

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAZI GIDALARDA *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* VARLIĞININ
ARAŞTIRILMASI**

Merve SERT

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2014**

Her hakkı saklıdır

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgi ve belgelerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

05/ 06/ 2014

Merve SERT

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI GIDALARDA *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Merve SERT

Ankara Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kamuran AYHAN

Bu tez çalışmasında Ankara ve Aksaray piyasasından satın alınan hazır gıdalarda *Clostridium perfringens* varlığının ve sayısının tespiti amaçlanmıştır. Araştırmada Ankara ve Aksaray' daki farklı satış yerlerinden alınan 68 adet gıda örneği materyal olarak kullanılmış ve numuneler steril koşullarda laboratuvara getirilmiştir.

Clostridium perfringens' in varlığı MUP (4-Methylumbelliferyl phosphate) ilave edilmiş besiyerinde yayma kültür ekim yöntemiyle tespit edilip, ISO' nun hazırladığı 7937 sayılı metoda göre sayımı yapılmıştır. İzole edilen 19 adet muhtemel *C. perfringens* kolonilerine, Gram boyama, hareket, nitrat, laktöz-jelatin, Voges Proskauer doğrulama testleri yapılmıştır.

Yapılan analizler sonucunda 68 adet gıda örneğinin 19' unda (%27,9) *C. perfringens* izolasyonu, sayımı ve doğrulanması yapılmıştır. 19 adet örneğin %21,1' inde 10^3 - 10^4 kob/g arasında, %42,1' inde 10^2 kob/g' dan fazla, %31,5' inde ise 10^1 - 10^2 kob/g arasında bakteri tespit edilmiştir. Akşam ve sabah saatlerinde alınan 12 adet gıda örneğinin 8' inde ise gün içerisindeki ısıtmadan kaynaklı bakteri sayılarında artış olduğu, et içermeyen 4 adet yemekte ise bakterinin bulunmadığı görülmüştür.

Tez çalışmasında elde edilen verilere göre; bazı gıdalarda *C. perfringens* varlığı ve sayısının yüksek değerde saptanmış olması, Türk Gıda Kodeksinde Gıda Güvenirliği kriterlerinin bu bakteri için yeniden düzenlenmesi gerektiğini düşündürmektedir.

Haziran 2014, 54 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Clostridium perfringens*, Hazır gıda, Isıl işlem görmüş gıda, MUP

ABSTRACT

Master Thesis

RESEARCH ON THE PRESENCE OF *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* IN FOODS

Merve SERT

Ankara University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Kamuran AYHAN

The objective of this study was to determine the presence and number of *Clostridium perfringens* in foods marketed in Ankara and Aksaray. For this purpose, a total of 68 food samples were obtained from different markets in Ankara and Aksaray. Samples were brought in sterile conditions to the lab.

The presence of *Clostridium perfringens* was identified by spread plate method in MUP (4-Methylumbelliferyl phosphate) containing medium. The colony counting was made according to the method numbered 7937 prepared by ISO. In addition, gram staining, nitrate-motility, gelatin, lactose, and Voges Proskauer verification tests were applied to 19 possible isolated *C. perfringens* colonies.

As a result of the analyses, the isolation, counting and verification of *Clostridium perfringens* was performed in 19 (27.9 %) out of 68 food samples. Of 19 food samples, between 10^3 - 10^4 cfu/g in 21.1 %, between 10^1 - 10^2 cfu/g in 31.5 % and more than 10^2 cfu/g in 42.1% was detected. An increase in the number of bacteria was observed due to heating during the day in 8 of 12 food pieces which were sampled in the morning and evening hours; and there were no bacteria in 4 meat-free pieces of those 12.

According to the data obtained, it is suggested that Food Safety Criteria in Turkish Food Codex should be reorganized for this bacteria due to the detection of the presence and high value of *C. perfringens* in foods.

June 2014, 54 pages

Keywords: *Clostridium perfringens*, Ready foods, Heat-treated foods, MUP

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bana her konuda yardımcı olan, katkılarıyla beni yönlendiren, her aşamada destekleyen, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Kamuran AYHAN'a (Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı) şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım boyunca ihtiyacım olan her alanda yardımcı olan Arş .Gör. Gizem ÖZLÜK'e, manevi desteğiyle yanımda olan arkadaşım Arş. Gör. Burcu ÇİÇEK' e yanımda oldukları ve destekleri için Aksaray Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü' ndeki hocalarım Prof. Dr. Özen ÖZBOY ÖZBAŞ' a, Doç. Dr. Mustafa ARDIÇ ve Yrd. Doç.Dr. Ayhan DURAN' a,

Ayrıca öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan, emeklerini ve sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen, her koşulda bana güvenen, destek veren babam İdris SERT' e, annem Zeliha SERT' e, ablalarım Gülcan SERT ve Cafiye KÜÇÜKYILMAZ' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Merve SERT

Ankara, Haziran 2014

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK	i
ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1 <i>Clostridium perfringens</i> 'in Genel Özellikleri	3
2.2 <i>Clostridium perfringens</i> ' in Virülans Faktörleri.....	4
2.2.1 <i>Clostridium perfringens</i> Alfa (EBM) Toksini.....	5
2.2.2 <i>Clostridium perfringens</i> Beta (KPB) Toksini	6
2.2.3 <i>Clostridium perfringens</i> Epsilon (ETX) Toksini	6
2.2.4 <i>Clostridium perfringens</i> Iota (ITX) Toksini	6
2.2.5 <i>Clostridium perfringens</i> Tip A.....	7
2.2.6 <i>Clostridium perfringens</i> Tip B	7
2.2.7 <i>Clostridium perfringens</i> Tip C.....	8
2.2.8 <i>Clostridium perfringens</i> Tip D.....	8
2.2.9 <i>Clostridium perfringens</i> Tip E.....	8
2.3 <i>Clostridium perfringens</i> Patojenitesi.....	9
2.4 <i>Clostridium perfringens</i> Salgınları	15
2.5 <i>Clostridium perfringens</i> Standart Analiz Yöntemi.....	19
2.6 <i>Clostridium perfringens</i> Hızlı Analiz Yöntemi (MUP İlave Edilmiş Besiyeri Kullanımı).....	19
2.7 <i>Clostridium perfringens</i> ' in Moleküler Tanımlanması	20
3. MATERYAL ve METOT	21
3.1 Materyal.....	21
3.2 Metot	21
3.2.1 Gıda örneklerinin analiz için laboratuvara getirilmesi.....	21

3.2.2 Gıda örneklerinin analize hazırlanması	21
3.2.3 Gıda örneklerinde <i>Clostridium perfringens</i> aranması	22
3.2.4 İzole edilen muhtemel <i>Clostridium perfringens</i> bakterilerinin doğrulanması.....	26
3.2.4.1 Gram boyama.....	27
3.2.4.2 Hareket testi	27
3.2.4.3 Nitrat testi.....	27
3.2.4.4 Laktoz- jelatin testi	28
3.2.4.5 Voges proskauer testi	28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	29
4.1 Gıda Örneklerindeki Koloni Sayım Sonuçları.....	30
4.2 Gram Boyama Sonuçları.....	32
4.3 Hareket Testi Sonuçları	32
4.4 Nitrat Testi Sonuçları	33
4.5 Laktoz-Jelatin Test Sonuçları.....	34
4.6 Voges Proskauer Test Sonuçları.....	35
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	39
KAYNAKLAR	42
Ek 1 Araştırmada Kullanılan Besiyerleri.....	52
ÖZGEÇMİŞ	54

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

α	Alfa
β	Beta
CPE	<i>Clostridium Perfringens</i> Enterotoksin Geni
ϵ	Epsilon
I	Iota
kob	Koloni oluşturan birim
g	Gram
NE	Nekrotik Enteritis
cpa	<i>Clostridium perfringens</i> alfa toksini
MST	Mikrobiyal kaynak izleme
MR	Metil red
nm	nanometre
spp.	Species (tür, çoğul)
VP	Voges Proskauer
EBM	Alfa Toksin
KPB	Beta Toksin
ETX	Epsilon Toksini
ITX	Iota Toksin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Ankara piyasasından sağlanan hindi kıymalarından izole edilen <i>C. perfringens</i> 'in mevsimsel dağılımı.....	12
Şekil 2.2 Ankara piyasasından sağlanan hindi kıymalarından izole edilen <i>C.perfringens</i> 'in aylara göre % değerleri.....	13
Şekil 2.3 1990-1999 yılları arasında meydana gelen <i>C. perfringens</i> salgınlarındaki gıda dağılımı.....	13
Şekil 2.4 1998-2010 yılları arasında ABD'de meydana gelen salgın ve salgın kaynaklı hastalık sayısı.....	16
Şekil 2.5 2006-2012 yılları arasında Hong Hong'da gıda zehirlenmelerinden etkilenen kişi sayısı.....	18
Şekil 3.1 TSC Agar'da <i>Clostridium perfringens</i> kolonilerinin görünümü.....	26
Şekil 4.1 UV lamba altında Işıma Yapan Koloniler.....	29
Şekil 4.2 Ankara'dan alınan örneklerden izole edilen <i>Clostridium perfringens</i> yüzdesi.....	30
Şekil 4.3 Aksaray'dan alınan örneklerden izole edilen <i>C. perfringens</i> yüzdesi.....	30
Şekil 4.4 Bakterinin mikroskopik görüntüsü.....	32
Şekil 4.5 Hareket Testi Sonucu.....	33
Şekil 4.6 Nitrat Testi Sonucu.....	34
Şekil 4.7 Laktoz-Jelatin Test Sonucu.....	35
Şekil 4.8 Voges Proskauer Test Sonucu.....	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 <i>C. perfringens</i> 'e ait optimum gelişme değerleri.....	4
Çizelge 2.2 4 Temel toksin tipine dayalı olarak <i>C. perfringens</i> sınıflandırılması.....	5
Çizelge 2.3 Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'ne göre <i>C. perfringens</i> aranma zorunluluğu bulunan gıdalar.....	14
Çizelge 2.4 2011-2012 yılları arasında gıda zehirlenmelerinden meydana gelen değişim.....	18
Çizelge 3.1 Analiz için Ankara'dan alınan gıda örnekleri.....	23
Çizelge 3.2 Analiz için Aksaray'dan alınan gıda örnekler.....	24
Çizelge 3.3 Analiz için Ankara'dan günün farklı saatlerinde alınan gıda örnekler.....	25
Çizelge4.1 Günün farklı saatlerinde alınan gıda örneklerindeki koloni sayıları(kob/g).....	31
Çizelge 4.2 Gıda Örneklerindeki <i>C. perfringens</i> koloni sayıları (kob/g).....	31
Çizelge 4.3 <i>C. perfringens</i> Doğrulama Testi Sonuçlar.....	36

1. GİRİŞ

Sağlıklı, yeterli ve dengeli beslenme için güvenilir gıda tüketimi ve tüketici bilinci hızla yaygınlaşmakla birlikte gıda kaynaklı hastalıklar ve bu hastalıkların neden olduğu can kaybı ve ekonomik kayıplarda artmaktadır. Gıda kaynaklı hastalıkların nedenleri arasında ham madde kaynaklı kontaminasyon, üretimde ve tüketimde patojen mikroorganizma bulaşısı, taşınması esnasında soğuk zincirde ve gıdanın muhafazasında meydana gelen aksaklıklar gösterilebilir. Bunun da ötesinde, tarımsal uygulamalardaki değişikliklerin, çevre kirliliğinin, hızlı kentleşme, seyahatların, toplu beslenme yapılan yerlerde tüketim alışkanlıklarının yaygınlaşmasının ve dünyada yaşlı nüfusun artmasının gıda kaynaklı hastalıklar ve salgınların ortaya çıkışında rol oynadığı söylenebilir (Ayhan 2013).

Kontamine gıdalar ve içme suları dünyada her yıl milyonlarca insanın gıda kaynaklı hastalıklardan etkilenmesine neden olmaktadır (Öğüt ve Polat 2009).

Literatür verilerine göre, bilinen 200'den fazla gıda kaynaklı enfeksiyonun önemli bir kısmını bakteriyel kaynaklı enfeksiyonlar oluşturmaktadır. Bu, hem halk sağlığını tehdit etmekte hem de büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bunlar arasında en yaygın olanlar *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* ve *Listeria monocytogenes* tarafından oluşturulan bakteriyel kaynaklı enfeksiyonlardır (Öğüt ve Polat 2009).

Türkiye'de gıda kaynaklı hastalıklar ile ilgili Sağlık Bakanlığı tarafından istatistiksel çalışmaların 2005 yılı verilerine göre 5168 klinik tifo vakası, 10514 olası tifo vakası bildirilmiş olup, gıda kaynaklı salgınlara en fazla *S. aureus* ve *C. perfringens* patojenlerinin neden olduğu ifade edilmektedir (Dorman vd. 2010).

Dünya genelinde meydana gelen, insan sağlığını olumsuz etkileyen, ekonomik kayıplar açısından önemli bir sorun olan gıda zehirlenmelerine, büyük oranda et ve et

ürünlerinin (% 54,7) yol açtığı ve özellikle *C. perfringens*' in neden olduğu belirtilmiştir (Diane vd. 2010).

ABD' de bakteriyel kaynaklı hastalığa neden olan en yaygın birinci bakterinin *E. coli*, ikinci bakterinin ise *C. perfringens* olduğu tahmin edilmektedir. Buna göre her yıl bir milyon *C. perfringens* kaynaklı hastalık vakasının ortaya çıktığı ileri sürülmektedir. 1998-2010 yılları arasında doğrulanmış 289 salgında, 15.208 kişinin hastalandığı, 83 kişinin hastanede tedavi gördüğü ve 8 kişinin öldüğü rapor edilmiştir. Bu salgınların; gıdanın hazırlanması esnasında meydana gelen kontaminasyonla ve % 43 oranla restoranlardan kaynaklandığı belirtilmektedir. Yapılan çalışmalarda salgınların % 19 ile yemek hizmeti veren firmalar, %16 ile evler, %10 ile hapisaneler ve %10 oranıyla farklı yerlerde meydana geldiği ileri sürülmektedir. Zehirlenmelerde aracı gıdaların %46'sının et, %30'unun da tavuk ürünleri olduğu belirlenmiştir (Grass vd. 2013). Avustralya' da 1995-2000 yılları arasında meydana gelen salgınların büyük oranda restoranlardan ve hazır gıdalardan kaynaklandığı açıklanmıştır (Dalton vd. 2004).

