

NORMAL VE HEPATİTİSLİ TAVUKLARDAN CAMPYLOBACTER İZOLASYONU ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

Fatma KOÇ (*)

GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

Campylobacter'ler, çeşitli evcil ve yabani hayvanların normal barsak floralarında bulunan, enterik ve genital infeksiyonlara neden olan mikroorganizmalardır. Campylobacter'ler önceleri insanlarda koleranın etkeni olan *Vibrio cholerae* ile aynı grup altına sokularak "Vibrio" cins ismi ile bilinmekteydi. Fakat bu iki grup mikroorganizmanın üremeleri, fizyolojileri, metabolizmaları ve DNA baz homolojileri bakımından farklı özelliklere sahip oldukları ve tek benzerliklerinin morfolojik yapılarından ibaret olduğu anlaşıldıktan sonra bu mikroorganizmalar için "Campylobacter" generik ismi önerilmiştir (45).

Campylobacter cinsine bağlı mikroorganizmaların Veteriner Hekimlik ve Mikrobiyoloji alanında ilk kez tanınmaları yaklaşık 80 yıl öncesine dayanmaktadır. Mc Fadyean ve Stockman (33), 1913 yılında İngiltere'de abort yapmış koyun ve ineklerden ilk kez mikroaerofilik vibrioları izole ederek, mikroorganizmanın sığır ve koyunlarda yavru atımına neden olduğunu bildirmişlerdir. Campylobacter türlerinin sınıflandırılmaları ve adlandırılmaları bugüne kadar birçok değişiklik geçirdiği için eski literatürlerde çeşitli isimlerle bildirilen Campylobacter türlerinin bugün hangi adla anılacaklarını belirlemek oldukça güçtür. Bugün için Campylobacter cinsine dahil edilen türler şunlardır; *C.coli*, *C.fetus* subsp. *fetus*, *C.fetus* subsp. *venerealis*, *C.jejuni*, *C.laridis*, *C.fecalis*, *C.sputorum* subsp. *sputorum*, *C.sputorum* subsp. *muco* *salis*, *C.sputorum* subsp. *bubulus*, *C.hyointestinalis*, *C.coccisus*, *C.pyloridis*, *C.fennelliae*, *C.cinaedi*, *C.nitrofigilis*. Bu türlerin daha önceki yıllarda taşıdıkları adlar ve son sınıflandırmada aldıkları isimler ile sınıflandırmaya yeni katılan türler Tablo-1'de gösterilmiştir. Bu türler insan dahil, birçok memeli, kanatlı ve soğuk kanlı hayvanların özellikle sindirim ve genital kanallarında bulunmaktadır. Yürürlükteki Campylobacter sınıflandırmasına dahil türlerin konakçıları ve neden oldukları infeksiyonlar Tablo-2'de gösterilmiştir.

(*) Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü Uzm. Vet. Hek.

Campylobacter'ler Schizomycetes sınıfının, Pseudomonadales takımının, Spirillaceae ailesine bağlı bir cinstir (14). Campylobacter'ler gram negatif, hareketli, kapsülsüz, sporsuz, asido-rezistans olmayan, mikroaerofilik, kıvrımlı çomakçıklar şeklinde mikroorganizmalardır. Uçları genellikle noktali olan hücreler, sahip oldukları kıvrımların sayısına göre mikroskopta "virgül", "S" ve "martı kanadı" şeklinde görülürler (10). Bakterilerin boyları 0.2 - 0.4 x 1.5 - 3.5 mikrometre arasındadır (6,53). Karmali ve ark. (26), C.jejuni suşlarının 1.12 x 0.48 mikrometre boylarında, C.fetus suşlarının ise 1.80 - 2.43 x 0.55 - 0.73 mikrometre boyutlarında olduğunu belirterek, türler arasındaki büyüklük farkını ortaya koymuşlardır. Aynı türe bağlı suşlar arasında bile özellikle üreme koşullarına bağlı olarak küçük şekil farklılıkları bulunabilmektedir. Özellikle termofilik Campylobacter'ler uygun olmayan koşullarda üretildiklerinde ve eski kültürlerde küre şeklinde kokoid formlara dönüşürler (12). Bunlar mikroorganizmanın dejeneratif şekli olup, otolitik olaylar sonucu üreme yeteneklerini de kaybetmişlerdir (12).

Tablo-1 : Çampylobacter türlerinin bugünkü ve geçmişteki adlandırılmaları.

Tür adı	Geçmişteki adları
C.fetus subsp. Venerealis	C.fetus subs. fetus, Vibrio fetus, V.fetus, subsp. fetus, V.fetus var.venerealis
C.fetus subsp. fetus	C.fetus subsp. intestinalis, V.fetus, V.fekus var. intestinalis
C.jejuni	C.fetus subsp. jejuni, V.jejuni, V.fetus, "related vibrio"
C.coli	V.coli, C.fetus subsp. jejuni
C.laridis	(NARTC)Nalidiksik aside direçli termofilik Campylobacter
C.fecalis	V.fecalis
C.sputorum subsp.sputorum	C.sputorum var. sputorum, V.sputorum
C.sputorum subsp.bubulus	C.sputorum var. bubulus, C.bubulus, V.bubulus
C.sputorum subsp.mocosalis	
C.concicus	
C.hyointestinalis	
C.nitrofigilis	
C.cinaedi	CLO-1
C.fennelliae	CLO-2
C.pyloridis (Helicobacter pylori)	"pyloric campylobacter", C.pylori
C.cyraerophila	Aerotolerant campylobacter

CLO = "Campylobacter Like Organism"

Tablo-2 : Campylobacter türlerinin yaptıkları hastalıklar ve konakçıları.

	Tavuk	İnsan	Sığır	Koyun	Köpek	Kedi	Domuz	Diğer
<i>C.fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	S	A	A	-	-	-	-
<i>C.fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	-	-	A,I	-	-	-	-	-
<i>C.jejuni</i>	K,H	E	K,F	A,K,E	A,E,K	E,K	K	-
<i>C.coli</i>	K	E	K	A,K	K	K	E,K	-
<i>C.laridis</i>	K	E	K	K	K	K	K	-
<i>C.fecalis</i>	-	-	E	K	-	-	-	-
<i>C.sputorum</i> subsp. <i>sputorum</i>	-	-	K	-	-	-	K	-
<i>C.sputorum</i> subsp. <i>mucoalis</i>	-	-	-	-	-	-	E	-
<i>C.sputorum</i> subsp. <i>bubulus</i>	-	-	K	-	-	-	-	-
<i>C.conciscus</i>	-	P	-	-	-	-	-	-
<i>C.hyointestinalis</i>	-	-	E	-	-	-	-	-
<i>C. pyloridis</i>	-	G	-	-	-	-	-	-
<i>C. nitrofigilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	Su, göl bitki
<i>C.cinaedi</i>	-	E	-	-	-	-	-	-
<i>C.fennelliae</i>	-	E	-	-	-	-	-	-
<i>C.eryaerophila</i>	-	-	A	A	-	-	-	-

A = Abortus, S = Septisemi, K = Komensal, i = Infertilite, H = Enteritis, P = Periodonditis, G = Gastiritis.

Termofilik Campylobacter'ler besiyerinin nem oranına bağlı olarak değişik koloni formları gösterirler (16,17). Bunlar kurutulmuş besiyeri üzerinde konveks, düzgün kenarlı, gri-sarımsı renkli ve 1 mm çapında koloniler oluşturmalarına karşın, nemli ve taze besiyerleri üzerinde yaygın, basık, düzensiz kenarlı, sulu ve pembemsi renkte koloniler oluştururlar (11).

Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalar sonucunda bu bakterilerin hücre duvarı üzerinde bir hücre membranı belirlenmiştir (6,43). İki katmandan oluşan bu membran, hücre duvarı üzerine dalgalı ve gevşek bir şekilde yayılmıştır.

Campylobacter'lerin hücre duvarı, dışta bir lipoprotein tabakası, ortada lipopolisakkarit tabakası ve içte mukoprotein tabakaları olmak üzere üç katmandan oluşmaktadır. Hücre duvarının, tripsin veya pepsin gibi enzimlerle muamelesi sonucunda alanin, glisin, glutamik asit, aspartik asit, sistein veya diamino pimelik asitten ibaret organik maddeler açığa çıkmaktadır (53).

Hücrenin bir veya her iki ucunda tek bir polar flagella bulunur. Campylobacter'ler bu flagella yardımı ile "tirbüşon" veya "kurbağa larvası" benzeri hareketlerini çok hızlı olarak gerçekleştirirler. Flagella oldukça kalındır. Çapı ortalama 18-20 nanometre, boyu ise hücrenin 2-3 katı kadardır. Flagellin adı verilen 62.000 molekül ağırlıktaki proteinin yapısında sistein dışındaki tüm amino asitler saptanmıştır (36, 53).

Termofilik Campylobacter'lerin DNA guanin + sitozin (G + C) oranları diğer türlerden ve birbirlerinden farklıdır. C.jejuni suşlarında bu oran 31 mol olduğu halde C.coli'de % 32.6 - 34 mol ve C.laridis'de %32.1 mol olduğu bildirilmiştir (28, 52).

Campylobacter'ler metabolizmalarında karbonhidratları kullanmazlar ve glikozu fosforolize etmezler. Gerekli olan enerjiyi trikarboksilik asit siklüsünden sağlarlar (21).

Campylobacter'ler üremek için hem oksijene hem de karbondioksit gereksinim gösteren mikroaerofilik mikroorganizmalardır. Normal atmosferdeki % 21 oranında bulunan O₂ bu mikroorganizmaların üremelerini engeller. Bunların üremesi için optimal atmosferin % 5 O₂ ve % 10 CO₂ ile sağlandığı bildirilmiştir (15,19,57). Bu mikroorganizmaların mikroaerofilik karakterleri üzerinde yapılan çalışmalar, eksojen süperoksit anyonlarına ve hidrojen peroksit duyarlı olduğunu göstermiştir (22). Kültürlere katılan demir sülfat, sodyum metabisülfat ve sodyum piruvat kombinasyonu (FBP) ile mikroorganizmanın oksijene toleransını artırmak mümkündür (23).

Campylobacter'ler diğer gram negatif bakteriler gibi somatik hücre duvarı antijenine ve flagella antijenine sahiptirler (5).

Bu mikroorganizmaların kanatlı hayvanlarda ilk kez tanınmaları, hepatitis olgularından izolasyonları ile başlamıştır. Nedeni mikrobiyolojik ve metabolik olabilen hepatitis, tavuklarda çok eskiden beri bilinen bir hastalıktır. Çeşitli araştırmacılar, zaman zaman gram negatif bir bakteri ile ilişkili olduğunu belirtmelerine karşın, birbirlerinden bağımsız olarak ilk kez Hofstad ve ark. (24), ve Peckham (39) hastalığı "Vibrio" ile ilişkili bir infeksiyon olarak tanımlamışlardır. İzole ettikleri mikroorganizmalarla deneysel infeksiyon oluşturmayı başardıklarını bildirmişlerdir.

Tavuk *Campylobacter* hepatitisi, tavuklarda yüksek morbidite, düşük mortalite, kronik seyir ile izlenen bulaşıcı bir hastalıktır (40). Bu infeksiyon 1950 ve 1960 yıllarında birçok Avrupa ülkesi ve ABD'de yaygın olarak görülmüştür. Son yıllardaki insidensinin azalmasına kafes tavukçuluğuna geçiş gösterilmektedir (24,40). Hastalığın deneysel inkübasyon süresi 2-15 gündür. Klinik belirti olarak yumurta veriminin istenen düzeye çıkamaması veya piktteki verimin aniden % 30 kadar düşmesi söylenebilir. Yumurta ve yumurta kabuğu kalitesinde bir değişiklik bildirilmemiştir. Hastalığa bağlı en önemli lezyon karaciğerde oluşur (4). Karaciğerdeki lezyonlar yangısel ve nekrotik tiptedir. Büyüme, soluk renk küçük sarı nekrotik odaklar, büyük hemorajik alanlar bulunabilir. Karaciğerde yırtılmış kapsül ya da büyük kan pıhtılarına rastlanabilir. Patolojik lezyonların gelişimi portal bölgede lenfositik ve granülositik infiltrasyon ile başlar. Lenfositlerin ve granülositlerin fokal birikimi, fokal nekrozis ile sonuçlanır (40). Truscott ve Stockdale (56), infeksiyöz hepatitisli tavuk dışkılarında ve safra keselerinden vibrioları izole ettiklerini bildirmişler ve bu suşların hepatitise neden olan suşlar ile aynı özellikleri taşıdıklarını belirtmişlerdir. Bundan sonra, izolasyon yöntemlerindeki nızlı gelişmeleri takiben, termofilik *Campylobacter*'lerin tavuk barsaklarında yüksek oranlarda buldukları belirlenmiştir (29,30,32).

Evcil kanatlıların dışında birçok yabancı kara ve su kuşunun bu bakterileri taşıdıkları ortaya konulmuştur (58).

Değişik tavuk yaş gruplarından *Campylobacter* türlerinin izolasyon sıklıklarını karşılaştıran çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmalar sonucunda da *Campylobacter*'lerin barsaklarda kolonizasyonunun çeşitli faktörlerin etkisi altında olduğu belirlenmiştir. Pokamunski ve ark (42), değişik sürülerde *Campylobacter* kolonizasyonunun farklı zamanlarda başladığını ve bu sürenin 4-8 hafta arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Neill ve ark. (34) ise, kolonizasyonun ikinci haftadan sonra başladığını açıklamışlardır. Soerjadi ve ark. (54, 55) SPF (Specific Pathogen Free) civcivlerle yaptıkları denemelerinde, doğal barsak florasının *Campylobacter* kolonizasyonu üzerinde önemli etkisi bulunduğunu ileri sürmüşlerdir. Aynı araştırmacılar doğal barsak florasındaki bakterilerin sayısının artmasının, *Campylobacter* kolonizasyonunu güçlendirdiğini ve SPF civcivlerde tüm barsak bölümlerinin kolonize olmasına rağmen, konvansiyonel civcivlerde daha çok kalın barsakların kolonize olduğunu ortaya koymuşlardır.

Campylobacter'lerin tavuklar arasında yayılmasında vertikal bulaşmanın önemli bir unsur olmadığı ve bu mikroorganizmaların yumurtada çok nadiren bulunduğu bildirilmiştir (18, 47). Neill ve ark. (35) ve Shane ve ark. (46) ticari ve embriyolu yumurtaları deneysel olarak infekte etmeye çalışmışlar ancak bunu başaramamışlardır.

Campylobacter'lerin barsaklarda yüksek oranlarda bulunmasından ötürü tavuk karkaslarının çeşitli bölümlerinden de çok sayıda termofilik Campylobacter'ler izole edilmektedir (42). Shanker ve ark. (48) işlenmiş 40 broiler karkasının 18'inden C.jejuni ayırdıklarını bildirmişlerdir. Acuff ve ark. (1), kanatlı karkaslarından sırasıyla % 94 ve % 100, Barot ve ark. (3) karaciğer yüzeylerinden % 64 oranında, Kinde ve ark. (27) tavuk kanatlarından % 82.9 oranında C. jejuni izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bu kontaminasyonla ilgili olarak mezbahalarda kullanılan su örnekleri de incelenmiş ve 10 ayrı yerden alınan su örneklerinin % 90'undan Campylobacter türlerinin izolasyonu yapılmıştır (60).

