

***Arcobacter* Türlerinin Atık Kuzulardan İzolasyonu ve Multipleks PCR ile İdentifikasyonu**

Ahmet UNVER* Halil İ. ATABAY * Mitat ŞAHİN*
Atıla T. KALAYCIOĞLU* Özgür ÇELEBİ* Kenan GENÇTAV*

*Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

Yayın Kodu: 2006/20-A

Özet

Arkobakterler aerobik ortamda ve daha düşük ısılarda üreyebilmeleri bakımından kampilobakterlerden ayrılırlar. Bu cins, patojen olan *Arcobacter butzleri*, *A. cryaerophilus* ve *A. skirrowii* türlerini içermekte ve bu mikroorganizmalar insan ve hayvanlarda abort, enterit ve mastit gibi bir çok hastalıkla ilişkilendirilmektedir. Bu çalışma, *Arcobacter* türlerini atık kuzulardan izole etmeyi ve izolatları multipleks PCR ile tür düzeyinde tanımlamayı amaçlamıştır. Çalışma materyalini, 2005-2006 kuzulama döneminde Kars bölgesinden temin edilen 32 atık kuzu örneği oluşturdu. Bakteriyolojik ekim amacıyla fetal akciğer ve abomazum içeriği kullanıldı. Bir adet örnek *Arcobacter*-benzeri organizma yönünden pozitif bulundu ve bu izolat multipleks PCR tekniği ile *A. cryaerophilus* olarak tanımlandı. Bu sonuçlar, *A. cryaerophilus* ve diğer *Arcobacter* türlerinin koyun atıkları etiolojisindeki önemini vurgulamaktadır. Aynı zamanda, koyun abortlarına karşı alınması gereken koruma ve kontrol yöntemlerinde *Arcobacter* türlerinin de dikkate alınması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Anahtar sözcükler: *Arcobacter*, atık, multipleks PCR

Isolation of Arcobacter spp. from Aborted Sheep Fetuses and Identification of the Isolates by Multiplex PCR

Summary

Arcobacters are differentiated from campylobacters by their ability to grow under aerobic condition and at lower temperatures. This genus includes three pathogenic species, *Arcobacter butzleri*, *A. cryaerophilus* and *A. skirrowii*, increasingly found to be associated with a variety of human and animal diseases such as abortion, enteritis and mastitis. The present study aimed to isolate *Arcobacter* spp. from aborted sheep fetuses and to identify the isolates at the species level by multiplex PCR. Thirty two aborted sheep fetuses were used to isolate *Arcobacter* spp. during 2005-2006 lambing season in Kars region. Fetal lung and stomach contents were used for bacteriological inoculations. *Arcobacter*-like organisms were found in one sample and multiplex PCR analyses of this isolate identified the organism as *Arcobacter cryaerophilus*. This suggests that *A. cryaerophilus* and other *Arcobacter* spp. should be taken into account during examining sheep abortions. *Arcobacter* spp. should be considered for applying appropriate measures in order to control and prevent abortions.

Keywords: *Arcobacter*, abotriion, multiplex PCR

İletişim (Correspondence)

Phone: +90 474 2426800

e-mail: ahmetunver@hotmail.com

GİRİŞ

Arcobacter cinsi bakteriler, *Campylobacteraceae* familyası içerisinde olup şu anda *Arcobacter butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* ve *A. nitrofigilis* olmak üzere dört adet tür içermektedirler^{1,2}. Bu bakteriler önceleri *Campylobacter* cinsi içerisinde sınıflandırılmışlar ve 'aerotolerant kampilobakter türleri' olarak adlandırılmışlardır³. Ancak daha sonra Neill ve ark. atmosferik oksijen ortamında da üreme yeteneği gösteren bu bakteriler için *Campylobacter cryaerophila* adını önermişlerdir⁴. *Arcobacter* türleri 15 ve 30°C gibi düşük sıcaklıklarda ve atmosferik oksijen ortamında üreme yetenekleri ile *Campylobacter* türlerinden ayırt edilebilirler¹. Vandamme ve ark.^{1,2} yaptıkları kapsamlı taksonomik çalışmalar ile *Campylobacter* türleri içerisinde sınıflandırılan bu bakterilerin yeni bir cins oluşturduğunu belirlemişler ve *Arcobacter* cinsini önermişlerdir.