Bu tez çalışması kapsamında son yıllarda hazır gıda ve toplu yemek üretimi yapan yerlerdeki tüketimin artmasıyla gıdalardaki hijyen eksikliği, yetersiz ısıl işlem, ısıl işlem sonrasında kontaminasyon ve uzun süreli bekletilme gibi problemlerin ortaya çıkmasıyla gıda kaynaklı hastalık sayısındaki artış ve Türk Gıda Kodeksi'nde yapılan bazı değişiklikler göz önüne alınarak gıdalarda *Clostridium perfringens* varlığı, sayısının tespiti ve doğrulanması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 *Clostridium perfringens*'in Genel Özellikleri

Clostridium perfringens, *Bacillaceae* familyasına ait Gram pozitif, çubuk şeklinde, sporlu, kapsüllü, anaerobik, hareketsiz (Tunail 2009, Ayhan 2013) ve agar yüzeyinde mat veya parlak koloniler oluşturan bakteridir (Brynstad ve Granum 2002).

Patojen bakteri, kimyasallara, deterjanlara son derece dayanıklı endospor üretmektedir (Feligini vd. 2014). Sporları, gıda sanayi ve büyük miktarda gıda hazırlanan işyerlerinde sıklıkla soruna neden olur (Brynstad ve Granum 2002). *C. perfringens* toprak kökenli bir bakteri olup, yaygın olarak toprak, su, hava, hayvanların bağırsağında, ham ve işlenmiş gıda çeşitleri özellikle et ve tavuk ürünlerinde bulunur (Huang, 2003). Proteince zengin kırmızı et, kanatlı et ve ürünlerinde görülme oranı daha yüksektir. Bu gıdalarda daha sık görülme nedeni bakterinin gelişmesi esnasında, 13–14 aminoasit ile 5–6 vitamene gereksinim duymasından kaynaklanmaktadır (Tunail 2000). Optimum koşullarda ve anaerobik ortamda ikiye katlanma süresi olarak ifade ettiğimiz generasyon süresinin 8 dakika olması onu önemli kılan bir özelliğidir (Hobbs ve Roberts 2007, Brynstad ve Granum 2002).

C. perfringens'in gelişebildiği en iyi pH aralığı 6.0-7.5'tir. Asidik koşullara *C. botulinum*'dan daha duyarlı olmasının kanıtı olarak pH gelişme aralığı gösterilmektedir (Jay 2000). Bakteri optimum olarak 0.93 – 0.97 su aktivitesi değer aralığında gelişebilmektedir (Hobbs ve Roberts 2007).

Çizelge 2.1'de patojenin geliştiği optimum sıcaklık, pH ve su aktivitesi değerleri verilmiştir (Erol 2007).

Çizelge 2.1 *C. perfringens*'e ait optimum gelişme değerleri

Parametre	Değer Aralığı	Optimum Değerler
Sıcaklık	14-50 °C	45°C
pH	5-9	6-7
Su aktivitesi (aw)	0,93-0,97	0,95

Clostridium perfringens oluşturduğu toksinler açısından 5 grupta (A-E) sınıflandırılabilir. *C. perfringens* enterotoksinleri (CPE) arasında, %5'ten az bir oranla *perfringens* tip A yer almaktadır. Bu grup, *C. perfringens* ilişkili gastrointestinal hastalıkların çoğundan sorumludur (Sarker vd. 2013).

Clostridium perfringens'in gelişmesini ve patojen spor oluşumunu önlemek için yapılan soğutma işlemi büyük önem taşımaktadır. Çünkü spor oluşumunun ve gelişiminin en hızlı olduğu sıcaklık aralığı 25-45° C'dir. Meydana gelen gıda kaynaklı *C. perfringens* salgınların çoğu yavaş soğutma ya da soğuk hava deposu olmadan gerçekleştirilen soğutma işlemi nedeniyle meydana gelmiştir (Poumeyrol vd. 2014).

2.2 *Clostridium perfringens*'in Virülans Faktörleri

Patojenin ürettiği 15'in üzerinde toksin, insanlarda ve hayvanlarda farklı hastalıklara neden olmaktadır. Çoğu *C. perfringens* suşu *C. perfringens* enterotoksini (CPE) gibi bir dizi toksin veya potansiyel virülans faktörleri üretmektedir (Lindström vd. 2011).

Clostridium perfringens enterotoksini (CPE) neden olduğu hastalık, en sık görülen üçüncü gıda kaynaklı hastalıktır (Jiang vd. 2014). *C. perfringens* suşları, 5 tip olarak (A, B, C, D ve E), 4 temel toksin olan Alfa (EBM), beta (KPB), epsilon (ETX) ve Iota (ITX) ya göre sınıflandırılmıştır (Çizelge 2.2). Ancak, bu mikroorganizma çeşitli kombinasyonlarda 16 toksin üretebilir (Uzal vd. 2012).

Tüm toksin tipleri hayvanlarda hastalığa neden olurken, tip B ve D küçük geviş getiren hayvanlarda, tip A kümes hayvanlarında, tip A ve C ise yalnızca insanlarda hastalıklara neden olmuştur (Lindström vd. 2011). *C. perfringens* tip A genellikle yaygın olarak hayvanların bağırsak sisteminde ve doğada bulunurken, diğerlerinin (tip B, C, D ve E) hayvan bağırsak sisteminde görülme sıklığı daha azdır (Jiang vd. 2014).

α -toksin, tüm *C. perfringens* tiplerinde (A-E) yaygın olarak görülür. *C. perfringens* tip B ve C' nin her ikisinde de nekroz (hücrenin, dokunun ya da organın geri dönülemez şekilde hasar olması sonucu görülen patolojik ölüm) oluşturucu, ölümcül etkiye sahip, β -toksin ise şiddetli bağırsak nekrozundan sorumlu, plazmid gen *C. perfringens* tip B tarafından kodlanmış olarak üretilmektedir. Ayrıca *C. perfringens* tip E, α ve ι toksin üretirken, her iki *C. perfringens* tipi (B ve D) ϵ -toksin kodlama genine sahiptir (Greco vd. 2005).

Çizelge 2.2 4 Temel toksin tipine dayalı olarak *C. perfringens* Sınıflandırılması (Uzal vd. 2012)

<i>C. perfringens</i> Tipleri	Temel Toksinler			
	Alfa	Beta	Epsilon	Iota
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+

2.2.1 *Clostridium perfringens* Alfa (EBM) Toksini

Yapılan bazı araştırmalar alfa toksinin *C. perfringens* NE (Nekrotik Enteritis)'in meydana gelmesinde rol oynadığını ileri sürülmekteyse de bu tam olarak kanıtlanamamıştır (Coursodon vd. 2010).

Toksin salgılayan Tip A suşları arasında alfa toksinin, önemli bir virülans faktörü olduğu gösterilmiştir (Sakurai vd. 2004). Alfa toksin, insan ve diğer hayvanlarda ani bebek ölümü ile ilişkilendirilmekte olup, *C. perfringens* tip A tarafından salgılanan bu toksinle meydana gelen gıda zehirlenmeleriyle her yıl çok sayıda insan ölmektedir (Merrill vd. 2006).

Genelde tip A ve D tarafından üretilen cpa (*Clostridium perfringens* alfa toksini), fosfalipaz C (PLC) biyolojik aktivitesi ile gazlı gangrene neden olan çok önemli bir faktördür. Ağrı, ateş, ödem ile ortaya çıkan, hayatı tehdit eden önemli bir hastalıktır (Zhao vd. 2011). α -toksini hücre duvarına saldırarak hücre ölümüne neden olan lesitinaz etkili bir toksindir. Bu etkisi sebebiyle de insanlarda gazlı gangrene, hayvanlarda nekrotik enteritis ve enterotoksemiye sebep olduğu ifade edilmiştir (Zhao vd. 2011).

2.2.2 *Clostridium perfringens* Beta (KPB) Toksini

Beta toksin üreten *C. perfringens* suşları, insanlarda ve çiftlik hayvanlarında epsilon toksinine benzer şekilde nekroz oluşturan enteritis ve enterotoksomiye neden olmaktadır (Mcclane 2014).

2.2.3 *Clostridium perfringens* Epsilon (ETX) Toksini

Epsilon toksin (ETX), *Clostridium* tip B ve D tarafından üretilen β gözenek formunda, patojen enterotoksemide kilit rol oynayan bir toksindir. Tarım sektöründe, geviş getiren hayvanlarda sıkça meydana gelen ölümcül hastalıklara sebep olması nedeniyle dünya çapında önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Brown vd. 2014).

2.2.4 *Clostridium perfringens* Iota (ITX) Toksini

Clostridium perfringens Iota (ITX) toksini, enzimatik bileşen(Ia) ve bağlama bileşeni(Ib) içeren ikili toksin bileşiminden oluşmuştur (Sakurai vd. 2007). ITX, aktin

ADP-ribosylating toksin ailesine aittir ve bu aileye ait diğler üyeler *C. botulinum* C2 toksini ve *C. spiroforme* toksini'dir (Aktories vd. 1996).

2.2.5 *Clostridium perfringens* Tip A

CPE enterotoksini üreten *Clostridium perfringens* tip A, buldukları ortamda yaygın olarak gıda kaynaklı ve gıda kaynaklı olmayan gastrointestinal hastalıklara neden olmaktadır (Avila vd. 2014). Bağırsak kaynaklı enfeksiyonlara neden olan *C. perfringens* tip A, her yıl Amerika Birleşik Devletleri'nde 1 milyon insanda gıda zehirlenmesi görülmesine sebep olmaktadır (Mcclane 2014).

Clostridium perfringens tip A gıda zehirlenmesi, endüstrileştirilmiş dünyada en yaygın görülen gıda zehirlenmesidir. Bu bakteri tipi, nadir olarak görülen ancak ciddi gıda kaynaklı nekrotik enteritten sorumludur (Brynstad ve Granum 2002).

2.2.6 *Clostridium perfringens* Tip B

C. perfringens tip B, diğler *Clostridium* tipleri içerisinde CPA, CPB ve ETX' i en az oranda üretendir. Bu mikroorganizma, kuzuda dizanteri, koyunda nekrotizan enterite, koyun ve diğler hayvan türlerinde bazen nörolojik hastalığı neden olmaktadır. Sığırlar ve atlarda görülen nekroze edici enterite, genellikle *C. perfringens* tip B' nin yol açtığı belirtilmektedir (Uzal ve Songer 2008). Ayrıca *C. perfringens*'in, görülen en yaygın tipi, *C. perfringens* tip B' dir (Frey vd. 2001).

C. perfringens tip B enfeksiyonunun, sıklıkla bazı Orta Doğu ülkeleri ve İngiltere'de görüldüğü, Amerika Birleşik Devleti'nde ise hiç tespit edilmediği bildirilmiştir (Uzal ve Songer 2008).

C. perfringens tip B'nin neden olduğu hastalık, koyunlarda tip C ile benzer özellik göstermektedir. Ani ölüm, nörolojik belirtiler ya da ishal bunlar arasında yer almaktadır (Uzal ve Songer 2008).

2.2.7 *Clostridium perfringens* Tip C

Clostridium perfringens tip C, at, domuz, koyun dahil olmak üzere birçok neotal (yenidoğan) hayvanlarda olumsuz etkilere, ayrıca insanlarda da enteritis nekrotikansa neden olmaktadır. Tip C'nin neden olduğu enteritis nekrotikans (Hambourg Hastalığı) gelişmiş ülkelerde nadiren görülen bir hastalıktır. Kanlı ishal ve karın ağrısının görüldüğü hastalık semptomları, II. Dünya Savaşı sırasında Almanya'da ve kötü koşullarda pişirilmiş et yiyen fakir ülkelerde görülmüştür. Hastaların tavuk, hindi gibi hayvansal kökenli gıdalar tükettikleri belirtilmiştir (Matsuda vd. 2007).

C. perfringens tip C virülansına, çoğunlukla beta toksin (KPB) aracılık etmektedir. Tip C'nin neden olduğu hastalığın doğrulmasında, KPB tarafından etkilenen hayvan bağırsak içeriği temel alınmalıdır (Uzal vd. 2012).

2.2.8 *Clostridium perfringens* Tip D

C. perfringens tip B ile birlikte güçlü bir toksin olan ETX üreten *Clostridium perfringens* suşudur (Benz vd. 2009). *Clostridium perfringens* tip D, sıklıkla koyun, daha az oranda sığır ve keçide görülen *Clostridium* tipidir. Çoğunlukla, "Etli böbrek hastalığı" ya da "Overeating hastalığı" olarak adlandırılan hastalığa neden olmaktadır (Piontkowski 2001).

2.2.9 *Clostridium perfringens* Tip E

Clostridium perfringens tip E, bir enzim bileşeni (Ia) ve bağlama bileşeninin (Ib) oluşturduğu Iota toksin üreten bir *Clostridium perfringens* suşudur. Tip E, tavşanlarda

antibiyotikle ilişkili olarak enterotoksemiye (Yumuşak Böbrek Hastalığı) neden olur (Sakurai vd. 2008). Dana, kuzu ve domuzlarda da enterotoksemi görülmesinin nedenidir (Nagahama vd. 2012).