Bu mikroorganizmaların -20°C'de dondurulmuş tavuk karkaslarında 64 gün ile 26 hafta arasında, karaciğer yüzeyinde ise 84 gün yaşayabildiği tesbit edilmiştir (38,59).

Konunun insan sağlığı yönünden önemini kavramak için tüketime hazır olan tavuk ürünlerinden bile yüksek oranda izolasyonuna bakmak yeterlidir (7,37). Skirrow ve ark. (51) insanlardaki Campylobacter enteritlerinin en önemli kaynaklarından birisinin iyi pişmemiş tavuk eti olduğunu ortaya koymuşlardır.

Campylobacter infeksiyonlarının laboratuvar teşhisi, diğer bakterilerin izolasyon ve identifikasyonunda kullanılan ve bugün için klasikleşmiş sayılan bakteriyoskopi, kültür ve serolojik yöntemlerle yapılır (2). C.jejuni izolasyonu için; direk ekim yöntemi ve rektal eküvyonlar yardımı ile alınan örneklerden ekim şekli karşılaştırıldığında, eküvyonlarla yapılan ekim yönteminin daha üstün olduğunu ortaya koymuştur (20,25,44).

Campylobacter'ler için hazırlanan selektif besiyerleri, içlerine çeşitli konsantrasyonlarda ve değişik antimikrobiyel ajanların katılması ile hazırlanır. İlk kez Butzler ve ark. (13) tarafından geliştirilen Campylobacter selektif besiyerlerini daha sonra Skirrow (49), Blazer ve ark. (8) Bolton ve Robertson (9) tarafından hazırlanan selektif antibiyotik bileşimleri izlemiştir. Bu besiyerlerinin rutin uygulamaya girmesi ile Campylobacter izolasyon oranlarında büyük artışlar olmuştur.

MATERYAL VE METOT

Örneklerin toplanması : Campylobacter türlerinin izolasyonunda kullanılmak üzere 1989 yılında değişik kesimhanelerden 4 grup halinde toplam 185 adet tavuk karaciğeri alındı. Toplanan karaciğerlerin hepsi broiler

ırkı değişik yaş gruplarından tavuklara aitti. Ayrıca, Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü tavuk hastalıkları teşhis laboratuvarına çeşitli çiftliklerden getirilen, hepatitis şüphesi bulunan yumurtacı ırka ait hasta tavuklardan 124 adet karaciğer toplandı. Hasta tavuklardan alınan karaciğer örnekleri steril petri kutularında -20°C'de tutularak en geç 3 gün içinde incelendi.

İncelenen örnekler ve marazi maddelerle ilgili toplu bilgiler Tablo-3'de gösterilmiştir.

Besiyerleri :

Campylobacter Blood-free selective agar Base (Oxoid) : Cappylobacter türlerinin izolasyonu amacıyla kullanılan bu besiyerinin içeriği aşağıda belirtilmiştir. Nutrient broth No: 2, 25.0 g; Bacteriological charcoal, 4.0 g; Casein hydrolysate, 3.0 g; Sodium deoxycholate, 1.0 g; Ferrous sulphate 0.25 g; Sodium pyruvate, 0.25 g; agar, 12.0 g. Bu besiyeri sterilize edildikten sonra 50°C'ye soğutulup, içine Cefoperazone Selective Supplement'i (Oxoid) (Cefoperazone 32 mg/litre) eklendi.

Thiol besiyeri : İzole edilen mikroorganizmaları pasaj yapmak ve çeşitli ısı derecelerinde üremelerini saptamak amacıyla yarı-katı Thiol medium (Difco) kullanıldı.

Yarı-katı Brusella buyyonu : Çeşitli biyokimyasal testler ve üreme testlerinde kullanılan bu besiyeri Brusella broth (Difco) içine % 0.16 oranında agar katılarak hazırlandı.

Tablo-3 : Campylobacter türlerinin izolasyonu için kullanılan örnekler ve marazi maddeler.

Kuruluş	Çiftlik	ırkı	Yaş (Hafta)	Toplanan örnek	Sayısı
Kamu	A	Broiler	8	Karaciğer	50
"	B	"	9	"	45
"	C	"	8	"	45
"	D	"	7	"	45
Hay.Has.Araşt.Enst. Tavuk H.Teş.Lab.		Yumurtacı	Çeşitli	"	124
TOPLAM					309

FBP Buyyonu : Çabuk H₂S testinde kullanılan bu besiyeri aşağıdaki formüle göre hazırlandı. Nutrient Broth No:2, 25 g; Demir sülfat 0.25 g; Sodyum metabisülfid 0.25 g; Sodyum piruvat 0.25 g; Distile su, 1000 ml. Besiyeri otovlavda sterilize edildikten sonra karanlıkta saklandı.

DNA ase Agar (Oxoid) : Bu besiyeri DNA hidroliz testinde kullanıldı.

Charcoal Yeast Extract Agar (CLFA) : Charcoal Agar (Oxoid) içine % 0.5 yeast extract katılarak hazırlandı.

Standart Campylobacter Suşları : İzolasyon ve identifikasyon çalışmalarında kontrol suşları olarak kullanılan C.jejuni Penner serotip 1, C.coli ve C.laridis suşları A.Ü. Vet. Fak. Bakteriyoloji Anabilim Dalında sağlandı.

Campylobacter suşlarının izolasyonu : Campylobacter izolasyonu amacıyla toplanan marazi maddeler en seri şekilde ve uygun şartlarda laboratuvara nakledildi.

Çeşitli kaynaklardan alınan örnek ve marazi maddelerden besiyerlerine, aşağıda belirtilen şekilde ekimler yapıldı.

Karaciğerin üzeri kızgın spatül ile dağlandıktan sonra, steril svaplarla karaciğerin içinden inokulum alındı. Bu svap direk olarak Campylobacter blood-free selective agar üzerine sürüldü. Ekim yapılan besiyerleri katalizörsüz anaerobik jarlar içinde ve mikroaerofilik koşullarda (% 5 O₂, % 10 CO₂ ve % 85 N₂) 42°C'de en az 48 saat inkübe edildi. Gerekli atmosferik koşullar anaerobik jarın içine Gas-Pak (Oxoid) hazır anaerobik sistem kiti konularak sağlandı.

Campylobacter suşlarının identifikasyonu : Üreyen mikroorganizmaların koloni morfolojileri, Campylobacter'ler yönünden incelendi. Ayrıca, tipik Campylobacter kolonileri seçilerek, bunlar gram yöntemi ile boyandı. Karanlık sahada ve faz-kontras mikroskopunda hareket muayeneleri yapıldı. Campylobacter'lerin karakteristik "virgül" ve "s" şekillerini gösteren ve hareketli olan mikroorganizmalar sonradan incelenmek üzere % 15 gliserinli brucella buyyona ekilip, -80°C'de saklandı. İzole edilen Campylobacter'lerin identifikasyonları, biyokimyasal testler ve üreme testleri ile yapıldı.