Özellikle 3 *Arcobacter* türü; *Arcobacter butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* insan ve hayvanların çeşitli hastalıkları ile ilişkilendirilmişlerdir. Arko-bakterler ilk olarak aborte sığır ve hemen sonra aborte domuz fötüslerinden izole edilmişlerdir^{5,6}. Araştırmacılar daha sonraları yaptıkları araştırmalarda bu mikroorganizmaları gerek sağlıklı gerekse abort, enterit ve mastit gibi semptomlarla karakterize hasta sığır, domuz, koyun ve atlardan izole etmişlerdir⁷⁻¹¹. Bu bakteriler aynı zamanda çeşitli kanatlı hayvanların gerek intestinal içerik gerekse karkas örneklerinden ve çeşitli su örneklerinden izole edilmişlerdir¹²⁻¹⁴. *Arcobacter* türleri insanlarda gastroenterit ve septisemi olgularından; primatlarda ise kronik ishallerden izole edilmişlerdir¹⁵⁻¹⁷.

Arcobacter türleri Gram negatif, helikal, hafifçe kıvrık ince-küçük çomakçıklar tarzında bir morfolojiye sahip hareketli mikroorganizmalar olup spor oluşturmazlar. Bu bakteriler tıpkı *Campylobacter* türleri gibi biyokimyasal olarak inaktif olup tür düzeyinde yalnız fenotipik testler kullanılarak identifikasyonları oldukça güçtür. Bu nedenle *Arcobacter* türlerinin ayırımı ve tür düzeyinde identifikasyonları amacıyla Houf ve ark.¹⁸ tarafından bir multipleks-PCR tekniği geliştirilmiştir.

Bu çalışma ile Kars ve yöresinden anabilim dalımıza getirilen atık koyun fetal doku örneklerinden *Arcobacter* türlerinin izolasyonunun gerçekleştirile-

rek bu bakterilerin koyun atıklarındaki rolünün araştırılması amaçlanmaktadır.

MATERYAL ve METOT

Atık kuzu örnekleri: Kars merkez, ilçe ve köylerinde yetiştirilen koyunlardan atık yapanlardan KAÜ Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji laboratuvarına getirilen 32 adet atık kuzu bakteriyolojik muayenelerde kullanıldı.

***Arcobacter* spp. izolasyonu:** Atık kuzuların akciğer ve mide içeriklerinden aseptik şartlarda kanlı agara [%7 defibrine koyun kanı ilave edilmiş Blood Agar Base No:II (Oxoid)] inokulasyonu yapıldı. Besi yerleri 37°C'de 48-72 saat mikroaerobik olarak inkübe edildi. Bu süre sonunda üreyen *Arcobacter* şüpheli koloniler (yuvarlak, beyaz grimsi renkte) Gram boyama ile mikroskopik olarak incelendi. Gram negatif, "S" şeklinde kıvrımlı mikroorganizmalar *Arcobacter* şüpheli kabul edilerek bunların fenotipik karakterizasyonu ve multipleks PCR ile tür düzeyinde identifikasyonu gerçekleştirildi.

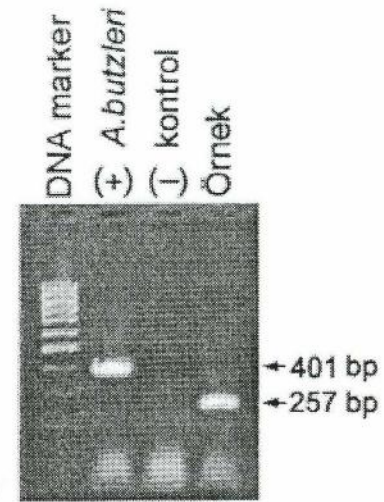
***Arcobacter* türlerinin fenotipik karakterizasyonu:** *Arcobacter* şüpheli izolatu fenotipik olarak karakterize etmek amacıyla katalaz, oksidaz ve hareketlilik testleri uygulandı. Ayrıca 25°C ve 37°C'de aerobik ve mikroaerobik ortamlarda üreyebilme ve alfa hemoliz oluşturabilme yönlerinden incelendi.