2.3 *Clostridium perfringens* Patojenitesi

İnsanlarda gıda zehirlenmelerine yol açan en yaygın tip, *Clostridium perfringens* tip A'dır. Gıda aracılığıyla alınan vejetatif hücreler konakçı bağırsağına ulaşır, spor oluşturması sırasında enterotoksin üreterek gıda zehirlenmelerine neden olurlar (Karasawa vd. 2004).

Bakterinin neden olduğu hastalık "perfringens gıda zehirlenmesi" olarak belirtilmektedir. Hastalık, genel olarak karın krampı ve ishal ile birlikte görülmektedir. Hastalık semptomları arasında ateş ve kusma olmazken, zayıf bünyeli kişilerde sıklıkla halsizlik görülmektedir (Sert vd. 2012). Hastalık belirtilerinin görülmesi, genellikle vejetatif hücrenin vücuda alınmasından 8–16 saat sonra ortaya çıkmakta olup hastalık 24-48 saat süreyle etkisini gösterebilmektedir (Huang 2003).

Clostridium perfringens zehirlenmesinden sorumlu gıdalar çok sayıda enterotoksijenik *C. perfringens* içermektedir (Popoff 2014). Bakterinin neden olduğu karın ağrısı, bulantı ve akut ishal, 10^8 ya da daha fazla sayıda enterotoksin üreten, mide asidinde hayatta kalarak uzun süre kalın bağırsakta spor formda kalabilen vejetatif hücrenin vücuda alınmasıyla görülmektedir (Avila vd. 2014).

Genellikle C tip *C. perfringens*'in ürettiği toksinin yol açtığı gıda zehirlenmeleri, *C. perfringens* tip A'nın neden olduğu gıda zehirlenmelerine göre daha fazla önemsenmektedir. Çünkü toksin A kuvvetli karın ağrısı ve şiddetli diyare oluştururken, toksin C nekrotik enterite neden olmaktadır (Tunail 2000).

Clostridium perfringens tip C, bağırsak iltihaplanmalarına da yol açmaktadır. C tip zehirlenmeler gelişmiş ülkelerde çok nadir görülmektedir. İnkübasyon süresi 5-6 saattir. Kanlı diyare, kusma ve ciddi karın ağrılarına sebep olmaktadır. Bu belirtileri ince bağırsak iltihaplanması takip etmektedir (Brynstad ve Granum 2002).

C. perfringens'in neden olduğu zehirlenmelerin %95'inin, gıdalara uygulanan soğutma işleminin, pişirmenin ardından yeterince hızlı yapılamamasından kaynaklı meydana geldiği ileri sürülmektedir (Li vd. 2012). Hızlı soğutma bu bakterinin gelişiminin önlenmesi için yapılacak ilk kritik adımdır. ABD Tarım Bakanlığı (USDA) pişirilmiş biftek, rosta edilmiş biftek ve konserve sığır etinin iç sıcaklığının, en yavaş soğutmada 48,9 °C'den 12,8 °C'ye 6 saatte ya da daha az sürede getirilmesi ve soğutmanın 4,4 °C'de devam ettirilmesi gerektiğini belirtmiştir (Huang 2003).

C. perfringens gıda zehirlenmesine neden olan temel faktör ısıya dayanıklı sporlardır. Bu sporlar, pişirme sırasında zarar görmeden kalabilir ve pişirme sonrasında çimlenip gelişerek büyük bir hızla gelişme gösterebilir (Juneja 2009). Gıda kaynaklı hastalık ve salgınlar içerisinde, görülme sıklığı açısından ikinci ya da üçüncü sırada bildirilen bir hastalıktır (Popoff 2014). Bu salgınlar genellikle pişirilmiş sığır eti ya da domuz eti, kümes hayvanları özellikle sos ile pişirilmiş olanları bu bakteri açısından yüksek risk taşımaktadır (Popoff 2014). Diğer yandan, meydana gelen gıda zehirlenmesi rapor edilebilir bir hastalık sayılmadığından vaka sayısı da büyük ölçüde göz ardı edilmekle birlikte "perfringens zehirlenmesi" gelişmiş ülkelerde en yaygın gıda kaynaklı hastalıklar arasında görülmektedir (Mcclane 1997).

2011 yılında ABD'de bir okulda görülen *C. perfringens* kaynaklı gıda zehirlenmesinde sorumlu gıdanın, dışarda uzun süre bekletilen barbekü soslu tavuk olduğu belirtilmektedir. Yine ABD' de 2010 yılında hastanede meydana gelen gıda zehirlenmesinin *C. perfringens* kaynaklı olduğu ve bu salgına öğle yemeğinde yenilen tavuk ve salatanın neden olduğu açıklamıştır (www.foodsafetynews.com, 2012).

28 Nisan 2009 tarihinde Diyarbakır'da 114 kişide görülen gıda zehirlenmesinde, zehirlenenlerin %59,1'inin *C. perfringens* kontamine olmuş etli kuru fasülye sonucu zehirlendikleri belirtilmiştir (Dorman vd. 2010).

2008 yılında Cohen ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada market, kasap, fastfood restoranlarından alınan 150 sığır kıyması ve 100 sosis örneklerinden baharatsız olanlarının %8,7'sinde, baharatlı olanların ise %29,6'sında *C. perfringens* varlığına rastlanmıştır.

Crouch ve Golden' nın (2005) yaptıkları bir araştırmada 1990-1999 yılları arasında meydana gelen *C. perfringens* salgınlarındaki gıda dağılımı incelendiğinde, en fazla et ve kanatlı ürünlerinin yer aldığı görülmektedir (Çizelge 2.5).

Wen ve McClane (2004), yaptıkları bir çalışmada, ABD'de satışa sunulan gıdalardan alınan toplam 147 tavuk örneğinin 56 adedinde (%38), 108 sığır kıyma örneğinin 25'inde (%23), 68 hindi örneğinin 19 adedinde (%28) ve 83 sığır eti örneğinin 17'sinde (%21) 2-5 EMS/g, 3-32 EMS/g 1-19 EMS/g, 1-10 EMS/g, bakteri varlığı tespit edilmiştir.

Afyonkarahisar' da yapılan bir çalışmada ise piyasadan satın alınan 30 adet sucuk örneğinin 2'sinde (%6,67) 10^1 kob/g düzeyinde *C. perfringens* tespit edilmiştir (Çon vd. 2002).

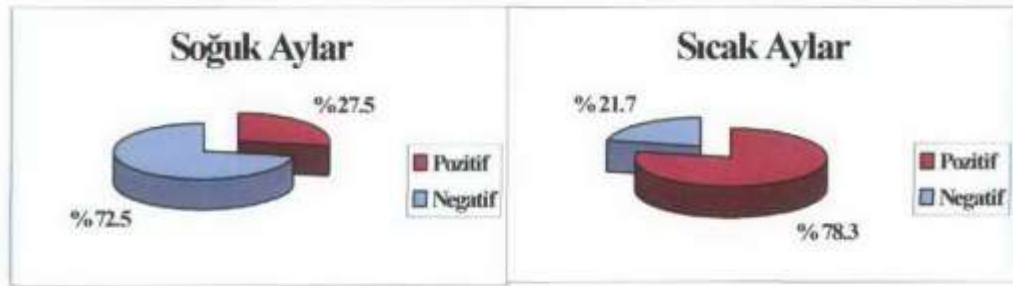
Yapılan başka bir çalışmada Ankara piyasasından alınan ısıtılmış işlem görmüş 16 örnekten, nugget ve tavuk döner örneklerinde 10^3 kob/g limit değerinin üzerinde koloni tespit edilmiştir (Sert vd. 2012).

2002 yılında Kayseri piyasasından satın alınarak analiz edilen 100 adet kıyma örneğinin 61'inde (%61) *C. perfringens* varlığı tespit edilmiştir (Gönülalan ve Köse 2002).

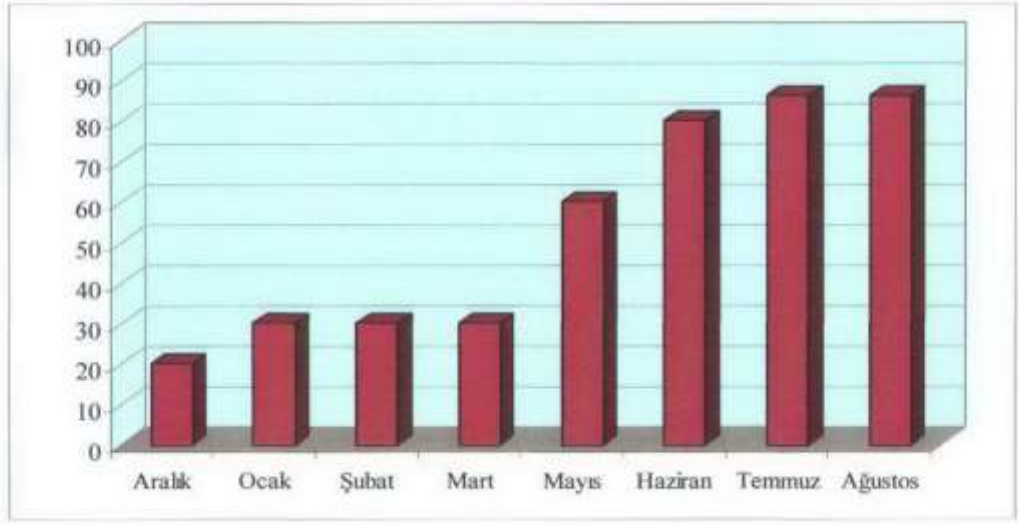
Erzurum' da yapılan bir çalışmada, günün 12.00-13.00 saatleri arasında 8 farklı işletmeden toplanan 40 adet pişmiş döner örneğinin %85'inde 10 kob/g'ın altında *C. perfringens* varlığı tespit edilmiştir (Kaya ve Küpeli Gençer 2002).

Tekirdağ' da 2003 yılında yapılan bir çalışmada analiz edilen çiğ dönerlerin %80'inde, pişirilmiş tavukların %60'ında ve sığır etlerinin %40'ında *C. perfringens* varlığı saptanmıştır (Yılmaz vd. 2003).

Sarıgüzel (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, gıdalarda *Clostridium perfringens*' in bulunmasında mevsimsel farklılığının önemi irdelenmiştir. Çalışmada, soğuk aylarda (Aralık-Mart) 40 adet hindi kıyması örneğinin 11'inden (%27,5), sıcak aylarda alınan 60 adet örneğin 47'sinde (78,3) *C. perfringens* izolasyonu ve aylara göre yüzde dağılımları gösterilmiştir (Şekil 2.1- 2.2).

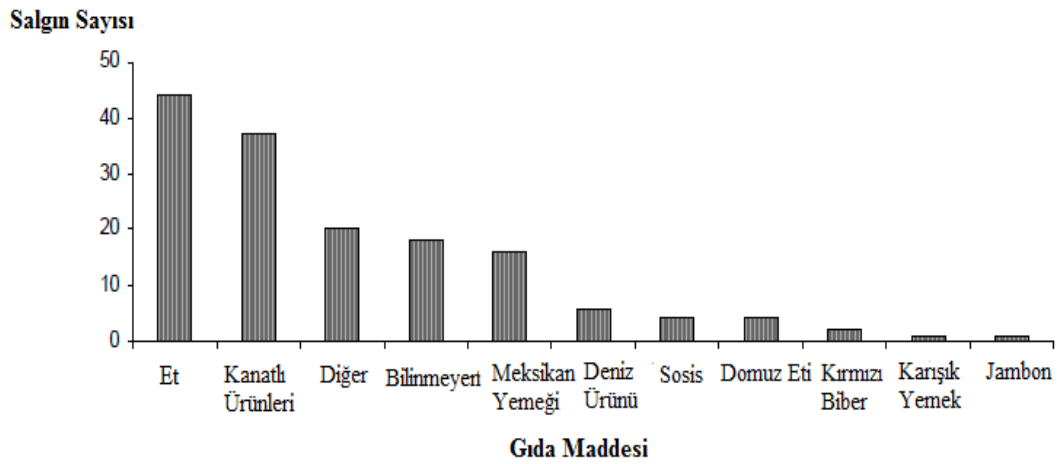


Şekil 2.1 Ankara piyasasından sağlanan hindi kıymalarından izole edilen *C. perfringens*'in mevsimsel dağılımı (Sarıgüzel 2005)



Şekil 2.2 Ankara piyasasından sağlanan hindi kıymalarından izole edilen *C.perfringens*'in aylara göre % değerleri (Sarigüzel 2005)

Genellikle yetersiz soğutmanın yapıldığı, ev, perakende veya yemek servisi yapılan yerlerde görülen *C. perfringens* salgınları, nadiren de et işlenmesinde kullanılan ticari malzemelerin hazırlanması ve yanlış uygulanmasından (Şekil 2.3) (Crouch ve Golden 2005), uygun olmayan soğutmayla, hazırlık ve gıda tüketimi arasındaki uzun bekleme süresi, ardından yetersiz yeniden ısıtma ile ilişkilidir (Jaloustre vd. 2013).