Biyokimyasal testler : Campylobacter suşlarının ayırımı ve türlerinin identifikasyonu için aşağıdaki biyokimyasal testler yapıldı. Bu testlerin yapılışı sırasında pozitif ve negatif kontroller kullanıldı.

a - *Katalaz testi* : Agar üzerindeki taze üremeden bir öze dolusu alınarak lam üzerinde bir damla % 5'lik H₂O₂ içinde süspanse edildi. Gaz kabarcıklarının görülmesi pozitif kabul edildi.

b - *Oksidaz testi* : Taze agar kültüründen alınan bir öze dolusu koloni, Bact-ident Oxidase (Merck) hazır kağıt şeridi üzerine sürüldü. Kağıt şeri-

din normalde pembe olan renginin 20-60 saniye içinde mor renk alması pozitif, rengin sarıya dönmesi veya değişmemesi negatif sonuçlar olarak değerlendirildi.

c - *H₂S oluşumu* : İki değişik yöntem ile incelendi.

1. *Kağıt şerit yöntemi* : Taze kültürden % 0.025 sistein hidroklorid içeren yarı-katı brusella buyyona ekim yapıldı ve üzerine kurşun asetatlı kağıt şerit yerleştirildi. Normal atmosferde 5 gün içinde şeridin rengindeki kararma pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

2. *Çabuk yöntem* : Taze kültürden FBP buyyona ekim yapıp, oda ısısında 4 saat bekletme sonucu ekim yapılan noktada kararma pozitif reaksiyon olarak kabul edildi.

d - *Hippurat hidrolizi* : Bu test için, % 1'lik sodyum hippurat (Merck) solusyonu hazırlanarak, 0.4 ml miktarında küçük vida kapaklı şişelere konuldu ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı. Test yapılacağı zaman bu substrat çözündürülerek içinde taze kültürden alınan Campylobacter kolonileri yoğun şekilde süspanse edildi. Şişeler 37°C'de 2 saat inkübasyondan sonra, üzerine 0.2 ml ninhidrin ayırıcı eklendi ve 10 dakika daha bekletildi. Karışımın renginin koyu mor olması hippuratın hidrolize olduğunu, açık mor renk ise olmadığını gösterdi.

e - *DNA hidrolizi* : DNA ase test agar üzerine nokta şeklinde ekim yapıp 37°C'de mikroaerofilik koşullarda 2 gün bekletildi. Inkübasyondan sonra besiyeri üzerine 1 N HCl asit dökülerek 1 dakika çalkalandı. koloni çevresinde berrak bir alan oluşması pozitif olarak değerlendirildi.

Üreme özelliklerinin saptanması :

a - *25°C'de üreme* : Taze kültürlerden yarı-katı Thiol besiyerine ekim yapıp 25°C'de 5 gün inkübe edildi. Süre sonunda gözle görünen üremeler değerlendirildi.

b - *CYE agarda üreme* : Taze Campylobacter kültüründen CYE agar ekim yapıp 37°C'de 3 gün inkübasyondan sonra koloni oluşumu incelendi.

c - *Aerobik koşullarda üreme* : Agar üzerine ekilen Campylobacterler normal atmosferik koşullarda 37°C'de 5 gün bekletildiler ve üreme yönünden incelendiler.

Çeşitli maddelere toleransının saptanması :

a - *Glisin tolerans testi* : % 1 glisin içeren yarı-katı brusella besiyerine taze kültür ekildi ve 37°C'de 5 gün bekletilip üreme durumu incelendi.

b - *Tuz tolerans testi* : % 3.5 NaCl içeren yarı-katı brusella buyyona ekim yapıp 37°C'de 5 gün inkübasyondan sonra değerlendirildi.

c - *Nalidiksik asit ve Cephalothine duyarlılık* : Taze kültür % 7 defibri-ne koyun kanlı Mueller-hinton agar üzerine yayıldı ve üzerine ayrı ayrı nalidiksik asit diski (30 mcg) ve Cephalothine diski (30 mcg) yerleştirildi. Mikro-aerofilik koşullarda 48 saat inkübasyondan sonra diskler çevresindeki üreme zonu ölçülerek değerlendirildi.

Campylobacter türlerini diğer bakterilerden ayırmak için pozitif oksidaz ve katalaz testleri, mikroaerofilik koşullara gereksinim, makroskopik ve mikroskopik morfoloji kriterleri kullanıldı.

Termofilik Campylobacter türlerinin identifikasyonu : Bunları diğer Campylobacter türlerinden ayırmak için 42°C'de üreme, 25°C'de ürememe özelliklerinden yararlanıldı. Hippurat testinde pozitif bulunan suşlar C.jejuni olarak identifiye edildi. Hippurat negatif, çabuk H₂S testi negatif ve nalidiksik asite duyarlı suşlar C.coli olarak değerlendirildi. Hippurat negatif ve nalidiksik asite dirençli suşlar ise C.laridis olarak ayrıldı. Termofilik Campylobacter türlerinin identifikasyon kriterleri Tablo-4'de gösterilmiştir.

Termofilik Campylobacter'lerin biyotiplendirilmesi : C.jejuni Skirrow ve Benjamin (51) tarafından geliştirilen biyotiplendirme sistemine göre çabuk H₂S testi ve hippurat hidrolizi ile iki biyotipe ayrıldı (Tablo-5).

Ayrıca, Lior (32) tarafından önerilen biyotiplendirme sistemi ile C.jejuni 4, C.coli 2 ve C.laridis 2 biyotipe ayrıldı. Bu biyotiplendirme sisteminde hippurat hidrolizi testi, DNA hidroliz testi ve çabuk H₂S testi kullanıldı (Tablo-6).

Tablo-4 : Termofilik Campylobacter türlerinin ayırımında kullanılan testler.

Testler	C.jejuni	C.coli	C.laridis
25°C'de üreme	-	-	-
42°C'de üreme	+	+	+
Cephalothin	Dirençli	Dirençli	Dirençli
Nalidiksik asit	Duyarlı	Duyarlı	Dirençli
Hippurat hidroliz	+	-	-
Çabuk H ₂ S	+	-	+

Tablo-5 : Skirrow-Benjamin biyotiplendirme şeması

Testler	C.jejuni Biyotip 1	C.jejuni Biyotip 2
Hippurat hidroliz	+	+
Çabuk H ₂ S testi	-	+

Tablo-6 : Lior biyotiplendirme şeması

Testler	C.jejuni				C.coli		C.laridis	
	I	II	III	IV	I	II	I	II
Hippurat hidroliz	+	+	+	+	-	-	-	-
Çabuk H ₂ S testi	-	-	+	+	-	-	+	+
DNA hidroliz	-	+	-	+	-	+	-	+

BULGULAR

İzolasyon ve identifikasyon çalışmaları : İncelenen 309 adet broiler ve yumurtacı ırklara ait tavuk karaciğerlerinin 68 (%22)'sinden Campylobacter türleri izole edildi. Bunlardan, mezbahadan 4 ayrı grup halinde alınan 185 adet broilerin 63 (% 34)'ünde Campylobacter türlerinin varlığı belirlendi. Bu örneklerin toplandığı 4 sürünün 3'ünden Campylobacter türleri izole edildi. Üreme olmayan diğer gruptaki hayvanlara kesim öncesine kadar antibiyotik uygulandığı belirlendi. Bu grup gözlem dışı bırakıldığında kalan 3 gruba ait toplam 140 karaciğer örneğinden izolasyon oranı % 45 olarak saptandı.

Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü Tavuk Hastalıkları teşhis laboratuvarına gelen yumurtacı ırklara ait toplam 124 adet tavuk karaciğerinden 5 (% 4)'ünde Campylobacter türlerinin varlığı belirlendi. Yapılan araştırma sonucu laboratuvarımıza getirilen hayvanların tamamına yakın kısmına belirli periyotlarla antibiyotik kullanıldığı, bir çoğunda yem katkısı olarak antiyotik aldığı belirlendi.