***Arcobacter* türlerinin multipleks PCR ile identifikasyonu:** *Arcobacter* şüpheli 2-3 koloni 200 ul steril fizyolojik tuzlu su içerisinde bir mikro tüpe süspansiyon edildi. Bakteri süspansiyonuna 50 ug Proteinase K (MBI Fermantes) ve 400 ul NETS lizis tampon solusyonu (NETS buffer; 0.01M NaCl, 1mM EDTA, 0.01M Tris-HCl pH7.6 ve %0.05 Sodyum Dodesil Sülfat) eklendi. Karışım 65°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra eşit miktarda (600ml) kloroform ve izoamilalkol (24:1 oranında) karışımı ilave edilerek karıştırıldı. Karışımından sonra tüpler 13.000 rpm de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Oluşan süpernatant (akıcı bölüm) başka bir steril mikro tübe aktarılarak üzerine 0.1 volüm 3M sodyum asetat ve 2.5 volüm mutlak alkol ilave edilerek -20°C'de 2 saat inkübe edildi. Presipite olan DNA mikro tüpün 13.000 rpm 5 dakika santrifüjünden sonra çöktürüldü. Pelet %90 ve %70'lik etanol

ile iki defa yıkandıktan sonra 15-20 dakika kuruması için beklendi. DNA peleti 50 µl steril distile deiyonize su ile sulandırılıp PCR de template (şablon) olarak kullanıldı. Multipleks PCR Hauf ve arkadaşlarının bildirdiği şekliyle gerçekleştirildi¹⁸. Kısaca, amplifikasyon, PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 20 pmol ARCO, BUTZ, CRY1 ve CRY2 primerlerinden herbirinden 20 pmol, SKIRR primerinden 10 pmol, 1.5 U Taq DNA polimeraz ve 8 ul saflaştırılmış DNA (template) içeren 40 ul reaksiyon volümü içinde gerçekleştirildi. Termal şartlar ise; 94°C'de 2 dk başlangıç denaturasyonu, 32 sikludan oluşan 94°C'de 45 sn denatürasyon, 61°C'de 45 sn annealing ve 72°C'de 30 sn ekstensiyon ve 72°C'de 7 dk son ekstensiyon şeklinde uygulandı. PCR ürünleri %1 agaroz jel elektroforez ile ayrıldıktan sonra etidyum bromür boyama ile UV illuminatörde gözlemlendi. DNA fragman büyüklükleri eşzamanlı koşturulan DNA marker'ı (Gene Ruler "100 bp" MNI Fermantes) ile kıyaslanarak tespit edildi. Multipleks PCR'de pozitif kontrol olarak Danimarka Veteriner Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen *A. butzleri* (DCC25) suşunun yukarıda aktarılan DNA izolasyon yöntemi ile saflaştırılmış DNA'sı kullanıldı. Bu teknikte negatif kontrol olarak bütün PCR içeriğine sahip template (şablon) DNA yerine steril damıtık su içeren ve aynı termal ortamda tutulan karışım kullanıldı.

BULGULAR

Bu çalışmada işlenen toplam 32 adet atık kuzulardan Digor ilçesine ait bir örnekten *Arcobacter*-benzeri mikroorganizmalar izole edildi. *Arcobacter* şüpheli bu izolattan fenotipik karakterizasyonunda katalaz, oksidaz ve hareketlilik testlerinin pozitif olduğu ve hem 25°C hem de 37°C'de aerobik ve mikroaerobik ortamlarda alfa hemoliz oluşturmada üreyebilme yeteneğine sahip oldukları gözlemlendi. *Arcobacter* şüpheli izolattan yapılan DNA izolasyonu ve multipleks PCR'nin ardından 257 baz çifti büyüklüğünde DNA fragmanı elde edildi (Şekil 1). Houf ve arkadaşlarının çalışmasına göre *A. cryaerophilus*'un multipleks PCR'de 257 baz çifti DNA fragmanı ürettiği dikkate alınarak atık kuzu örneğinden izole edilen mikroorganizma *A. cryaerophilus* olarak tanımlanmıştır. Multipleks PCR'de pozitif kontrol olarak kullanılan *A. butzleri* suşunun 401 baz çifti DNA fragmanı oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 1).