Şekil 2.3 1990-1999 yılları arasında meydana gelen *C. perfringens* salgınlarındaki gıda dağılımı (Crouch ve Golden 2005)

Resmi gazetede 06.02.2009 tarihinde 2009/6 tebliğ numarası ile yayınlanan, üzerinde değişiklik yapılan Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği incelendiğinde *Clostridium perfringens* aranma zorunluluğu olan gıdalar belirtilmiştir (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3 Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği' ne Göre *C. perfringens* Aranma Zorunluluğu Bulunan Gıdalar

Gıda	Numune Alma planı		Limitler	
	N	C	m	M
Hazırlanmış kırmızı et karışımları ve hazırlanmış kanatlı eti karışımları (soğutulmuş, dondurulmuş)	5	2	10 ³	10 ⁴
Kürlenmiş ve kurutulmuş (pastırma, vb.)	5	2	10 ³	10 ⁴
Sakatat	5	2	10 ³	10 ⁴
Isıl işlem görmüş et ürünleri (sosis, salam, kavurma, döner, köfte, jöle işkembe vb.)	5	2	10 ²	10 ³
Doğrudan tüketime sunulan çözünen toz karışımlar(Sadece et içerenler)	5	2	10 ²	10 ³
Pişirildikten sonra tüketime sunulan çözünen toz karışımlar(Sadece et içerenler)	5	2	10 ³	10 ⁴
Et, sebze ve diğer dolgu maddeleri ile doldurulmuş makarna, mantı benzeri ürünler (çiğ, dondurulmuş) (Sadece et içerenler)	5	2	10 ³	10 ⁴
Et, sebze ve diğer dolgu maddeleri ile doldurulmuş makarna, mantı benzeri ürünler (fırınlanmış) (Sadece et içerenler)	5	2	10 ²	10 ³
Tüketime hazır olmayan	5	2	10³	10⁴
Tüketime hazır	5	2	10²	10³

n: Partiden bağımsız ve rastgele seçilen numune sayısı

c: m ve M arasında olmasına izin verilen maksimum numune sayısı(M değeri taşıyabilecek en fazla numune sayısı)

m: (n-c) sayıdaki numunede bulunabilecek en fazla mikrobiyolojik değeri

M: c sayıdaki numunenin bu değeri aşması halinde uygunsuz olup kabul edilemez olduğunu gösteren mikroorganizma sayısı

Çizelge 2.3'te yer alan işaretli olan satırdaki gıdalar yapılan değişiklikle 29 Aralık 2011 Tarihli ve 28157 Sayılı Resmî Gazete' de yayınlanmış olan Türk Gıda Kodeksi

Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği Gıda Güvenliği Kriterleri' nde yer almamaktadır.

2.4 *Clostridium perfringens* Salgınları

Türkiye'de Sağlık Bakanlığı, 2005 yılı verilerine göre; 5168 klinik tifo vakası, 10514 olası tifo vakası bildirilmiş olup, gıda kaynaklı salgınlara en fazla *S. aureus* ve *C. perfringens* patojenlerinin neden olduğu ifade edilmektedir (Dorman vd. 2010)

Japonya'da, son yıllarda *C. perfringens* kaynaklı gıda zehirlenmesi nedeniyle hasta olan kişi sayısı, en yaygın görülen bakteri kaynaklı gıda zehirlenmeleri arasında 3. ya da 4 sıradadır (Mcclane ve Wen 2004).

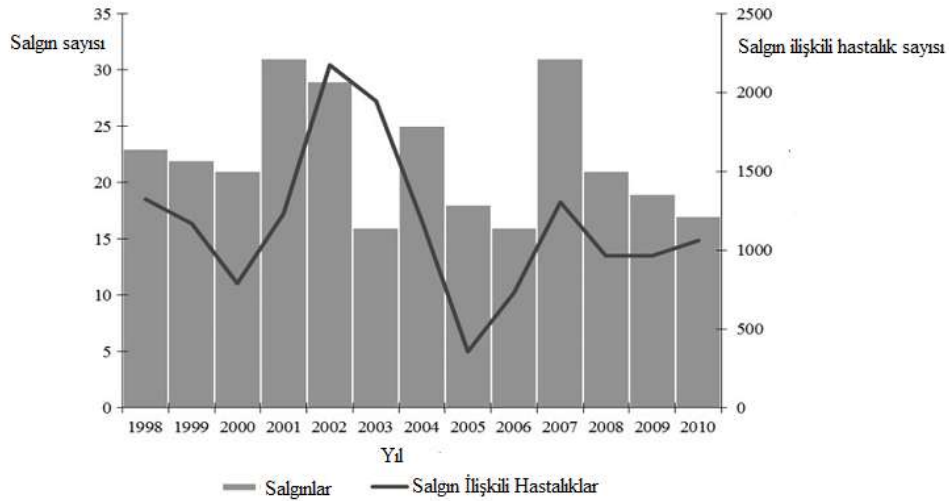
11 Eylül 2001 tarihinde Japonya'da gerçekleşen bir salgında yedikleri yiyeceklerle 464 kişi ve hastanede tedavi gören 161 hastada bazı semptomlar görülmüştür. İshal (%96,9), karın ağrısı (% 67,7), halsizlik (%11,2), bulantı (%6,8), ateş (%5) ve kusma (%3,1) hastalığın belirtisi olarak gösterilmiştir. Kuluçka süresinin 11 saat olduğu belirtilen bakteri için dışkı örneği ishal belirtilerinin başlamasından 4 gün sonra laboratuvarında incelenmiştir, Yapılan ilk incelemelerde şüpheli olarak *C. perfringens* düşünülse de analizlerde bu bakteriye rastlanamamıştır. Daha sonra uygulanan zenginleştirme içeren yöntemle, salgına ilk önce düşünüldüğü gibi *C. perfringens'* in neden olduğu açıklanmıştır (Nishikawa vd. 2003).

2000-2005 yılları arasında Japonya'da görülen yaklaşık 20-40 arasında değişen *C. perfirngens* kaynaklı gıda salgınında, her yıl yaklaşık 4.000 kişinin hastalandığı bildirilmiştir (Miyamoto vd. 2008).

Amerika'da, Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi tahminlerine göre bu bakterinin neden olduğu gıda zehirlenmesi, her yıl yaklaşık 250, 000 kişinin hastalanmasıyla sonuçlanmaktadır. *C. perfringens* tip A gıda zehirlenmesinin ölüme neden olması çok sık görülen bir durum olmamakla birlikte yaşlı ve zayıf bünyeli kişilerde ölümler meydana gelmektedir. Bu gıda zehirlenmesinin, Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda

yaklaşık 7 kişinin, Birleşik Krallık'ta 50-100 arasında değişen bir sayıda kişinin ölümüne sebep olduğu tahmin edilmektedir (Adak vd. 2002).

1998-2010 yılları arasında, Amerika Birleşik Devletleri'nde 14,918 gıda kaynaklı salgın meydana geldiği rapor edilmiştir. Bu salgınlardan 298,197 adedinin hastalıkla sonuçlandığı belirtilmiştir. Bunların, 9,691'i hastanede tedavi edilen hasta, 232 tanesi ölümle sonuçlanan vaka olarak rapor edilmiştir. Bu salgınların 823'ü(%6), 28,543 (%10) kişinin hasta olmasına sebep olmuştur ki bu olayın *Clostridium perfringens* kaynaklı gıda salgını olduğundan şüphelenilmiştir. Araştırma yapılan yıllar arasında *C. perfringens*' in, *Salmonella*' dan sonra ikinci en yaygın gıda kaynaklı salgına sebep olan bakteri olduğu, 823 salgınının 289'unun (%35) *Clostridium perfringens* kaynaklı olduğu ortaya çıkmıştır. Meydana gelen 289 salgın sonucunda 15,208 hastalığın 83'ü hastanede tedavi edilebilen türden olup, 8'i ölümle sonuçlanmıştır (Şekil 2.4) (Grass vd. 2013).



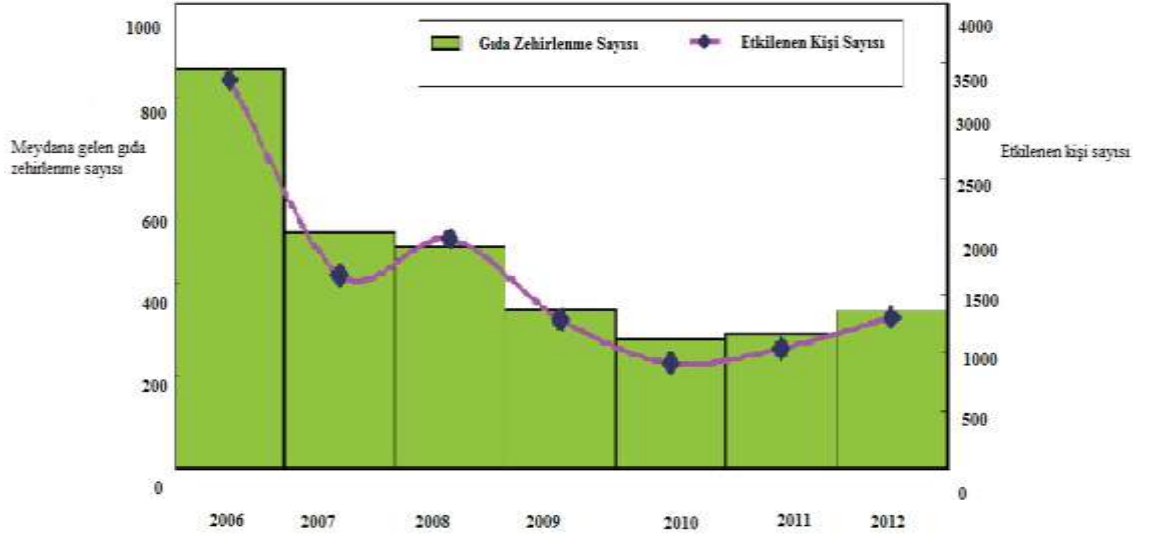
Şekil 2.4 1998-2010 yılları arasında ABD'de meydana gelen salgın ve salgın kaynaklı hastalık sayısı (Grass vd. 2013)

Yerel sağlık yetkilileri sorumlu gıdanın barbekü soslu tavuk olduğunu, gıdanın temin edildiği restoranın gıdayı güvenli olmayan sıcaklıkta taşıyıp, öğlen 15.00 ve 19.00 saatleri arasında herhangi bir ısıtma ya da soğutma işlemi olmaksızın açıkta bekleterek servis yaptıklarını belirtmiştir. 2010 yılı Mayıs ayında ise Louisiana Devlet

Hastanesi'nde tavuk ve salata tüketen hastaların 40 dan fazlasında gıda zehirlenmesi belirtileri görülmüş ve daha sonra yapılan testlerde bunun *C. perfringens* kaynaklı gıda zehirlenmesi olduğu belirtilmiştir. Hastalardan 43 yaşındaki bir kadın, 41 ve 52 yaşlarındaki erkek hastaların bu bakteri sebebiyle öldüğü belirtilmiştir (www.foodsafetynews.com, 2012).

2012 yılı 21 Haziran günü, Norveç Gıda Güvenliği Kurumu'na, bölgeye gelen 6 farklı yüzme takımındaki kişilerin büyük bir kısmında bağırsak kaynaklı hastalık görüldüğü bilgisi iletilmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda hastalarda görülen karın ağrısı ve mide bulantısı şikayeti *C. perfringens* ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan mikrobiyolojik analizlerde, zehirlenmeye sebep olan bakterinin *C. perfringens* olduğu doğrulanmıştır. Bu zehirlenme sonucunda 111 kişinin hastalandığı belirtilmiştir (Wahl vd. 2013).

Hong Kong'daki yapılan bir çalışmaya göre, 2012 yılında meydana gelen gıda zehirlenmeleri 2011 yılına göre artış göstermiştir (Şekil 2.5). *Clostridium perfringens*'in neden olduğu hastalıktan etkilenen kişi sayısında da yıllara bağlı olarak artış olduğu gözlenmiştir (Çizelge 2.4). Bu artışa çapraz kontaminasyon, yetersiz ısıtma işlem gibi faktörlerin neden olduğu düşünülmektedir. 2011 yılında meydana gelen 8 salgında 28 kişi etkilenirken, 2012 yılında meydana gelen 22 salgından 233 kişi etkilenmiştir (Lo 2013).



Şekil 2.5 2006-2012 yılları arasında Hong Hong'da gıda zehirlenmelerinden etkilenen kişi sayısı (Lo 2013)

Çizelge 2.4 2011-2012 yılları arasında gıda zehirlenmelerinden meydana gelen değişim (Lo 2013)

Grup	Etken	2011		2012	
		Salgın Sayısı	Etkilenen Kişi Sayısı	Salgın Sayısı	Etkilenen Kişi Sayısı
Bakteri	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	98	332	137	482
Bakteri	<i>Clostridium perfringens</i>	8	28	22	233
Virüs	Noravirüs	20	98	44	203
Bakteri	<i>Salmonella</i> spp.	57	282	53	161
Bakteri	<i>Staphylococcus aureus</i>	30	83	36	86
Bakteri	<i>Bacillus cereus</i>	17	72	23	66
Biyotoksin	Shigatoksin, histamin vb.	27	60	9	24
Kimyasal	Nitrit, Kalsiyumoksalat vb.	11	13	5	6

2.5 *Clostridium perfringens* Standart Analiz Yöntemi

C. perfringens aranması ve sayımı için ön zenginleştirme yapılmaksızın, doğrudan selektif besiyeri Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC) kullanılmaktadır. Bunun nedeni, *C. perfringens* içerdiğinden şüphe edilen gıdalarda genel olarak hücre sayısının yüksek oranlarda bulunması ve bu besiyerinin selektif özelliğe sahip olmasındandır (Kuleaşan 2000).

Patojenin, aranması ve sayımı için daha çok klasik metotların tercih edilmesinin sebebi zehirlenmelerin önlenmesinin kolay olması ve ölüm/vaka oranının çok düşük olması ile açıklamaktadır. Hızlı analiz teknikleri fazla olmamakla beraber yeni metotlar da geliştirilmektedir. ELISA ve benzeri hızlı analiz teknikleri ise genellikle tıbbi öneme sahip suşlar için kullanılmaktadır (Kuleaşan 2000).

2.6 *Clostridium perfringens* Hızlı Analiz Yöntemi (MUP İlave Edilmiş Besiyeri Kullanımı)

C. perfringens sayımında son yıllarda geliştirilmiş olan teknikte TSC Agar besiyerine MUP (4-Methylumbelliferyl phosphate) ilave edilmesi esastır. Fluorejenik bir substrat olan MUP alkali ve asit fosfataz için kullanılır. Asit fosfataz, *C. perfringens* için yüksek spesifikliğe sahip bir enzimdir. Asit fosfataz enzimi, MUP'u 4-methylumbelliferone'a parçalar. Bu parçalanma ürünü 366 nm uzunluğa sahip uzun dalga boyunda ultraviyole el lambası ile floresan ışımaya özelliği gösterir. Yapılan testlerde bu tip kolonilerin çok yüksek bir oranda *C. perfringens* olduğu tespit edilmiştir. Doğrulama testlerinde 24-48 saat süre gerekmektedir. MUP içeren besiyeriyle yapılan analizde, toplam 24 saat sonunda sonuç alma avantajı bulunmaktadır (Kuleaşan 2000).

