163929

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# HİNDİ KIYMALARINDA *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*' İN VARLIĞI VE İZOLATLARIN *CPE* GENİ YÖNÜNDEN PCR İLE İNCELENMESİ

Devrim SARIGÜZEL

BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. İrfan EROL

2005 - ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Besin Hijyeni ve Teknolojisi Yüksek Lisans Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 11.07.2005

Prof. Dr. İrfan EROL
Ankara Üniversitesi Veteriner Fak.
Jüri Başkanı

Prof. Dr. T. Haluk ÇELİK
Ankara Üniv.Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Hakan YARDIMCI
Ankara Üniv.Veteriner Fakültesi

Doç. Dr. Haydar ÖZDEMİR
Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi

Doç. Dr. U. Tansel ŞİRELİ
Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi

# İÇİNDEKİLER


| | |
|---|---|
| **Kabul ve Onay** | ii |
| **İçindekiler** | iii |
| **Önsöz** | v |
| Simgeler ve Kısaltmalar | vii |
| Şekiller | viii |
| Çizelgeler | ix |
| Resimler | x |
| Grafikler | xi |
| **1. GİRİŞ** | 1 |
| 1.1. Tarihçe | 3 |
| 1.2. *C. perfringens*'in Klasifikasyonu ve Genel Özellikleri | 5 |
| 1.3. *C. perfringens*'in Virülens Faktörleri | 8 |
| 1.3.1. *C. perfringens*' in Toksin Tipleri | 8 |
| 1.3.2. Enterotoksinin Biyokimyasal Özellikleri ve Etki Şekli | 12 |
| 1.4. *C. perfringens* Enterotoksin Geni (*cpe*) | 17 |
| 1.5. *C. perfringens* Kaynaklı Gıda İnfeksiyonları | 19 |
| 1.5.1. A Tipi *C. perfringens* Gıda İnfeksiyonları | 19 |
| 1.5.2. C Tipi *C. perfringens* Gıda İnfeksiyonları | 22 |
| 1.5.3. *C. perfringens* ile Kontamine Hindi Etinden Kaynaklanan Gıda İnfeksiyonları | 25 |
| 1.6. *C. perfringens'* in Antibiyotik Dirençliliği | 26 |
| 1.7. *C. perfringens'* in Gıdalarda Varlığı | 29 |
| 1.7.1. Kırmızı Et ve Ürünlerinde *C. perfringens*'in Varlığı | 29 |
| 1.7.2. Kanatlı Eti ve Ürünlerinde *C. perfringens*'in Varlığı | 30 |
| 1.7.3. Diğer Gıdalarda *C. perfringens*'in Varlığı | 31 |
| 1.8. *C. perfringens*'in Gıdalardan Saptanması ve Tiplendirilmesi | 32 |
| 1.9. Korunma ve Kontrol | 34 |

**2. GEREÇ ve YÖNTEM** 36

2.1. Gereç 36

2.1.1. *C. perfringens*'in İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besi Yerleri ve Ayıraçlar 36

2.1.2. *C. perfringens* Enterotoksin Geni (*cpe*) Tespitinde Kullanılan PCR malzemeleri 39

2.2. Yöntem 42

2.2.1. Zenginleştirme 42

2.2.2. Katı Besi Yerine Ekim 43

2.2.3. *C. perfringens*'in İdentifikasyonu 45

2.2.3.1. Gram Boyama ve Mikroskobik Bakı 45

2.2.3.2. Katalaz Testi 45

2.2.3.3. Nitrat Motilite Testi 46

2.2.3.4. Laktoz Jelatin Testi 47

2.2.3.5. Reverse-CAMP Testi 48

2.2.3.6. Asit Fosfataz Testi 49

2.2.4. PCR ile *cpe* Tespiti 50

**3. BULGULAR** 51

**4. TARTIŞMA** 53

**5. SONUÇ VE ÖNERİLER** 56

**ÖZET** 57

**SUMMARY** 58

**KAYNAKLAR** 59

**ÖZGEÇMİŞ** 69

# ÖNSÖZ

Hindi eti, içerdiği yüksek düzeyde protein ve esansiyel aminoasitler, düşük kolesterol ve kalori düzeyi ile sağlıklı bir ürün olduğunun anlaşılması ile beraber tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de sadece yılbaşı mönülerinde değil sıklıkla sofralarımızda bulundurduğumuz bir gıda maddesi olmuştur.