Bu araştırma sonucunda izole edilen Campylobacter'lerin biyokimyasal ve üreme testleri ile identifikasyonlarının sonucuda ayrılan türler ve bunların sürülere dağılımı Tablo-7'de gösterilmiştir.

İncelenen 309 tavuk karaciğerinden 30 (% 9.7) C.coli, 38 (% 12.2) c.jejuni suşu izole ve identifiye edildi. Antibiyotik uygulanmış grup değerlendirildi.

dirme dışı tutulduğunda 264 örnekten bu türlerin izolasyon oranları sırasıyla % 11.3 ve % 14.3 oldu. C.coli ve C.jejuni Campylobacter türlerinin izole edildiği tüm sürülerde bulunurken, C.laridis hiç izole edilemedi.

Laboratuvarımıza getirilen hasta tavuklara ait 124 adet karaciğerin (% 2.4)'ünden, C.coli, 2 (% 1.6)'sından C.jejuni ayrıldı. Hepatitisi şüphesi olmayan broiler ırkına ait antibiyotik kullanılan grup çıkarıldığında geri kalan 140 adet karaciğerden 27 (% 19.2)'sinde C.coli, 36 (% 25.7)'sinde C.jejuni suşu izole ve tanımlanmıştır. Karaciğerlerden izole edilen C.jejuni suşlarının C.coli'ye oranı 1.2 olarak belirlendi.

Tablo-7 : Tavuk karaciğerlerinden izole edilen Campylobacter türleri ve dağılımları.

Grup	İncelenen örnek sayısı	İzole edilen türler			Toplam
		C.coli	C.jejuni	C.laridis	
A	124	3	2	-	5
B	50	7	6	-	13
C	45	12	16	-	28
D	45	8	14	-	22
E ^x	45	-	-	-	-
Toplam	264^a	30	38	-	68

x : Antibiyotik uygulanan grup

a : Antibiyotik uygulanan grup değerlendirme dışı tutulmuştur.

Biyokimyasal ve üreme özelliklerinin belirlenmesi : Tavuk karaciğerlerinden izole edilen termofilik Campylobacter'lerin çeşitli biyokimyasal ve üreme özellikleri Tablo-8'de gösterilmiştir. İzole edilen Campylobacter'lerin en geç 48 saat içinde besiyeri üzerine yayılan, düzgün kenarlı, basık, sulu görünüşlü ve gri-pembe renkte koloniler oluşturdukları gözlemlendi. Genel görünüşleri yanında türlere bağlı olmaksızın koloniler arasında büyüklük ve bazı şekil farklılıkları belirlendi.

Campylobacter'lerin çoğu ilk izolasyonlarda besiyerinin tümünü kaplayan yoğunlukta ve kolonilerin büyük bir kısmı besiyerine yapışık olarak ürediler. Çok az bir kısmında ise birkaç koloni yoğunlukta ürediler. Bu izolasyonların yapıldığı besiyerlerinde hiç kontaminant bakteri belirlenmedi.

Karanlık saha ve faz-kontras mikroskobu ile incelenen C.coli, C.jejuni suşlarının tamamı hareketli bulundu. Gram boyama yöntemi ile incelenen izolatların tümü "s" ve "virgül" şeklinde görüldü.

İncelenen C.coli ve C.jejuni suşlarının tümü oksidaz, katalaz, kurşun asetatlı kağıt şerit yöntemi ile incelenen H₂S oluşumu testinde pozitif sonuç verdiler. C.coli ve C.jejuni suşlarının DNA hidrolizasyon oranları sırasıyla % 13.9, % 13.1 olarak belirlendi. Sadece C.jejuni suşlarının tümü hippuratu hidrolize etti. C.coli suşlarının tümü ise çabuk H₂S testinde negatif bulundu.

İlk izolasyonlarda 42°C'de üretilen Campylobacter'lerin hiçbirisi aerobik atmosferde ve % 3.5 NaCl varlığında üremedi. Her iki türün suşlarının çoğunluğu % 1 glisine tolerans gösterdiler (C.coli : % 98.9, C.jejuni : % 98.8).

Tavuk karaciğerlerinde izole edilen termofilik Campylobacter türlerinin biyokimyasal ve üreme özellikleri Tablo-8'de gösterilmiştir.

Tablo-8 : Tavuk karaciğerlerinden izole edilen termofilik Campylobacter türlerinin biyokimyasal ve üreme özellikleri.

Testler	C.coli (n = 30)	C.jejuni (n = 38)
Oksidaz	100.0	100.0
Katalaz	100.0	100.0
H ₂ S Kurşun asetat testi	100.0	100.0
hippurat hidroliz	0.0	100.0
DNA hidroliz	13.9	13.1
25°C'de üreme	0.0	0.0
% 3.5 NaCl'de üreme	0.0	0.0
% 1 glisin'le üreme	98.9	98.8
Aerobik üreme	0.0	0.0
CYE agarda üreme	100.0	100.0
Nalidiksik aside dirençlilik	0.0	0.0
Cephalothine dirençlilik	100.0	100.0

Biyotiplendirme çalışmaları : Karaciğerlerden izole edilen Campylobacter türlerinin Skirrow-Benjamin ve Lior sistemleri ile yapılan biyotiplendirmelerinin sonuçları Tablo-9'da gösterilmiştir.

Tablo-9 : Karaciğerlerden izole edilen Campylobacter türlerinin Skirrow-Benjamin ve Lior sistemlerine göre dağılımı.

Biyotip şeması	C.jejuni (n = 38)				C.coli (n = 30)	
	I	II	III	IV	I	II
Lior	17	8	13	-	19	11
Skirrow-Benjamin	25	13				

Tavuk karaciğerlerinden C.laridis izole edilemediği için Lior biyotiplendirme sisteminde bu biyotiplere ait suş ve ayrıca C.jejuni biyotip 4 bulunamadı.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Geliştirilen yeni izolasyon tekniklerinin uygulamaya konmasından sonra Campylobacter türleri son yıllarda gerek insan ve gerekse Veteriner Hekimliğe bağlı mikrobiyoloji dallarında oldukça fazla ilgi duyulan konulardan biri olmuştur. Bu çalışmalar sonucu Campylobacter'lerin birçok infeksiyonların etiolojisinde yer aldığı saptanmıştır. Buna en güzel örnek genç hayvanlar ve insanların enteritisleridir. Kanatlı hayvanlardaki infeksiyonlar ve bunların insan sağlığı ile yakın ilgisi sonucu bu mikroorganizmaların epidemiyolojik rolleri ile ilgili birçok çalışmalar yapılmıştır.

Bu çalışmada 5 ayrı grupta incelenen 309 adet karaciğer örneğinin yapılan incelemesi sonucu 68 (% 22) adet Campylobacter türlerine ait mikroorganizmalar izole edilmiştir. Ancak, incelenen 45 adetlik karaciğer grubunun ait olduğu bir grup tavukta kesim anına kadar antibiyotik kullanıldığı saptandığı için bu grubun değerlendirme dışı bırakılması halinde geriye kalan 264 adet karaciğerden izolasyon oranı ise % 25.7 olarak saptanabilir. Fakat burada çeşitli hastalıklardan dolayı laboratuvarımıza getirilen 124 adetlik grubu teşkil eden karaciğer örnekleri incelendiğinde, çoğunluğa yakın kısmına, tüm yetiştirme periyodunca gerek içme suları gerekse yem katkısı olarak antibiyotik uygulanmış olduğu gözlemlenmiştir. Bu grubu da değerlendirme dışı bıraktığımızda, kalan 3 gruba ait 190 adet karaciğer örneğinden izolasyon oranı % 33.1 olmaktadır.