2.7 *Clostridium perfringens*'in Moleküler Tanımlanması

C. perfringens'in cpe pozitif ve cpe negatif suş içeren gıda örnekleri aracılığıyla ortaya çıkan gıda zehirlenmesi vakalarını tespit etmek için yüksek hassasiyet ve uygulanabilirliği olan yöntemler kullanmak gerekmektedir (Miyamoto vd. 2008).

Mikrobiyal kaynak izleme (MST) yöntemleri, mikroorganizmanın gıdaya ne ölçüde bulaştığını ve bakterinin olası türlerinin tanımlanmasını sağlar. MST, moleküler yaklaşımlarla, bakteri düşük bir sayıda olsa bile tespit edebildiği için faydalıdır. Dolayısıyla, kullanılan MST yöntemleri gıdaya ve çevreye kontamine olan, cpe pozitif *C. perfringens*'i cpe negatif *C. perfringens*'ten ayırabilir. Ancak, geniş bir yaşam alanı bulunan *C. perfringens* MST için zor bir bakteridir (Miyamoto vd. 2011).

Moleküler yöntemler, PCR, iç içe PCR, gerçek zamanlı PCR ve döngü aracı izotermal amplifikasyon (LAMP), cpe tespiti için geliştirilen ilk yöntemlerden bazılarıdır. Cpe pozitif *C. perfringens*'in görüldüğü temel gıdalardan biri olan et örnekleri, gıda zehirlenmesine neden olduklarında bu yöntemler kullanılarak bakterinin tespiti yapılmaktadır (Miyamoto vd. 2011).

C. perfringens enterotoksinini tespit etmek için kullanılan serolojik yöntemler arasında microslide difüzyon, tek veya çift jel difüzyon, elektro-immunodifüzyon ve enzim bağlı immunosorbent uygulama (ELISA) tekniği de yer almaktadır. ELISA yönteminin hassasiyeti, *C. perfringens* enterotoksin miktarının ve türünün saptanması açısından oldukça iyi olması bu yöntemi önemli bir yöntem haline getirmektedir (Juneja 2011).

3. MATERYAL ve METOT

3.1 Materyal

Çalışmada *C. perfringens* izolasyonu için et içeren tüketime hazır gıdalar kullanılmıştır. Bu örneklerin bir kısmı Ankara, diğer bir kısmı ise Aksaray'daki satış yerlerinden temin edilmiştir. Ankara'dan alınan örnekler aynı gün içerisinde bekletilmeden analize tabi tutulmuş, Aksaray'dan alınan örnekler ise steril örnek kaplarında, 4 °C'de depolanmış olarak Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Gıda Mikrobiyolojisi laboratuvarına getirilerek incelenmiştir (Çizelge 3.1- 3.2).

Tez çalışmasında incelenen numunelerde hem *C. perfringens* varlığı, sayısı belirlenmiş olup hem de suşların izolasyonu yapılmıştır. Muhtemel *C. perfringens* kolonilerinin, doğrulama testleri de yapılmıştır. İzolatların CASO Broth'da hazırlanan aktif kültürleri, %25 gliserol içeren endorff tüplerde -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2 Metot

3.2.1 Gıda örneklerinin analiz için laboratuvara getirilmesi

Ankara'da, market ve tüketim yerlerinden alınan gıda örnekleri, steril kaplar içerisinde doğrudan laboratuvara getirilmiş ve analizi yapılmıştır. Aksaray'dan alınan örnekler ise steril kaplara konularak, 4 °C'deki soğutma kabında laboratuvara taşınmıştır.

3.2.2 Gıda örneklerinin analize hazırlanması

Laboratuvara getirilen gıda örnekleri steril %0,1'lik Peptonlu su içeren stomacher torbasına, aktarılmış ve 1 dakika süreyle düşük devirde stomacher cihazında (Stomacher 400, Seward Medical, UK) homojenize edilmiştir. Düşük devir ve kısa

süre homojenizasyon için önemlidir. Çünkü homojenizasyon sırasında yüksek hız ve devir seçilmesi, örnek içerisinde fazla havanın girmesine neden olarak, anaerob olan *C. perfringens*'in zarar görmesine ve hücre sayımında varolandan daha az sayıda bakteri sayısı tespit edilmesine neden olduğu belirtilmiştir (Kuleaşan 2000).

3.2.3 Gıda örneklerinde *Clostridium perfringens* aranması

Belli aralıklarla, Ankara'daki farklı semtlerde bulunan market, yemekhane, lokanta ve bazı satış yerlerinden 28 adet (Çizelge 3.1), gün içerisinde bakteri sayısındaki değişimi gözlemlemek amacıyla alınan 12 adet (Çizelge 3.3), Aksaray'daki kafe, lokanta, yemekhane ve satış yerlerinden alınan 28 adet gıda örneği (Çizelge 3.2) uygun koşullar altında laboratuvara getirilmiştir.

İlk dilüsyon için 225 mL, diğer seri dilüsyonlar için ise 9 mL'lik cam test tüplerinde hazırlanan Peptonlu su (Merck, Germany) ve 3 mL olarak hazırlanan saf su çözeltileri 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edilmiştir. Steril TSC Agar (Merck, Germany) 50 °C'ye kadar soğutulmak üzere sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Diğer yandan, bir şişe TSC Agar katkısına (Merck, Germany) 3 mL'lik steril saf su ilave edilerek karıştırılmıştır. Bu çözelti 50 °C'ye kadar soğutulmuş olan besiyeri içine katıldıktan sonra sıvı besiyeri steril plastik Petri kaplarına 15 mL olacak şekilde dökülerek oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

Laboratuvara getirilen gıda örnekleri 225 mL'lik Peptonlu su ile homejenize edilerek ilk dilüsyon hazırlanmıştır. İlk dilüsyondan sonra, uygun (10^{-4} ve 10^{-5}) seyreltme oranına kadar dilüsyon işlemine devam edilmiştir. Seyreltme işleminden sonra yayma ekim yöntemi kullanılarak TSC Agar bulunan Petrilere ekim yapılmıştır.

Ekim yapılan Petriler, Anaerocult A (Merck, Germany) kullanılarak anaerobik koşulların oluşturulduğu anaerobik jar içinde 35-37°C' da 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır (Cho vd. 2014).

İnkübasyon süresinin bitiminde siyah koloni oluşumu gözlenen Petrilerdeki koloniler (Şekil 3.1) uzun dalga boylu UV lambası altında incelenmiştir. Floresan ışığa yapan koloniler muhtemel *C. perfringens* olarak kabul edilmişlerdir. Koloniler öze yardımıyla, içerisinde 5 mL CASO Broth (Merck,Germany)' olan tüplere aktarılmış ve 35-37°C'de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda gelişmenin belirtisi olarak bulanıklık görülen tüplerden öze yardımıyla TSC Agar besiyerine sürme yapılmış ve Petriler 35-37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sürenin bitiminde Petriler incelenmiş ve gelişme görülen Petrilerden tek koloni alınarak aynı işlem tekrar gerçekleştirilmiştir. En son durumda sıvı besiyerinde aktif olan kültür doğrulama testleri yapıncaya kadar saklanmak amacıyla %25'lik gliserol stok çözeltisi içeren ependorf tüplerine (750 µL aktif kültür + 250 µL gliserol) aktarılmış ve dondurularak muhafaza edilmiştir (Altınparmak ve Baştaş 2011).

Çizelge 3.1 Analiz için Ankara'dan alınan gıda örnekleri

No	Gıda Örneği	Özellikler1	Özellikler2
1	Tavuk Döner	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
2	Salam	Isıl İşlem Görmüş	Dana Etinden
3	Sosis	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
4	Sucuk	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
5	Etlı sebze yemeği	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
6	Çiğer sote	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
7	Et içerikli soğuk meze	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
8	Mantı	Isıl İşlem Görmemiş	Dondurulmuş
9	Etlı Bezelye Yemeği	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
10	Mantı	Isıl İşlem Görmemiş	Fırınlanmış
11	Et Döner	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
12	Tavuk suyu tableti	Isıl İşlem Görmemiş	Tüketime Hazır Olmayan
13	Tavuk eti içeren yemek	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
14	Izgara Köfte	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
15	Kavurma	Isıl İşlem Görmüş	Vakumlu

Çizelge 3.1 Analiz için Ankara'dan alınan gıda örnekleri (devam)

16	Etli Fasülye Yemeği	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
17	Etli çorba	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
18	Mantı	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
19	Tavuk Sote	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
20	Salam	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
21	Hamburger Köftesi	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
22	Nugget	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
23	Şinitzel	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
24	Ev tipi sulu köfte	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
25	Ev tipi etli nohut yemeği	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
26	Garnitürlü Et	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
27	Sucuk	Isıl İşlem Görmemiş	Fermente Ürün
28	Et suyu Tableti	Isıl İşlem Görmemiş	Tüketime Hazır Olmayan

Çizelge 3.2 Analiz için Aksaray'dan alınan gıda örnekler

No	Gıda Örneği	Özellikler1	Özellikler2
1	Tavuk Döner	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
2	Salam	Isıl İşlem Görmüş	Dana Etinden
3	Sosis	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
4	Sucuk	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
5	Etli sebze yemeği	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
6	Et içerikli ev tipi yemek	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
7	Çiğer sote	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
8	Et içerikli soğuk meze	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
9	Mantı	Isıl İşlem Görmemiş	Dondurulmuş
10	Mantı	Isıl İşlem Görmemiş	Fırınlanmış
11	Tavuklu soğuk sandviç	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
12	Et Döner	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır

Çizelge 3.2 Analiz için Aksaray'dan alınan gıda örnekler (devam)

13	Et suyu tableti	Isıl İşlem Görmemiş	Tüketime Hazır
14	Tavuklu patates yemeği	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
15	Şavurma	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
16	Izgara Köfte	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
17	Kavurma	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
18	Et içeren Türlü Yemeği	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
19	Et içerikli ev tipi yemek	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
20	Etlı pide	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
21	Mantı	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
22	Salam	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
23	Hamburger Köftesi	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
24	Nugget	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
25	Şinitzel	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
26	Kızartılmış köfte	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
27	Etlı kuru fasülye yemeği	Isıl İşlem Görmüş	Tüketime Hazır
28	Sucuk	Isıl İşlem Görmemiş	Fermente Ürün

Çizelge 3.3 Analiz için Ankara'dan günün farklı saatlerinde alınan gıda örnekler

Gıda Örnekleri	Temin Yerleri	Saatler		Özelliği
		09.00	19.00	
Gıda Örnekleri	A ve B Üretim Yeri	Tavuk Döner(X, x)		Tüketime Hazır
	A ve B Üretim Yeri	Et İçerikli Sebze Yemeği(Y, y)		Tüketime Hazır
	A ve B Üretim Yeri	Etsiz Sebze Yemeği(Z,z)		Tüketime Hazır

Çizelge 3.3 Analiz için Ankara' dan günün farklı saatlerinde alınan gıda örnekleri (devam)

Gıda Örnekleri	A ve B Üretim Yeri		Tavuk Döner(X1, x1)	Tüketime Hazır
	A ve B Üretim Yeri		Et İçerikli Sebze Yemeği (Y1,y1)	Tüketime Hazır
	A ve B Üretim Yeri		Etsiz Sebze Yemeği (Z1,z1)	Tüketime Hazır

X, Y, Z, X1, Y1,Z1, A üretim yerinden; x, y, z, x1, y1, z1 B üretim yerinden alınan gıda örnekleri



Şekil 3.1 TSC Agar' da *Clostridium perfringens* kolonilerinin görünümü

3.2.4 İzole edilen muhtemel *Clostridium perfringens* bakterilerinin doğrulanması

İzole edilen, 366 nm uzunluğa sahip dalga boylu UV lamba altında floresan ışığa yapan muhtemel *C. perfringens* bakterilerinin doğrulanması amacıyla Gram boyama,

hareket testi, nitrat testi, laktoz testi, jelatin testi ve Voges Proskauer (V-P) gibi bazı biyokimyasal testler yapılmıştır (Gökmen ve Alisharlı 2003).

3.2.4.1 Gram boyama

Kolonilerin doğrulamasını yapmak amacıyla uygulanan gram boyama Temiz (2000)'e göre yapılmıştır. Test sonucunda hata olmaması için, analiz için 18-24 saatlik kültürler kullanılmıştır.

3.2.4.2 Hareket testi

İzole edilen kolonilerin hareketlilik özelliklerini belirlemek için, CASO Broth besiyerinde aktifleştirilmiş olan kültür, test tüplerinde bulunan yumuşak agarlı hareket nitrat katı besiyerine iğne öze yardımıyla batırma kültür tekniği ile inoküle edilmiştir. Bakteriler, 35-37 °C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda ekim yapılan hat boyunca görülen, yanlara doğru yayılmış bulanıklık şeklinde üremenin olması bakterinin hareketli, inokülasyon hattı boyunca yayılma olmadan gerçekleşen üremenin görülmesi bakterinin hareketsiz bakteri olduğunu göstermiştir (Halkman 2005).