Şekil 1. *Arcobacter* şüpheli izolattan yapılan multipleks PCR sonucu elde edilen jel fotoğrafı. DNA marker; DNA standardı (Gene Ruler "100 bp" MNI Fermantes), (+) *A. butzleri*; pozitif kontrol *A. butzleri* (DCC25), (-) kontrol; negatif kontrol, template (şablon) DNAsız PCR karışımı. DNA fragmanlarının büyüklükleri baz çifti (bp) olarak panelin sağında sunulmuştur.

Figure 1. Gel picture of Multiplex PCR. Sizes (bp) of amplified products are indicated on the right. DNA marker; DNA ladder (Gene Ruler "100 bp" MNI Fermantes), (+) *A. butzleri*; positive control *A. butzleri* (DCC25), (-) kontrol; no template control. DNA sizes (bp) were indicated on the right.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Arcobacter türleri su, gıda ve sağlıklı hayvanlardan izole edilmekle beraber abort, enterit, septisemi ve mastit gibi bazı hastalık tabloları ile de ilişkilendirilmiştir⁵⁻¹⁷. Bu çalışmada, 32 atık kuzu örneğinin birinden *A. cryaerophilus*'un izole edilmesi bu mikroorganizmaların koyun atıkları etiyolojisinde yeri olduğunu göstermektedir. *Arcobacter* türleri reproduktif sisteme ilişkin anormallikler ve atık olgularında önceleri *Spirillum/Vibrio*-benzeri organizmalar olarak bildirilmiş⁵⁻⁶ ve son yıllarda yapılan çalışmalarda domuz atıklarından %43'e varan oranlarda izole edilmiştir^{7,8,10}. Bu çalışmada *Arcobacter* türlerinin kuzu atıklarında daha düşük bir oranda izole edilmesi (%3.1), *Arcobacter* atıklarının bölgede sporadik seyirli olabileceğini göstermektedir. Buna rağmen, bu çalışmada *Arcobacter* özenleştirme aşamasının uygulanmamış olması, üretilmeleri güç olan bu etkenlerin atık olgularındaki gerçek prevalansının belirlenenden daha yüksek olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, bölgede yapılan bir çalışmada¹⁹ sağlıklı koyunların dışkı örneklerinden *A. cryaerophilus*'un izole edilmesi, bölgede arkobakter-

lerin ekolojisi ve hastalıklarla ilişkisi yönünde kapsamlı bir çalışmanın gerekliliği ortaya koymaktadır. Kars bölgesinde sağlıklı koyunlardan ve atık olgularından izole edilen etkenlerin birbirleriyle ve farklı coğrafik bölgelerdeki diğer izolatlar ile taksonomik yakınlığının ileriki çalışmalarda belirlenmesi arkobakterlerin bölgedeki ekolojisi ve epidemiyolojisini daha iyi anlamada yararlı olacaktır.