Bu konuda diğer ülkelerde yapılan çalışmalarda, değişik sonuçlar elde edilmiştir. Ancak, şimdiye kadar Türkiye'deki varlığından şüphelenilmiş (17) olan hepatitis (vibrionik) hastalığının varlığı konusunda kesin sonuçlara varılamamıştır. Makroskopik olarak hepatitis durumu saptanmayan ve kamuya ait mezbahalardan alınan normal karaciğerlerden izolasyon oranının, laboratuvara getirilen ve tamamına yakını hepatitis şüpheli karaciğer-

lerden yapılan izolasyon oranına göre çok yüksek bulunması, bu hastalığın tanısını güçleştirmektedir. Ancak, Peckham (40)'ın tanıdaki sorunlara ilişkin açıklaması konuyu aydınlatmaktadır. Bu araştırmada *Campylobacter* infeksiyonu bulunan sürülerde, ancak % 10 oranında karaciğer lezyonlarının görülebileceğini söylerken deneysel infeksiyonlarda bile belirgin karaciğer bozuklukları görülen hayvanlardan izolasyon yapılamadığını açıklamıştır. Buna dayanarak tavuklardaki hepatitis hastalığını değerlendirirken, patolojik, bakteriyolojik ve klinik bulguların tamamının değerlendirilmesi gerekmektedir.

Izolasyon oranını sürü düzeyinde incelersek, mezbahadan alınan 4 ayrı grup hayvandan /antibiyotik uygulanan grup dışlandığında) 3 grubun % 45'inde *Campylobacter*'lerin izole edildiği görülmektedir. Ayrıca, bu değerlendirmenin kesim periyodundaki broilerlerde yapıldığı düşünülürse konunun insan sağlığı yönünden önemi birkez daha ortaya konmaktadır. Aynı konuda yapılan diğer bir çalışmada ise izolasyon oranı % 85.7 olarak bulunmuştur (17).

Çeşitli ülkelerde tavuk barsaklarından ve dışkılarından izole edilen termofilik *Campylobacter*'lerin oranı % 40-75 arasında değişmektedir (29, 41,47). Buna benzer bir çalışmada ise hindilerden izolasyon oranı % 100 ile en yüksek orandır (32).

Tavuklardan *Campylobacter* türlerinin izolasyonu yönünden diğer ülkelerde elde edilen oranların, bu çalışmadakinden daha yüksek olması çeşitli nedenlere bağlanabilir. Öncelikle izolasyon oranını etkileyecek en önemli faktörün organ seçimi olduğu düşünülürse, zaten normal barsak florasında var olan *Campylobacter*'lerin buradan daha yüksek oranda izole edilebilmesi doğaldır. Seçilen yöntemin, besiyerinin ve örneklerin alınma şeklinin izolasyon oranını etkileyebileceği açıklanmıştır. Nitekim; Diker ve Yardımcı (16) örneklerin, barsaktan eküvyonla alınmasının izolasyon oranını artırdığını bildirmişlerdir. Biz de bu çalışmamızda karaciğerden alınan örneklerin eküvyonla alınmasına özen gösterdik. Diğer taraftan bu araştırmada ilk kez modifiye preston selective besiyeri kullanılmıştır. Fricker ve ark. (20) da, karşılaştıkları 4 değişik selektif besiyeri içinde en yüksek izolasyon oranını Preston selektif besiyeri ile elde ettiklerini bildirmişlerdir. Diğer araştırmalarda ise Preston selektif besiyeri çok nadiren kullanılmıştır. Tüm bu değerlendirmelerin ışığında diğer araştırmalarda yüksek oranda izolasyon yapılmasının, tavuk barsaklarının termofilik *Campylobacter*'lerin izolasyonu için çok uygun olduğu ortaya çıkmaktadır.

Yine bizim araştırmamızda laboratuvarımıza gelen 124 adetlik grubu oluşturan, çeşitli yaşlardaki yumurtacı ırklara ait tavuklardan % 4 gibi çok düşük düzeyde *Campylobacter* izolasyonunu ise şöyle değerlendirebiliriz. Öncelikle incelemeye aldığımız grubun tamamına yakın kısmının kafeste

olması, Campylobacter'lerin dışkı ve dolayısıyla altlıkla teması olanlarda daha çok bulaştığı sonucunu vermektedir. Ayrıca, yumurta tavuklarının daha uzun yaşam süreci olması nedeniyle, yaşlanan tavuklarda belirli bir dönemden sonra gelişen bağıışıklık nedeni ile Campylobacter'lerin elimine olacağı iddia edilmiştir (30). Bizim de bu çalışmamızda yumurtacı ırklarda çok düşük düzeyde bulduğumuz bu oran bu iddianın doğruluğunu kanıtlamaktadır.

Karaciğerlerden izole edilen Campylobacter'lerin identifikasyonu sonucu "Termofilik Campylobacter" olarak bilinen C.coli ve C.jejuni türleri ayrılmıştır. C.laridis'e ise bu çalışmamızda hiç rastlanmamıştır. Bu türlerin tavuklardaki varlığı ülkemizde Diker ve Yardımcı (17) tarafından bildirilmiştir. Diğer ülkelerde yapılan bazı araştırmalarda ise sadece C.jejuni'den bahsedilmiştir (47). Bunun nedeni ise 1984 tarihine kadar olanlarında, o zamanlar C.coli ve C.laridis, C.jejuni'nin biyotipleri olarak bilinmekteydi. Bu nedenle bunların hepsi C.jejuni diye isimlendirilmiş olabilir.

İzole ve identifiye edilen Campylobacter türlerinin biyotiplendirme çalışmaları sonucunda, C.coli'lerin büyük bir kısmının Lior biyotip I'e, C.jejuni'lerin çoğunluğunun Lior biyotip I ve Skirrow-Benjamin biyotip I'e dahil oldukları görülmüştür. Lior (31) da, bütün C.jejuni suşlarının çoğunluğunun biyotip I'e, C.coli suşlarının çoğunluğunun biyotip I'e girdiğini bildirmiştir. Skirrow-Benjamin (51) kendi geliştirdikleri sisteme göre kanatlı orijinli C.jejuni suşlarının % 52'sinin biyotip 2 olduğunu bildirmişlerdir. Bizim sonuçlarımız da aynı doğrultudadır.

Sonuç ve öneriler : Bu çalışmada elde ettiğimiz bulgular ile literatür bilgileri ele alındığında termofilik Campylobacter'ler olarak bilinen C.coli ve C.jejuni mikroorganizmalarının tavuklarda ve özellikle broiler piliçlerde yoğun bir şekilde bulunduğu anlaşılmıştır. Bu mikroorganizmalar doğal barsak florasında bulunmalarına karşın, karaciğerlere de transloke olabildikleri ve bu organda yoğun olarak buldukları belirlenmiştir. Bu durumun gerek tavuğun infeksiyon riski ve gerekse insanlara bulaşma aracı olarak değerlendirilmesi gerekir.

İnsan ve hayvan sağlığı yönünden önemi gözönüne alınarak hijyen tedbirleri alınması, araştırmacıların konuya daha fazla eğilimi ve kesimhanelerde çalışanların eğitimi gibi bazı konularda gerekli önlemlerin alınması zorunludur.

Ö Z E T

Bu araştırmada selektif izolasyon yöntemleri kullanılarak, termofilik Campylobacter türlerinin tavuk karaciğerlerinde yoğunluğunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü Tavuk hastalıkları teşhis laboratuvarına gelen yumurtacı ırklara ait tavuk karaciğerleri ile

mezbahalardan toplanan broiler karaciğerlerden eküvyonla alınan örnekler modifiye preston selektif besiyerine ekildi. Miroaerofilik koşullarda 42°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda üreyen mikroorganizmalar *Campylobacter* türleri yönünden üreme ve biyokimyasal testler ile incelendiler. İdentifiye edilen termofilik *Campylobacter* türleri iki farklı sistem ile biyotiplendirildiler.