3.2.4.3 Nitrat testi

Hareket testinin ardından, yumuşak agarlı hareket- nitrat besiyerinde nitrat testi uygulanmaktadır. Besiyeri tüpüne, 0,5 mL nitrit reaktifi ilave edilip vorteks mikserde karıştırılmıştır. Tüpte kırmızı rengin oluşması nitratın nitrite indirgendiğini göstermektedir. 15 dakika boyunca rengin oluşmadığı durumda bir miktar çinko tozu ilave edilerek 10 dakika boyunca bekletilir. Çinko ilavesinden sonra kırmızı renk oluşumu yine görülmezse bu durumda nitratın nitrite indirgendiği, nitritin de amonyağa indirgendiği anlaşılır ve test sonucuna göre, nitrat pozitif olarak

değerlendirilir. Çinko tozu ilavesinden sonra renk değişimi gözlenirse nitrat testi negatif olarak değerlendirilmiştir (Halkman 2005).

3.2.4.4 Laktoz- jelatin testi

Uygulanan laktoz jelatin testi ISO 7937' e göre yapılmıştır. Seçilmiş olan kolonilerin 18-24 saatlik kültürleri Laktoz-Jelatin Medium besiyerine ekimi yapıldıktan sonra anaerobik koşullarda 37 °C 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde tüplerde, laktoz fermantasyonu sonucunda gaz oluşumu ve asit oluşumunun neden olduğu kırmızıdan sarıya renk değişimi laktoz pozitif olarak değerlendirilmiştir. Tüplerin 5 °C'de 1 saat soğutulmasıyla jelatinin sıvılaşp sıvılaşmadığı kontrol edilip, sıvılaşmanın görüldüğü tüpler jelatin pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4.5 Voges proskauer testi

Sıvı besiyerinde aktifleştirilmiş olan 20 saatlik kültürden 5 mL alınarak, steril haldeki 10 mL'lik MR-VP Broth (Merck, Germany) besiyerine aktarılmış ve tüpler 37 °C 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında tüpler üzerine 0,6 mL α -naftol çözeltisi, ardından 0,2 mL %40'luk KOH çözeltisi ilave edilip 4 saat bekletilerek kiraz kırmızısı renk oluşumu gözlenen tüpler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz 2000).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

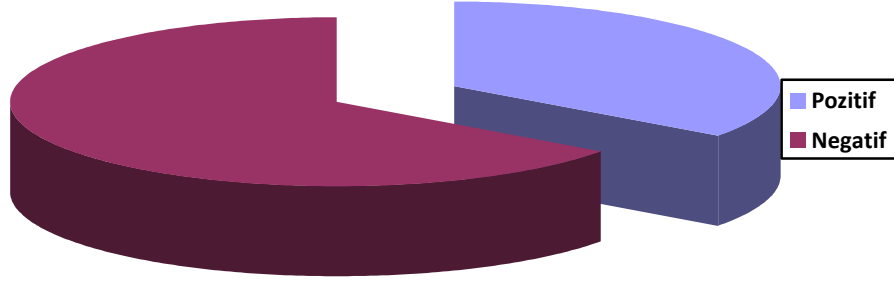
Çalışmada, Ankara ve Aksaray'daki farklı üretim yerlerinden alınan gıda örneklerinin *Clostridium perfringens* varlığı yönünden incelemesi yapılmıştır.

Ankara'dan 28 adet, Aksaray'dan 28 adet olmak üzere temin edilen 56 adet gıda örneğinde bakteri varlığının tespiti için analiz yapılmıştır. Bunların dışında Ankara'da 2 farklı üretim yerinden akşam ve sabah saatlerinde olmak üzere 2 parti olarak alınan 3 farklı gıdaya ait 12 örnek ise bakterinin gelişme nedenini belirlemek amacıyla alınmıştır.

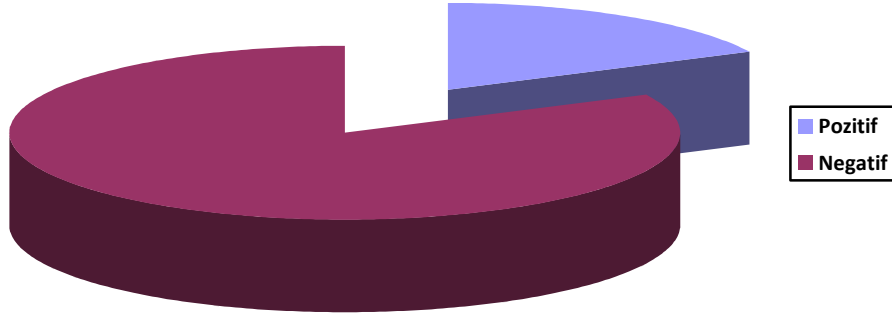
Ankara'dan alınan 40 adet örneğinin 14 (%35) tanesinde, Aksaray'dan alınan 28 adet örneğin 5 (%17,9) tanesinde muhtemel *C. perfringens* kolonileri tespit edilmiştir (Şekil 4.2- 4.3). UV lamba altında ışımaya yapan kolonilerin doğruluğunu kontrol etmek için biyokimyasal testler yapılmıştır.



Şekil 4.1 UV lamba altında Işıma Yapan Koloniler



Şekil 4.2 Ankara'dan alınan örneklerden izole edilen *Clostridium perfringens* yüzdesi
Toplamda 40 gıdanın 14 (%35) tanesi *C. perfringens* pozitifdir, 26'sı (%65) negatifdir



Şekil 4.3 Aksaray'dan alınan örneklerden izole edilen *C. perfringens* yüzdesi
Toplamda 28 gıdanın 5 (%17,9) tanesi *C. perfringens* pozitifdir.

4.1 Gıda Örneklerindeki Koloni Sayım Sonuçları

Ankara'dan satın alınan 28 adet örneğin 6'sında, Aksaray'dan alınan 28 adet örneğin 5'inde (Çizelge 4.2) ve bunların dışında 2 farklı yerden sabah ve akşam saatlerinde alınan 12 adet gıda örneğinin 8 adedinde (Çizelge 4.1) muhtemel *C. perfringens* kolonileri belirlenmiştir. Örneklerde bulunan *C. perfringens* sayıları da aynı çizelgelerde verilmiştir.

Çizelge 4.1 Günün Farklı Saatlerinde Alınan Gıda Örneklerindeki Koloni Sayıları

Üretim Yerleri				
A Üretim Yeri			B Üretim Yeri	
	Sayı (Kob/g)			Sayı (kob/g)
Gıda Örnekleri	09.00	19.00	09.00	19.00
Tavuk Döner	$6,5 \times 10^1$	$2,36 \times 10^2$	$1,2 \times 10^1$	$1,35 \times 10^2$
Etli Ev Tipi Yemek	$1,8 \times 10^1$	$10^3 - 10^4$	$5,4 \times 10^1$	$10^3 - 10^4$
Etsiz Ev Tipi Yemek	0	0	0	0

Çizelge 4.2 Gıda Örneklerindeki *C. perfringens* koloni sayıları (kob/g)

Gıda Örneği	Temin Edilen İl	Sayı (kob/g)
Tavuk Döner (A)	Ankara	$2,84 \times 10^2$
Etli Sebze Yemeği(B)	Ankara	$1,98 \times 10^2$
Etli Bezelye Yemeği(C)	Ankara	$10^3 - 10^4$
Mantı (Çiğ)(D)	Ankara	$1,36 \times 10^2$
Etli Fasulye Yemeği(E)	Ankara	$10^3 - 10^4$
Sucuk (Fermente)(F)	Ankara	$7,9 \times 10^1$
Et içerikli ev tipi yemek(G)	Aksaray	$10^3 - 10^4$
Hamburger Köftesi(H)	Aksaray	$8,5 \times 10^1$
Tavuklu Patates (I)	Aksaray	$1,02 \times 10^2$
Tavuk Döner(J)	Aksaray	$1,74 \times 10^2$
Etli kuru fasulye(K)	Aksaray	$2,79 \times 10^2$

4.2 Gram Boyama Sonuçları

Toplamda alınan 68 adet örnekten 19 tanesinde muhtemel *C. perfringens* sonucu alındıktan sonra yapılan doğrulama testlerinde gram boyama sonucunda hepsi Gram + bakteriler olarak tespit edilmiştir. Ayrıca bakterilerinin çubuk şeklinde oldukları da doğrulanmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Bakterinin mikroskobik görüntüsü

4.3 Hareket Testi Sonuçları

Muhtemel *C. perfringens* örneklerine yapılan hareket testi sonucunda tüplerde ekim hattı boyunca meydana gelen gelişme bakterilerin hareketsiz olduklarını göstermektedir. Hareket testi sonucu negatif çıkmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Hareket testi sonucu

4.4 Nitrat Testi Sonuçları

Hareket testi ardından yapılan nitrat testinde besiyeri içeren tüpe 0,5 mL nitrit reaktifi ilave edilip vortekste karıştırılmıştır. Tüpte kırmızı rengin oluşması nitratın nitrite indirgendiğini yani nitrat testinin pozitif olduğunu göstermektedir (Şekil 4.6).

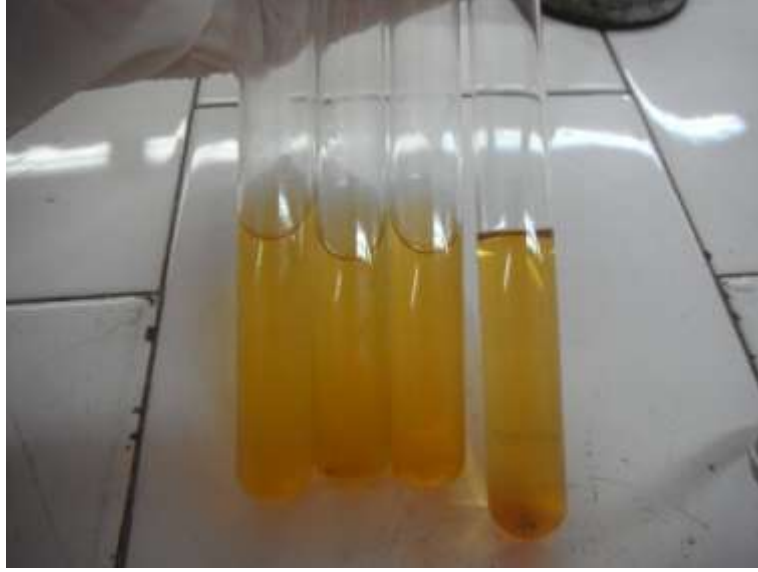


Şekil 4.6 Nitrat Testi Sonucu

Soldaki tüp nitrat negatif, sağdaki nitrat pozitif

4.5 Laktoz-Jelatin Test Sonuçları

Uygulanan laktoz jelatin testi inkübasyon sonunda tüplerde laktoz fermantasyonu sonucu gaz oluşumu ve asit oluşumu sonucunda kırmızıdan sarıya renk değişimi gözlenmiştir. Bu laktoz pozitif olarak değerlendirilmektedir. Tüplerin 5 °C'de 1 saat süreyle soğutulmasının ardından jelatinin sıvılaşp sıvılaşmadığı kontrol edilmiştir. Sıvılaşmanın olması jelatin pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 Laktoz-Jelatin Test Sonucu

En sağdaki tüp jelatin negatif, diğerleri pozitifdir.

4.6 Voges Proskauer Test Sonuçları

MR-VP Broth besiyerine aktarılmış kültürler inkübasyon sonrasında 0,6 mL α -naftol ilave edilmiştir. Ardından 0,2 mL %40'lık KOH çözeltisi ilave edilip 4 saat bekletildikten sonra kiraz kırmızısı renk oluşumu gözlenen tüpler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 Voges Proskauer Test Sonucu
Sarı renk görülen tüp Voges Proskauer negatiftir.

Gram+, hareketsiz, Nitrat pozitif, Laktoz-Jelatin pozitif ve Voges Proskauer pozitif olan *C. perfringens* için yapılan biyokimyasal testlerin sonuçları Çizelge 4.3te verilmiştir. Buna göre izole edilen 19 adet suşun *C. perfringens* özelliği gösterdiği anlaşılmıştır.

Çizelge 4.3 *C. perfringens* Doğrulama Testi Sonuçları

Gıda Örneği	Gram Boyama	Hareket Testi	Nitrat Testi	Laktoz Testi	Jelatin Testi	Voges Proskauer Testi
A	+	-	+	+	+	+
B	+	-	+	+	+	+
C	+	-	+	+	+	+
D	+	-	+	+	+	+
E	+	-	+	+	+	+
F	+	-	+	+	+	+

Çizelge 4.3 *C. perfringens* Doğrulama Testi Sonuçları (devam)

G	+	-	+	+	+	+
H	+	-	+	+	+	+
I	+	-	+	+	+	+
J	+	-	+	+	+	+
K	+	-	+	+	+	+
X	+	-	+	+	+	+
X	+	-	+	+	+	+
Y	+	-	+	+	+	+
Y	+	-	+	+	+	+
X1	+	-	+	+	+	+
x1	+	-	+	+	+	+
Y1	+	-	+	+	+	+
y1	+	-	+	+	+	+

Analizler sonucunda bakteri bulunan gıdalardan döner, köfte, etli bezelye yemeği, etli fasülye yemeği, et içerikli ev tipi yemekler, mantı tebliğde yapılan değişiklik sonucunda, *C. perfringens* aranma zorunluluğu olan gıdalar içerisinde çıkarılmıştır (Çizelge 5.1). Ek olarak, fermente sucukta da *C. perfringens* sayımı yapılması zorunluluğu bulunmamaktadır.

2011 ve 2010 yılında ABD’de, 2009 yılı Diyarbakır’da meydana gelen, Crouch ve Golden’nın (2005) araştırmalarındaki gıda zehirlenmelerine neden olan gıdalar soslu tavuk, et, kanatlı etleri, etli kuru fasülye gibi gıdalardır. Zehirlenmeye neden olan bu gıdalar, çalışmamızda bakteri varlığını tespit ettiğimiz gıdalarla benzerlikler göstermektedir. Çalışmamızdaki çiğ mantı, kıymanın bakteri tarafından kontamine olması sonucunda bakteri varlığının tespit edildiği gıdadır. Yılmaz vd. (2003), Gönülalan ve Köse (2002) tarafından çiğ kıymalarda yapılan analizlerde *C. perfringens* varlığının tespiti de bu duruma destek niteliktedir.