Bu sonuçlar, *A. cryaerophilus* ve diğer *Arcobacter* türlerinin koyun atıkları etiyojisindeki önemini vurgulamaktadır. Aynı zamanda, koyun abortlarına karşı alınması gereken koruma ve kontrol yöntemlerinde *Arcobacter* türlerinin de dikkate alınması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, *Arcobacter* türlerinin insanlarda gastroenterit ve sepsisemi olgularından izole edildiği¹⁵⁻¹⁷ göz önüne alındığında ve özellikle Kars gibi, daha çok ailesel yetiştiriciliğin yapıldığı yörelerde evcil hayvanlar ile insanların oldukça yakın temasları nedeniyle, bu etkenlerin insanlardaki bu tip hastalık tablolarında da göz önüne alınması son derece yararlı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Vandamme P, Falsen E, Rossau R, Hoste B, Segers P, Tytgat R, De Ley J: Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: Emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 41, 88-103, 1991
- Vandamme P, Vancanneyt M, Pot B, Mels L, Hoste B, Dewettinck D, Vlaes L, Van den Borre C, Higgins R, Hommez J, Kersters K, Butzler J-P, Goossens H: Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. *Int J Syst Bacteriol*, 42, 344-356, 1992.
- Neill SD, Ellis WA, O'brein JJ: The biochemical characteristics of *Campylobacter*-like organisms from cattle and pig. *Res Vet Sci*, 25, 368-372, 1978.
- Neill SD, Campbell JN, O'brein JJ, Weatherup STC, Ellis WA: Taxonomic position of *Campylobacter cryaerophila* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 35, 342-356, 1985.
- Ellis WA, Neill SD, O'Brien JJ, Ferguson HW, Hanna J: Isolation of *Spirillum/Vibrio*-like organisms from bovine fetuses. *Vet Rec*, 100, 451-452, 1977.
- Ellis WA, Neill SD, O'Brien JJ, Hanna J: Isolation of *Spirillum*-like organisms from pig fetuses. *Vet Rec*, 102, 106, 1978.
- Schroeder-Tucker L, Wesley IV, Kiehlbauch JA, Larson DJ, Thomas LA, Erickson GA: Phenotypic and ribosomal RNA characterization of *Arcobacter* species isolated from porcine aborted fetuses. *J Vet Diagn Invest*, 8, 186-95, 1996
- de Oliveira SJ, Baetz AL, Wesley IV, Harmon KM: Classification of *Arcobacter* species isolated from aborted pig fetuses and sows with reproductive problems in Brazil. *Vet Microbiol*, 57, 347-354, 1997.
- Atabay HI: The ecology of campylobacters and related organisms in food animals. Doktora Tezi, Bristol Üniversitesi, İngiltere, 1998.
- On SL, Jensen TK, Bille-Hansen V, Jorsal SE, Vandamme P: Prevalence and diversity of *Arcobacter* spp. isolated from the internal organs of spontaneous porcine abortions in Denmark. *Vet Microbiol*, 85, 159-67, 2002.
- Wesley IV, Wells SJ, Harmon KM, Green A, Schroeder-Tucker L, Glover M, Siddique I: Fecal shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in dairy cattle. *Appl Environ Microbiol*, 66, 1994-2000, 2000.
- Rice EW, Rodgers MR, Wesley IV, Johnson CH, Tanner SA: Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water. *Let Appl Microbiol*, 28, 31-35, 1999.
- Wesley IV, Baetz AL: Natural and experimental infections of *Arcobacter* in poultry. *Poul Sci*, 78, 536-545, 1999.
- Atabay HI, Aydin F, Houf K, Sahin M, Vandamme P: The prevalence of arcobacters on chicken carcasses sold in retail markets in Turkey. *Int J Food Microbiol*, 25, 21-28, 2002.
- Wesley IV: *Helicobacter* and *Arcobacter*: Potential human foodborne pathogens? *Trends Food Sci Technol*, 89, 293-299, 1997.
- Higgins R, Messier S, Daignault D, Lorange M: *Arcobacter butzleri* isolated from a diarrhoeic non-human primate. *Lab Animals*, 33, 87-90, 1999.
- Wybu I, Breynaert J, Lauwers S, Lindenburg F, Houf K: Isolation of *Arcobacter skirrowii* from a patient with chronic diarrhea. *J Clin Microbiol*, 42, 1851-1852, 2004.
- Houf K, Tutenel A, De Zutter L, Van Hoof J, Vandamme P: Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and identification of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii*. *FEMS Microbiol Lett*, 193, 89-94, 2000.
- Sürmeli, P: Koyunlardan alınan dışkı örneklerinde *Arcobacter* türlerinin prevalansının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi, 2006.