İncelenen 4 broiler sürüsünün 3'ünde, laboratuvarımıza gelen 124 adet yumurtacı tavuğun 5'inde *Campylobacter* türleri saptandı. Kesim periyodundaki 7-9 haftalık broilerlerin % 45'inden *Campylobacter* izolasyonu yapılmıştır. Bunun % 44.1'i *C.coli*, % 55.8'i *C.jejuni* şeklinde identifiye edildi. Tavuk karaciğerlerinde *C.laridis* ise bulunamadı.

Lior biyotiplendirme sistemine göre izole edilen *C.jejuni* suşları 3 biyotipe, *C.coli* suşları 2 biyotipe ayrıldı. Suşların çoğunun biyotip I'de toplandığı tespit edildi. Skirrow-Benjamin biyotiplendirme sistemine göre 2 biyotipe ayrılan *C.jejuni* suşlarının çoğunun biyotip I'e girdiği saptandı.

S U M M A R Y

This study was aimed to calculate concentration of the thermophilic *Campylobacter* species in chicken liver by selective isolation. Liver samples collected by swab from layer which were referrals to Etlik Animal Disease Research Inst. Lab. and which were collected from slaughter house. Samples taken from liver were cultured by modified Preston selective and incubated at 42°C in microaerophilic atmosphere for 48 hours. The multiplied microorganism were examined by using growth and biochemical tests. Isolated species of thermophilic *Campylobacter* were biotyped by two different biotyping systems.

Campylobacter species were identified in a broiler flock of 3 out of 4, layer 5 out of 124 referrals in the lab.

In the of slaughtering broilers that aged were 7-9 weeks, *Campylobacter* was isolated at a percentage of 45 %, 44.1 % was *C.coli* and 55.8 % was identified as *C.jejuni*, *C.laridis* couldn't identified in chicken liver.

C.jejuni strains which were isolated by "Lior Biotyping system" had 3 biotypes and *C.coli* strains had 2 biotypes. Most of strains from all two species accumulated into biotype I of each species. In addition, *C.jejuni* strains were classified as biotype I (most of strains) and biotype 2 by using biotyping scheme of Skirrow-Benjamin.

K A Y N A K L A R

- 1 - ACUFF, G.R., VANDERZANT, C., HANNA, M.O., EHLERS, J.G., GOLAN, F.A. and GARDNER, F.A. (1986) : Prevalence of *Campylobacter jejuni* in Turkey carcass processing of turkey products. *J. Food Protect.*, 49 : 712-717.
- 2 - ARDA, M. (1978) : Genel Bakteriyoloji. A. Ü. Vet. Fak. Yay. No: 342, Ankara.
- 3 - BAROT, M.S., MOSENTHAL, A.C. and BOKKENHEUSER, V.D. (1983) : Location of *Campylobacter jejuni* in infected chicken livers. *J. Clin. Microbiol.*, 17 : 921-922.
- 4 - BAUDITZ, R. (1967) : Avian infectious hepatitis. *Vet. med. Rev.*, 1 : 21-34.
- 5 - BERG., R.L., JUTILA, J.W. and FIREHAMMER, B.D. (1971) : A revised classification of *Vibrio fetus*. *Am. J. Vet. Res.*, 32 : 11-22.
- 6 - BINNS, W. (1953) : An electron micrograph of *Vibrio fetus*. *Cornell Vet.*, 53 : 560-561.
- 7 - BLASER, M.J., TAYLOR, D.N. and FELDMAN, R.A. (1983) : Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections. *Epidemiol. Rev.*, 5 : 157-176.
- 8 - BLASER, M.J., BERKOWITZ, I.D., LAFORCE, F.M., CRAVENS, J., RELLER, B. and WANG, W-L.L. (1979) : *Campylobacter enteritis*: Clinical and epidemiological features. *Ann. Intern. Med.*, 91 : 179-185.
- 9 - BOLTON, F.J. and ROBERTSON, L. (1982) : A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. *J. Clin. Pathol.*, 35 : 462-467.
- 10 - BRYNER, J.H., FRANK, A.H. and O'BERRY, P.A. (1962) : Dissociation studies of vibrios from the bovine genital tract. *Am. J. Vet. Res.*, 23 : 32-41.
- 11 - BUCK, G.E. and KELLY, M.T. (1981) : Effect of moisture content of the medium on colony morphology of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. *J. Clin. Microbiol.*, 14 : 585-586.
- 12 - BUCK, G.E., PARSHALL, K.A. and DAVIS, C.P. (1983) : Electron microscopy of the coccoid form of *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.*, 18 : 420-421.
- 13 - BUTZLER, J.P., DEKEYSER, P., DETRAIN, M. and DEHAEN, F. (1973) : Related vibrio in stools. *J. Pediat.*, 82 : 493-495.
- 14 - BUXTON, A. and FRASER, G. (1977) : *Animal Microbiology*. I Blackwell Sci. Publ., Oxford.
- 15 - CARLONE, G.M. and LASCELLES, J. (1982) : Aerobic and anaerobic respiratory system in *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* grown in atmosphere containing hydrogen. *J. Bacteriol.*, 152 : 306-314.
- 16 - DIKER, K.S. ve YARDIMCI, H. (1986) : *Campylobacter jejuni* izolasyon yöntemlerinin karşılaştırılması ve nemin koloni morfolojisi üzerine etkisi. *Mikrobiyol. Bül.* 20 : 115-119.
- 17 - DIKER, K.S. and YARDIMCI, H. (1989) : Isolation and characterization of *Campylobacter* species from chickens. *Doğa Tu. Vet. Hayv. Derg.*, 13 : 257-264.
- 18 - DOYLE, M.P. (1984) : Association of *Campylobacter jejuni* with laying and eggs. *Appl. Environ. Microbiol.* 47 : 533-536.
- 19 - FLETCHER, R.D. and PLASTRIDGE, W.N. (1964) : Gaseous environment and growth of microaerophilic vibrios. *J. Bacteriol.*, 87 : 352-355.
- 20 - FRICKER, C.R., GIRDWOOD, R.W.A. and MUNRO, D. (1983) : A comparison of procedures for the isolation of *Campylobacter*'s from seagull faeces. *J. Hyg Comb.* 91: 445-450.