Çiğ gıda örneklerinde bulunmasının yanı sıra, *C. perfringens*'in ısıtılmış işlem görmüş gıdalarda da bulunduğu çalışma sonucumuzda görülmektedir. Bu açıdan, Kaya ve Küpeli Gençler (2002), Yılmaz vd. (2003), Sert vd. (2012) ve Çon vd. (2002)'nin yaptıkları çalışmalarda bakteri varlığının tespitinin gerçekleştiği ısıtılmış işlem görmüş gıdalar, çalışmamızla benzer sonuçları desteklemektedir. Ayrıca 2000 yılında İngiltere'de yapılan bir çalışmada, 2579 adet gıda üretim yerinden alınan 3494 adet tüketime hazır, soğuk tüketilen dilimlenmiş et ürünlerinin (Jambon, biftek, hindi, tavuk gibi) 3373 adedinde 10-20 kob/g arasında, 91 adedinde 10² kob/g'dan az, 7 tanesinde 10²-10³ kob/g arasında, 4 adedinde 10³-10⁴ kob/g arasında, 1'inde 10⁴-10⁵ kob/g arasında *C. perfringens* tespit edilmiştir (Gillespie vd. 200). Bu sonuçlarla, ısıtılmış işlem görmüş gıdalarda da en az çiğ ürünlerde olduğu kadar *C. perfringens*'e rastlanıldığı ve neden olduğu hastalık, zehirlenme açısından çiğ ürünler kadar halk sağlığını tehdit edici potansiyele sahip olduğu görülmüştür.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışmasında, Ankara (40 adet) ve Aksaray (28 adet) piyasasından alınan tüketime hazır gıdalar *C. perfringens* varlığı ve sayısı bakımından incelenmiş olup, Ankara' dan satın alınan örneklerin 14 (%35), Aksaray'dan satın alınan örneklerin 5 (%17,9) adedinde *C. perfringens* saptanmıştır. 19 adet örneğin %21,1' inde 10^3 - 10^4 kob/g arasında, %42,1'inde 10^2 kob/g'dan fazla, %31,5'inde ise 10^1 - 10^2 kob/g arasında bakteri varlığı saptanmıştır. İzole edilen 19 adet izolata, Gram boyama, hareket, nitrat, laktoz-jelatin, Voges Proskauer doğrulama testleri yapılmıştır.

Ankara piyasasında akşam ve sabah saatlerinde alınan 12 adet örnek, bakterinin gün içerisinde meydana gelen ısıtma-soğutma gibi işlemler sonucunda geliştiği ve genel olarak et içeren gıdalarda bulunduğu belirtilmesi sonucunda, bu sebeplerin doğruluğunu tespit etmek amacıyla yapılmıştır.

Tez çalışmasında elde edilen sonuçlara göre; Ankara ve Aksaray'dan alınan gıdalarda, *Clostridium perfringens* varlığının tespit edilmesi, büyük bir olasılıkla gün içerisinde birçok kez ısıtma işlemine tabi tutulmuş olabileceğini düşündürmektedir. İşeri ve Erol (2009) tarafından yapılan araştırma sonuçlarında da yemek fabrikaları ya da toplu yemek yapılan yerlerde gıdaların servis edilmeden bir gün önce pişirilip hazırlanma ve ertesi gün ısıtılarak servis edilmesinin enfeksiyonun oluşumunda önemli rol oynadığını ifade edilmektedir. Ayrıca etli yemeklerin, parça etlerin pişirilmesi sırasında *C. perfringens* sporları canlı kalmaktadır. *C. perfringens*, tüketime hazır pişirilmiş gıdaların oda sıcaklığında bekletilmesi veya yeterli sıcaklığa kadar soğutulmaması durumunda birkaç saat içerisinde 10^6 kob/g gibi oldukça yüksek sayılara ulaşabilmektedir (Kaya ve Küpeli Gençer 2004).

Çalışmamızda Ankara'dan iki farklı işletmeden temin edilen tavuk döner, etli sulu yemek ve etsiz sulu yemek örnekleri *C. perfringens* varlığı açısından incelendiğinde;

- ✓ Gün boyunca sürekli ısıtmaya maruz kalan, iç noktasındaki sıcaklığın zamanla değiştiği tavuk dönerin günün ilk saatlerinde ve akşam saatlerinde alınan örneklerinde sabah saatlerinden akşam saatlerine kadar geçen süre içerisinde meydana gelen artış, sürekli olarak ısıtma, yetersiz ısıtmaya ya da hijyen koşullarına dikkat edilmediğinin göstergesi olarak gösterilebilir (Çizelge 4.1).
- ✓ Etli yemekten sabah ve akşam saatlerinde alınan örneklerdeki bakteri sayısındaki artış hem gün içerisindeki ısıtma hem de hızlı yapılmayan soğutma sonucunda meydana geldiği söylenebilir.
- ✓ Etsiz yemekten alınan örneklerde ise bakterinin bulunamamasının tesadüf olma ihtimali varken, *Clostridium perfringens'* in et içerikli gıdalarda geliştiğinin de kanıtı olarak düşünülebilir.

Yapılan çalışma sonucunda toplam 68 adet gıda örneğinin 19'unda (%27,9) *C. perfringens* varlığı tespit edilmiştir. Bu gıdalardan, Etli Bezelye Yemeği(C), Etli Fasulye Yemeği(E), et içerikli ev tipi yemeklerde(G) kriterde belirtilmiş olan değerler (10^2 - 10^3 kob/g) arasında bakteri gözlenmiştir. Bu gıdalar *C. perfringens* zehirlenmesi açısından yüksek risk taşıyan gıdalardır (Çizelge 4.2).

C. perfringens' in, hijyeninin yetersiz olması durumunda, insan ve hayvan bağırsak florası da dahil olmak üzere doğal çevrede yaygın olarak spor formlarının olması, ürünleri kolaylıkla kontamine ederek gıda kaynaklı hastalık riskini artırmaktadır. Çalışmamızda *C. perfringens* varlığı tespit edilen sucuk, ısıl işlem görmemiş mantı (çiğ) ve köfte gibi gıdalar tebliğde aranması zorunlu olmayan gıdalardır (Çizelge 4.2). Bu nedenle bu gıdalarda *C. perfringens* aranması bakımından tebliğde bazı değişiklikler yapılması gerekmektedir.

Üretimden tüketime kadar her aşamada kontaminasyonların ve mikrobiyolojik bozulmaların engellenmesi hedeflenerek uygun koşullarda hazırlanma, pişirme,

depolama ve tüketime sağlanması için HACCP programının firmalar tarafından uygulanması, personel eğitimi patojenin kontrol altına alınması konusunda yararlı olacaktır. Hijyen kurallarına üretimden tüketime kadar olan süreç boyunca dikkat edilmesi, hazır olarak satışa sunulan gıdaların mümkün olduğunca kısa süre muhafaza edilerek yeterli ısı işlemin ardından tüketilmesi sağlanmalıdır. Yetersiz uygulamalar sonucu meydana gelebilecek sağlığı tehdit edici durumlar tespit edildiğinde, işletmelere kanun yoluyla yapılacak olan yaptırımların artırılması ve denetimlerin de daha sık yapılması önerilebilir.

KAYNAKLAR

- Adak, G.K., Long, S.M. and O'Brien, S.J. 2002. Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. *Intestinal Infection*, 51; 832– 841.
- Altınparmak, S. ve Baştaş, K.K. 2011. Konya İlinde Yaygın Olarak Yetiştirilen Asma Çeşitlerinde Bakteriyel Taç Uru (*Agrobacterium vitis*) 'nun Tanılanması Üzerine Araştırmalar. *Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 25(1);115-124.
- Anonim. 2010. Web Sitesi:www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2010/01/20100108_10.htm, Erişim Tarihi: 10.03.2014.
- Anonim. 2011. Web Sitesi:www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3_6.htm, Erişim Tarihi: 10.03.2014.
- Anonymus. 2012. Web Sitesi: www.foodsafetynews.com/tag/clostridium-perfringens, Erişim Tarihi: 09.03.2014.
- Ayhan, K. 2013. *Tarladan Sofraya Gıda Güvenliği*. 8.Bölüm, sayfa 251-277. Her yönüyle Gıda. Editörler: Fügen Durlu Özkaya, Serap Coşansu ve Kamuran Ayhan, 400 sayfa. SİDAS Medya Ltd.Şti., İzmir.
- Bokori-Brown, M., Halla, C.A., Vancea, C., Fernandes da Costaa, S.P., Savvab, C.G., Naylorb, C.E., Coleb, A.R., Basakb, A.K., Mossb, D.S. and Titballa, R.W. 2014. *Clostridium perfringens* epsilon toxin mutant Y30A-Y196A as arecombinant vaccine candidate against enterotoxemia. *Vaccine*, Pg;6.

- Brynstad, S. and Granum, P.E. 2002. *Clostridium perfringens* and foodborne infections. International Journal of Food Microbiology, 74(3); 195-202.
- Cho, J.H., Kim, H.J. and Kim, I.H. 2014. Effects of phytogetic feed additive on growth performance, digestibility ,bloodmetabolites,intestinalmicrobiota,meat color and relative organ weight after ora lchalleng with *Clostridium perfringens* in broilers. Live stock Science, 160(2014); 82–88.
- Cohen, N., Filliol, I., Karraouan, B., Badri, S., Carle, I., Ennaji, H., Bouchrif, B., Hassar, M. and Karib, H. 2008. Microbial quality control of raw ground beef and fresh sausage in Casablanca. Journal of Environmental Health, 71(4); 51-55.
- Coursodon, C.F., Trinh, H.T., Mallozzi, M., Vedantam, G., Glock, R.D. and Songer, J.G. 2010. *Clostridium perfringens* alpha toxin is produced in the intestines of broiler chicks inoculated with an alpha toxin mutant. Anaerobe, 16(2010); 614-617.
- Crouch, E. and Golden, N.J. 2005. A Risk Assessment for *Clostridium perfringens* in Ready-to-Eat and Partially Cooked Meat and Poultry Products. Draft for Public Review, 304 p., Cambridge.
- Çon, A.H., Doğu, M. ve Gökalp, H.Y. 2002. Afyonda Büyük Kapasiteli Et İşletmelerinde Üretilen Sucuk Örneklerinin Bazı Mikrobiyolojik Özelliklerinin Periyodik Olarak Belirlenmesi. Doğa Veteriner ve Hayvancılık Dergisi, 26; 11-16.
- Dalton, C.B., Gregory, J., Kirk, M.D., Stafford, R.J., Givney, R., Kraa, E. and Gould, D. 2004. Foodborne disease outbreaks in Australia, 1995 to 2000. Commun Dis Intell Q Rep. 28(2):211-24.

- Damme, J.V., Jung, M., Hofmann, F., Just, I., Vandekerckhove, J. and Aktories, K. 1996. Analysis of the catalytic site of the actin ADP-ribosylating *Clostridium perfringens* iota toxin. *Febs Letters*, 380(3); 291-295.
- Diane, G.N., Koopmansb, M., Verhoefb, L., Duizerb, E., Aidara-Kanec, A., Sprongb, H. and Opsteghb, M. 2010. Food-borne diseases - The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*. 139(1); 3-15.
- Dorman, V., Aslan, S., Ceylan, A., Küçük, S.N., Günel, A., Sarı, H., Yaşlı, N. ve Yalım, D. 2010. Aynı fabrikadan yemek alan iki inşaat firması işçilerinde meydana gelen toplu besin zehirlenmesi. *Dicle Tıp Dergisi*, 37(3), 248-253.
- Erol, İ. 2007. Hindi Etlerinde *Salmonella* Spp., *Listeria Monocytogenes* ve *Clostridium perfringens'* in Saptanması ve Karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu Proje No: 0810072; Ankara.
- Feligini, M., Brambati, E., Panelli, S., Ghitti, M., Sacchi, R., Capelli, E. and Bonacina, C. 2014. One-year investigation of *Clostridium* spp. occurrence in raw milk and curd of Grana Padano cheese by the automated ribosomal intergenic spacer analysis. *Food Control*, 42; 71-77.
- Garde, S., Gomez-Torres, N., Hernandez, M. and Avila, M. 2014. Susceptibility of *Clostridium perfringens* to antimicrobials produced by lactic acid bacteria: Reuterin and nisin. *Food Control*, 44; 22-25.

- Gillespie, I., Little, C. and Mitchell, R. 2000. Microbiological examination of cold ready to eat sliced meats from catering establishments in the United Kingdom. J.Appl. Microbiol, 88(3); 467-474.
- Gkiourtzidis, K., Frey, J., Bourtzi-Hatzopoulou, E., Iliadis, N. and Sarris K. 2001. PCR Detection and Prevalence of α -, β -, β 2-, ϵ -, ι - and Enterotoxin Genes in *Clostridium perfringens* Isolated from Lambs with Clostridial Dysentery. Veterinary Microbiology, 82; 39-43.
- Gökmen, M. ve Alişarlı, M. 2003. Van ilinde Tüketime Sunulan Kıymaların Bazı Patojen Bakteriler Yönünden İncelenmesi. YüzüncüYıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 14(1);7-34.
- Gönülalan, Z. ve Köse, A. 2002. Kayseri ilinde satışa sunulan sığır kıymalarının mikrobiyolojik kalitesi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 17(1); 49 – 53.
- Grass, J.E., Gould, L.H. and Mahon, B.E. 2013. Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by *Clostridium perfringens*, United States, 1998-2010. Foodborne Pathog Dis. Feb, 10(2);131-6.
- Greco, G., Madio, A., Buonavoglia, D., Totaro, M., Corrente, M., Martella, V. and Buonavoglia, C. 2005. *Clostridium perfringens* toxin-types in lambs and kids affected with gastroenteric pathologies in Italy. The Veterinary Journal, 170(2005); 346–350.
- Halkman, A.K. 2005. Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları, MERCK, Başak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd. Şti., Ankara, 358 s.

