070-2078.
- Rahimi, E., Ameri, M., Alimoradi, M., Chakeri, A. & Bahrami, A.R. (2013).** Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from raw camel, beef, and water buffalo meat in Iran. *Comparative Clinical Pathology*, *22*, 467-473.
- Rahimi, E., Alipoor-Amroabadi, M. & Khamesipour, F. (2017).** Investigation of prevalence of thermotolerant *Campylobacter* spp. in livestock feces. *Canadian Journal of Animal Science*, *97*, 207-213.
- Sahin, O., Plummer, P.J., Jordan, D.M., Sulaj, K., Pereira, S., Austerman, S.R., Wang, L., Yaeger, M.J., Hoffman, L.J. & Zhang, Q. (2008).** Emergence of a tetracycline-resistant *Campylobacter jejuni* clone associated with outbreaks of ovine abortion in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, *46*(5), 1663-1671.
- Saka, E. & Terzi Gülel, G. (2018).** Detection of enterotoxin genes and methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from water buffalo milk and dairy products. *Journal of Food Science*, *83*(6), 1716-1722.
- Serraino, A., Florio, D., Giacometti, F., Piva, S., Mion, D., Zanoni, R.G. (2013).** Presence of *Campylobacter* and *Arcobacter* species in in-line milk filters of farms authorized to produce and sell raw milk and of a water buffalo dairy farm in Italy. *Journal of Dairy Science*, *96*, 2801-2807.
- Thrusfield, M. (2018).** *Veterinary Epidemiology*, 4rd Edition, 624 pages, Wiley-Blackwell, UK, ISBN 9781118280270.
- Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) (2019).** Türkiye'deki manda sayılarının illere göre dağılımı. <https://www.tarimorman.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/HAYGEM.pdf>. (24 Ekim 2019)
- Viswanathan, M., Pearl, D.L., Taboada, E.N., Parmley, E.J., Mutschall, S.K. & Jardine, C.M. (2017).** Cluster analysis of *Campylobacter jejuni* genotypes isolated from small and medium-sized mammalian wildlife and bovine livestock from Ontario farms. *Zoonoses and Public Health*, *64*, 185-193.
- Wang, G., Clark, C.G., Taylor, T.M., Pucknell, C., Barton, C., Price, L., Woodward, D.L. & Rodgers, F.G. (2002).** Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(12), 4744-4747.
- Weis, A.M., Miller, W.A., Byrne, B.A., Chouicha, N., Boyce, W.M. & Townsend, A.K. (2014).** Prevalence and pathogenic potential of *Campylobacter* isolates from free-living, human-commensal American Crows. *Applied Environmental Microbiology*, *80*(5), 1639-1644.
- Willis, C., Jørgensen, F., Aird, H., Elviss, N., Fox, A., Jenkins, C., Fenelon, D., Sadler-Reeves, L. & McLaughlin, J. (2017).** An assessment of the microbiological quality and safety of raw drinking milk on retail sale in England. *Journal of Applied Microbiology*, *124*, 535-546.
- Wisessombat, S., Kittiniyom, K., Srimanote, P., Wonglumsom, W. & Voravuthikunchai, S.P. (2009).** A novel method and simple apparatus for the detection of thermophilic *Campylobacter* spp. in chicken meat products. *Journal of Microbiological Methods*, *76*, 169-173.
- Zhao, S., Mukherjee, S., Chen, Y., Li, C., Young, S., Warren, M., Abbott, J., Friedman, S., Kabera, C., Karlsson, M. & McDermott, P.F. (2015).** Novel gentamicin resistance genes in *Campylobacter* isolated from humans and retail meats in the USA. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *70*, 1314-1321.
- Zimmer, P.A., Draghi, M.G., Benitez, D.F., Crudeli, G., Biotti, G.M., Cetrá, B., Storani, C., Salustio, E., Piazza, E. & Samartino, L. (2010).** Brucellosis in Buffalos in Formosa, Argentina. *Proceedings 9th World Buffalo Congress*, 20 April 2010, Buenos Aires, Argentina, 441-443.