- 21 - GARCIA, M.M., EAGLESOME, M.D. and RIGBY, C. (1983) : *Campylobacter's* important in veterinary medicine. *Vet. Bull.*, 53 : 793-818.
- 22 - HOFFMAN, P.S., KRIEG, N.R. and SMIBERT, R.M. (1979a) : Studies of the microaerophilic nature of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*, I. Physiological aspects of enhanced aerotolerance. *canad. J. Microbiol.*, 25 : 1-7.
- 23 - HOFFMAN, P.S., GEORGE, H.A., KRIEG, N.R. and SMIBERT, R.M. (1979b) : Studies of the microaerophilic nature of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. II. Role of exogenous superoxide anions and hydrogen peroxide. *Canad. J. Microbiol.*, 25 : 8-16.
- 24 - HOFSTAD, M.S., McGEHEC, E.H. and BENNETT, P.C. (1958) : Avian infectious hepatitis. *Avian Dis.* 2 : 358-364.
- 25 - KAPLAN, R.L. GOODMAN, L.J., BARRETT, J.F. TRENHOLME, G.M. and LANDAU, W. (1982) : Comparison of rectal swabs and stool cultures in detecting *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. *J. Clin. Microbiol.*, 15 : 959-960.
- 26 - KARMALI, M.A., ALLEN, A.K. and FLEMING, P.C. (1981a) : Differentiating of catalase positive *Campylobacter's* with special reference to morphology. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 31 : 64-71.
- 27 - KINDE, H., DENIGEORGIS, C.A. and PAPPALOANOU, M. (1983) : Prevalence of *Campylobacter jejuni* in chicken wings. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45 : 1116-1118.
- 28 - LEAPER, S. AND OWEN, R.J. (1982) : Differentiation between *Campylobacter jejuni* and allied thermophilic *Campylobacter's* by hybridization of deoxyribonucleic acids. *FEMS Microbiol. Letters* 15 : 203-208.
- 29 - LEVI, A. and RICCIARDI, I.D. (1982) : *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* (*C.jejuni*) : identification of strains isolated from chickens in Rio de Janeiro. *Rev. Microbiol.* 13 : 332-334.
- 30 - LINDBLOM, G.B. SJOGREN, E. and KAIJSER B. (1986) : Natural *Campylobacter* colonization in chickens raised under different environmental conditions. *J. Hyg.* 96 : 385-391.
- 31 - LIOR, H. (1984) : New extended biotyping scheme for *Campylobacter coli*, and "*Campylobacter lariidis*". *J. Clin. Microbiol.* 20 : 636-640.
- 32 - LUECHTEFELD, N.W. and WANG, W.L.L. (1981) : *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in a turkey processing plant. *J. Clin. Microbiol.*, 13 : 266-268.
- 33 - McFADYEAN, F. and STOCKMAN, S. (1913) : Garcia ve ark. (1983) : tarafından bildirilmiştir.
- 34 - NEILL, S.D., CAMPBELL, J.N. and GREENE, J.A. (1984) : *Campylobacter* species in broiler chickens. *Avian. Pathol.* 13 : 777-785.
- 35 - NEILL, S.D., CAMPBELL, J.N. and O'BRIEN, J.J. (1985) : Egg penetration by *Campylobacter jejuni*. *Avian Pathol.* 14 : 313-320.
- 36 - NEWELL, D.G. (1983) The surface protein antigen including flagella of *C.jejuni*, *Abstr. Pap. sec. Int. Workshop Campylobacter infect.*, Brussels, p. 26.
- 37 - NORKRANS, G. and SVEDHEM, A. (1982) : Epidemiological aspects of *Campylobacter jejuni* enteritis. *J. Hyg.*, 89 : 163-170.
- 38 - OSTEROM, J., NOTERMANS, S., KARMAN, H. and ENGELS, G.B. (1983) : Origin and prevalence of *Campylobacter jejuni* in poultry processing. *J. Food protect.* 46 : 339-344.
- 39 - PECKHAM, M.C. (1958) : Avian vibriotic hepatitis. *Avian Dis.* 2 : 348-358.
- 40 - PECKHAM, M.C. (1984) : Vibriotic hepatitis. In *Diseases of Poultry*. Ed. M.S. Hofstad, 8th ed, pp. 221-229, Iowa State University Press, Ames, Iowa.

- 41 - PIANTERI, G., MAMOLO, G., CARFARELLI, A., BOSSI, G., BIGNAMINI, M.L. and BO, G. (1985) : The occurrence of *Campylobacter jejuni* in chickens, *L'Igiene Moderna* 83 : 510-517.
- 42 - POKUMUNSKI, S., KASS, N., BOROCHOVICH, E., MORANTZ, B. and ROGOL, M. (1986) : Incidence of *Campylobacter* spp. in broiler flocks monitored from hatching to slaughter. *Avian Pathol.* 15 : 83-92.
- 43 - RHOADES, N.F. (1954) : The illustration of the morphology of *Vibrio fetus* by electron microscopy. *Am. J. Vet. Res.*, 15 : 630-631.
- 44 - ROSEF, O. (1981) : The occurrence of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* and *Salmonella* bacteria in some wild birds. *Nord. Vet. Med.*, 33: 539-543.
- 45 - SEBALD, M. et VERON, M. (1963) : Teneur en bases de l'ADN et classification des vibrations. *Ann. Inst. Pasteur*, 105 : 897-910.
- 46 - SHANE, S.M., GIFFORD, D.H. and YOGASUNDRAM, K. (1986) : *Campylobacter jejuni* contamination of eggs. *Vet. Res. Commun.* 10: 487-492.
- 47 - SHANKER, S., LEE, A. and SORRELL, T.C. (1986) : *Campylobacter jejuni* in broilers : the role of vertical transmission. *J. Hyg.* 96 : 153-159.
- 48 - SHANKER, S., ROSENFELD, J.W., DAVEY, G.R. and SORRELL, T.C. (1982) : *Campylobacter jejuni* : incidence in processed broilers and biotype distribution in human and broiler isolates, *Appl. Environ. Microbiol.* 43 : 1219-1220.
- 49 - SKIRROW, M.B. (1977) : *Campylobacter enteritis* : a "new" disease. *Br. Med. J.*, 2 : 9.
- 50 - SKIRROW, M.B. and BENJAMIN, J. (1980) : "1001" *Campylobacter*'s: cultural characteristics of intestinal *Campylobacter*'s from man and animals. *J. Hyg.*, 85 : 427-442.
- 51 - SKIRROW, M.B. and BENJAMIN, J. (1982) : The classification of "thermophilic" *Campylobacter*'s and their distribution in man and domestic animals In *Campylobacter* I. Ed. Newell, D., pp. 40-44, MTP Press Limited, Lancaster.
- 52 - SMIBERT, R.M. (1974) : Genus *Campylobacter*. In *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*. Ed. RE. Buchanan, NE Gibbons, 8.ed., pp. 207-212, Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- 53 - SMIBERT, R.M. (1978) : The genus *Campylobacter*. *Ann. Rev. Microbiol.* 32 : 673-709.
- 54 - SOERJADI, A.S., SNOEYENBOS, G.H. and WEINACK, O.M. (1982) : Intestinal colonization and competitive exclusion of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in chicks. *Avian Dis.*, 26 : 520-524.
- 55 - SOERJADI-LIEM, A.S., SNOEYENBOS, G.M. and WEINACK, O.M. (1984) : Comparative studies on competitive exclusion of three isolates of *Campylobacter* subsp. *jejuni* in chickens by native gut microflora. *Avian Dis.* 28 : 139-146.
- 56 - TRUSCOTT, R.B. and STOCDALE, P.H.G. (1966) : Correlation of the identity of bile and cecal vibrios from the same field oases of avian vibriotic hepatitis. *Avian Dis.* 10 : 67-73.
- 57 - WANG, W.L.L., LUECHTEFELD N.W., BLASER, M.J. and RELLAR, L.B. (1983) : Effect of incubation atmosphere and temperature on isolation of *Campylobacter jejuni* from human stools. *Canad. J. Microbiol.* 29 : 468-470.
- 58 - WEBER, A., LEMBKE, C. and KETTNER, A. (1981) : Nachweis von *Campylobacter jejuni* in Kotproben von klinisch gesunden Brieftauben. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 94: 449-451.
- 59 - YOGASUNDRAM, K. and SHANE, S.M. (1986) : The viability of *Campylobacter jejuni* on refrigerated chicken drumsticks. *Vet. Res. Commun.* 10 : 479-486.
- 60 - YUSUFU, H.I., FENIGEFORFIS, C., FARVER, T.B. and WEMPE, J.M. (1983) : Prevalence of *Campylobacter jejuni* at different sampling sites in two California turkey processing plants. *J. Food. Protect.* 46 : 868-872.