- Huang, L. 2003. Estimation of growth of *Clostridium perfringens* in cooked beef under fluctuating temperature conditions. *Food Microbiology*, 20; 549–559.
- İşeri, Ö. ve Erol, G. 2009. Hindi etinden kaynaklanan başlıca bakteriyel infeksiyon intoksikasyonlar. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 56; 47– 54.
- Jaloustre, S., Guillier; L., Poumeyrol, G., Morelli, E., Delignette-Muller, M.L. 2013. Efficiency of a reheating step to inactivate *Clostridium perfringens* vegetative cells: How to easure it?. *Food Control*, 29(2); 422-428.
- Jay, J.M. 2000. Food poisoning caused by Gram-positive sporeforming bacteria in: *Modern Food Microbiology*. USA: AVI Book. 461-485.
- Jiang, Y., Konga, Q., Rolanda, K.L. and Curtiss III, R. 2014. Membrane vesicles of *Clostridium perfringens* type A strains induce innate and adaptive immunity. *International Journal of Medical Microbiology*, 13 p.
- Juneja, V., Labbe, R.G., and Novak, J. 2009. Chapter 5. *Clostridium perfringens*. *Pathogens and toxins in foods*. Ed. V. Juneja and J. Sofos. Washington D.C.: ASM Press.
- Juneja, V., Labbe, R.G and Blaschek, H. 2011. *Clostridium perfringens*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, Second Edition; 463-467.
- Kaneko, I., Miyamoto, K., Mimura, K., Yumine, N., Utsunomiya, H., Akimoto, S. and McClane, B.A. 2011. Detection of Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in Meat Samples by Using Molecular Methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(21); 7526–7532.

- Kobayashi, K., Nagahama, M., Ohkubo, N., Kojima, T., Shirai, H., Iwamoto, S., Oda, M. and Sakurai, J. 2007. Role of Ca²⁺-binding motif in cytotoxicity induced by *Clostridium perfringens* iota-toxin. *Microbial Pathogenesis*, 44; 265–270.
- Kobayashi, K., Nagahama, M., Ohkubo, N., Kojima, T., Shirai, H., Iwamoto, S., Oda, M. and Sakurai, J. 2008. Role of Ca²⁺-binding motif in cytotoxicity induced by *Clostridium perfringens* iota-toxin. *Microbial Pathogenesis*, 44(4); 265-270.
- Knapp, O., Maier, E., Benz, R., Geny, B. and Popoff, M.R. 2009. Identification of the channel-forming domain of *Clostridium perfringens* Epsilon-toxin (ETX). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788; 2584–2593.
- Kuleaşan, H. 2000. Bölüm 15. *Clostridium perfringens* (367-370). Gıda mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Genişletilmiş 2. baskı. Ankara Üniversitesi Gıda Müh. Bölümü Yayını, Sim Matbaacılık Ltd. Şti., 522 s. Ankara.
- Küpelı Gencer, V. ve Kaya, M. 2004. Yaprak Dönerın Mikrobiyolojik Kalitesi ve Kimyasal Bileşimi. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28; 1097-1103.
- Li L, Valenzuela-Martinez C, Redondo M., Juneja V.K, Burson D.E. and Thippareddi H.J. 2012. Inhibition of *Clostridium perfringens* spore germination and outgrowth by lemon juice and vinegar product in reduced NaCl roast beef. *Food Sci.* Nov, 77(11); 598-603.
- Lindström, M., Heikinheimo, A., Lahti, P. and Korkeala, H., 2011. Novel insights into the epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning. *Food Microbiology*, 28(2); 192-198.

- Lo, D. 2013. Review of Food Poisoning Outbreaks Related to Food Premises and Food Business in 2012. Food Safety Focus, 80th Issue.
- Matsuda, T., Okada, Y., Inagi, E., Tanabe, Y., Shimizu, Y., Nagashima, K., Sakurai, J., Nagahama, M., and Tanaka, S. 2007. Enteritis necroticans 'pigbel' in a Japanese diabetic adult. *Pathology International*, 57;:622–626.
- McClane, B.A. 1997. *Clostridium perfringens*. Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, ASM Press, Washington, DC). pp. 305-326.
- McClane B.A and Wen, Q. 2004. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* Type A isolates in American retail foods. Applied and Environmental Microbiology, 7(5);2685-2991.
- Mcclane, B.A. 2014. *Clostridium perfringens*. Encyclopedia of Toxicology. Third Edition; 987–988.
- Merril, G.A., Rivera, V.R., Neal, D.D., Young, C. and Poli, M.A. 2006. A quantitative electrochemiluminescence assay for *Clostridium perfringens* alpha toxin. Analytical Biochemistry. 357; 181 -187.
- Miki, Y., Miyamoto, K., Kaneko-Hirano, I., Fujiuchi, K. and Akimoto. S. 2008. Prevalence and Characterization of Enterotoxin Gene-Carrying *Clostridium perfringens* Isolates from Retail Meat Products in Japan. Applied and Environmental Microbiology, 74(17); 5366–5372.
- Nagahama, M., Umezaki, M., Tashiro, R., Oda, M., Kobayashi, K., Shibutani, M., Takagishi, T., Ishidoh, K., Fukuda, M. and Sakuraia, J. 2012. Intracellular

Trafficking of *Clostridium perfringens* Iota-Toxin b. Infection and Immunity, 80(10); 3410.

Nakamura, H., Ogasawara, J., Monma, C., Hase, A., Suzuki, H., Kaib, A., Harukia, K. and Nishikawa, Y. 2003. Usefulness of a combination of pulsed-field gel electrophoresis and enrichment culture in laboratory investigation of a foodborne outbreak due to *Clostridium perfringens*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 47; 471–475.

Nakamura, M., Kato, A., Tanaka, D., Gyobu, Y., Higashi, S., Karasawa, T. and Yamagishi, T. 2004. PCR identification of the plasmid-borne enterotoxin gene (cpe) in *Clostridium perfringens* strains isolated from food poisoning outbreaks. International Journal of Medical Microbiology, 294(2004); 261-265.

Öğüt, S. ve Polat, M. 2009. Bazı Beş Yıldızlı Otellerde Hazırlanan Gıdaları Mikrobiyolojik Açıdan Değerlendirilmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Yaşam Dergisi, 1(2); 12-16 s.

Piontkowski, M.D. 2001. *Clostridium Perfringens* in Domestic Farm Animals. Colorado Serum Company, 1(2).

Popoff, M.R. 2014. Detection of Enterotoxin of *Clostridium perfringens*. Encyclopedia of Toxicology. Second Edition; 474-480.

Poumeyrol, G., Morelli, E., Rosset, P. and Noel, V. 2014. Probabilistic evaluation of *Clostridium perfringens* potential growth in order to validate a cooling process of cooked dishes in catering. Food Microbiology, 31(1); 293-299.

Rao PN, S. 2009. Web Sitesi: www.microrao.com, Erişim Tarihi: 10.03.2014.

- Rioseco, M.M., Beingesser, J. and Uzal, F.A. 2012. Freezing or adding trypsin inhibitor to equine intestinal contents extends the lifespan of *Clostridium perfringens* beta toxin for diagnostic purposes. *Anaerobe*, 18(2012); 357-360.
- Roberts, D. and Hobbs, C.B. 2007. Food poisoning and food hygiene. 7th. Edward Arnold London. 4;59 - 92.
- Sakurai, J., Nagahama, M. and Oda, M. 2004. *Clostridium perfringens* Alpha-Toxin: Characterization and Mode of Action. *J. Biochem.* 136;569-574.
- Sarıgüzel, D. 2005. Hindi Kıymalarında *Clostridium perfringens*' in Varlığı ve izolatların CPE Geni Yönünden PCR ile İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Savva, C.G., Fernandes da Costa, S.P., Bokori-Brown, M., Naylor, C.E., Cole, A.R., Moss, D.S., Titball, R.W. and Basak, A.K. 2013. Molecular Architecture and Functional Analysis of NetB, a Pore-forming Toxin from *Clostridium perfringens*. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(5); 3512-3522.
- Sert, M., Güler, F., Gümüş, M. ve Öztürk, S. 2012. Piyasada Satışla Sunulan Bazı Gıdalarda *Clostridium perfringens* Varlığının Araştırılması. Bitirme tezi. Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Ankara.
- Temiz, A. 2000. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. 3. Baskı. Hatipoğlu Yayınları, Ankara. 291 s.

- Tunail, N. 2000. Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Genişletilmiş 2. Baskı; Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını. Sim Matbaası, Ankara 522(3), 5.kısım.
- Tunail, N. 2009. Temel Mikrobiyoloji Bölüm 9 Taksonomi ve Prokaryotların Sınıflandırılması (198-199), Bölüm 13. Enerjinin Fermantasyon İle Kazanılması (328- 329) . Pelin Ofset, Ankara, 448 sayfa. ISBN: 978-605-603-62-0-0.
- Udompijtkul, P., Alnoman, M. and Sarker, M.R. 2013. Inactivation strategy for *Clostridium perfringens* spores adhered to food contact surfaces. Food Microbiology, 34(2);328-336.
- Uzal, F.A and Songer, J.G. 2008. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. J Vet Diagn Invest, 20; 253–265.
- Wahl, E., Romma., S. and Granum, P.E. 2013. A *Clostridium perfringens* Outbreak Traced to Temperature-Abused Beef Stew, Norway. 2012. Eurosurveillance, 18(9).
- Yılmaz, İ., Kayışoğlu, S., Demirci, M. ve Yetim, H. 2003. Chemical composition and microbiological quality of the doner kebabs sold in Tekirdag market. Food Control, 14(7); 469-474.
- Zhao, Y., Kanga, L., Gaoa, S., Zhaua, Y., Sub, L., Xina, W., Sua Y. and Wanga, J. 2011. Expression and purification of functional *Clostridium perfringens* alpha and epsilon toxins in *Escherichia coli*. China, 77; 207-213.

EK ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ

1.1 Metil Red – Voges Proskauer Broth (Merck, Germany)

Ticari olarak bulunan besiyerinden 17 g alınarak 1 litre destile su içerisinde çözülmüş, tüplere 5 mL olacak şekilde dağıtılmış ve daha sonra 121 °C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edilmiştir (pH 6,9 ± 0,2).

1.2 Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC) Agar (Merck, Germany)

Dehidre besiyeri 39 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilmiş ve manyetik balık ile birlikte otoklavda 121°C’ da 15 dakika sterilize edilmiştir. *C. perfringens* sayımı için bazal besiyeri 50 °C’ a soğutulduktan sonra TSC Agar katkısı ilave edilerek manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve steril petri kutularına 12,5-15'er mL olacak şekilde dökülmüştür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve açık kahverengi renklidir, 25°C’da pH’sı 7,6 ± 0,2’dir.

1.3 TSC Agar Katkısı (Merck, Germany)

TSC Agar katkısı, *Clostridium perfringens* katkısı ya da MUP olarak da bilinir. Şişeye 3 mL steril damıtık su ilave edilmiş ve otoklavda sterilize edilip 50 °C’ a soğutulduktan sonra 500 mL TSC Agar besiyerine ilave edilmiştir. Bileşimi 200 mg D-Cycloserine; 50 mg 4- methylumbelliferyl-phosphate disodium tuzu olduğu için, bu katkı kullanıldığında ayrıca D- Cycloserine kullanılmasına gerek yoktur.

1.4 Hareket- Nitrat Besiyeri

Bileşiminden hazırlanan besiyeri, 5 g Pepton, 3 g Beef Extract, 5 g Galaktoz, 5g Gliserol, 1 g Potasyum Nitrat, 2,5 g Na₂HPO₄ ve 5-8 g Agar 1000 mL destile su

içersinde çözümlenerek 121°C' da 15 dakika otoklavda sterilize edilir. Hazırlanan besiyeri 4°C' de depolanabilir. Kullanılmadan önce 15 dakika süreyle kaynar su içerisine ya da su buharına tutularak ısıtılıp daha sonra inkübasyon sıcaklığına soğutulur.

1.5 Laktoz- Jelatin Medium Besiyeri

Bileşiminden hazırlanan besiyerinde, 15,5 g Triptose, 10 g Yeast Extract, 10 g Lactose, 120 g Jelatin ve 0,05 g Phenol Red bileşimlerinden oluşur. Lactose ve Phenol Red dışındakiler suda çözümlenir. pH sterilizasyon sonrasında 7,5 olacak şekilde ayarlanır. . Lactose ve Phenol Red besiyerine ilave edilerek 121° C' da 15 dakika otoklavda sterilize edilir. Kullanılmadan önce 15 dakika süreyle kaynar su içerisine ya da su buharına tutularak ısıtılıp daha sonra inkübasyon sıcaklığına soğutulur.

1.6 Pepton from Meat (Merck, Germany)

Besiyeri, %0,1 konsantrasyonda olacak şekilde damıtık su içinde eritilir ve amaca uygun olarak tüplere ve/veya erlenlere dağıtılıp, otoklavda 121° C'da 15 dakika sterilize edilir.

1.7 CASO (Tryptic Soy) Broth (Merck, Germany)

Dehidre besiyeri, 30,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde gerekirse ısıtılarak eritilip, amaca uygun kaplara (tüp, erlen vb.) dağıtılır ve otoklavda 121° C'da 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak sarımsı renkte olup, 25° C'da pH'sı 7,3±0,2'dir.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Merve SERT

Doğum Yeri : AMASYA

Doğum Tarihi : 13/09/1989

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Nermin Mehmet Çekiç Anadolu Lisesi (2007)

Lisans : Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü
(2012)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği
Anabilim dalı (Eylül 2012- Haziran 2014)

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl

Aksaray Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Araştırma
Görevlisi, 2013-..