Bununla birlikte, kanatlı hayvanlarda insanlar için patojen olan etkenlerin yaygın olarak bulunması ve kanatlı hayvan etlerinin çiftlikten sofraya kadar olan aşamalarda gerekli hijyen önlemlerinin alınmaması sonucu insanlarda hindi eti tüketimine bağlı önemli infeksiyon ve intoksikasyonlar görülebilmektedir.

Kıyma; bir taraftan sahip olduğu üstün besleyici değeri ve kolaylıkla sofraya sunulabilmesi ile tercih edilmesinin yanı sıra, uygulanan teknolojik işleme bağlı olarak parçalanması ve yüzeyinin genişlemesi sonucu , saprofitik ve patojen mikroorganizmaların gelişimi için ideal bir ortam oluşturması nedeniyle risk grubu hayvansal gıdalar içerisinde yer almaktadır.

Hindi eti ve ürünlerinde varlığı tespit edilen değişik *Salmonella* serotiplerinden kaynaklanan infeksiyonlar ve *Staphylococcus aureus*'tan kaynaklanan intoksikasyonlardan sonra *Clostridium perfringens* dünyada önemli halk sağlığı sorunlarına neden olmaktadır. Özellikle *Clostridium perfringens* ile kontamine hindi etlerinden hazırlanan yemekler, uygun olmayan koşullarda uzun süre muhafaza edilmesi, tekrarlanan ısı işlemi uygulamalarının yetersiz olması ve hızlı olarak tüketilmemesine bağlı olarak gıda infeksiyonu riski taşımaktadır.

Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda *Clostridium perfringens*'ten ileri gelen gıda infeksiyonlarında etkenin asıl virulens faktörünün enterotoksini (CPE) regüle eden *cpe* geni olduğu tespit edilmiştir. Değişik ülkelerde *Clostridium perfringens*'in hindi eti ve ürünlerinde varlığı ile *cpe* geninin saptanmasına yönelik çalışmalar bulunmasına karşın, literatür taramalarında Türkiye'de bu konuda yapılmış bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bu nedenle bu çalışmada, uygun olmayan kesim, muhafaza ve taşıma koşulları ile yetersiz personel hijyeni ve çapraz kontaminasyon gibi nedenlerle kontamine olmuş hindi kıymalarında, *Clostridium perfringens*'in varlığı araştırılarak, saptanan izolatların *cpe* geni yönünden incelenmesi amaçlanmıştır.

Başta tez çalışmamın seçilmesi ve yürütülmesinde ilgi ve yardımlarını her zaman üzerimde hissettiğim sayın danışmanım Prof.Dr. İrfan EROL'a, değerli bilgilerini üniversite ve uzmanlık eğitimim sırasında benden esirgemeyen Anabilim Dalındaki değerli hocalarıma, tez çalışmamda kullandığım malzemelerin alınmasında yardımlarını esirgemeyen Kara Harp Okulu Savunma Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü, Kara Kuvvetleri Sağlık Daire Veteriner Şb.Müdürlüğü, 800'ncü Sıhhiye Veteriner Ana Depo ve Fabrika Komutanlığı Veteriner Mal Saymanlığına, malzeme konusunda yardımlarını eksik etmeyen sayın komutanlarım Vet.Hekim Albay Mahmut

TUNÇBİLEK ve Vet. Hekim Bnb. Serdar ÇAKIROĞLU'na, tez çalışmamda bana bilgi dağarcığını açan ve ışığında ilerlediğim değerli komutanım Vet. Hekim Kd.Yzb.Ömer ÇAKMAK'a, numune alırken yardımlarını esirgemeyen Vet.Hekim Özlem İŞERİ ve Vet.Hekim Yzb.Halit SOYKAN'a , tez çalışmamın her aşamasında bana yardımcı olan Vet. Hekim Ahmet KOLUMAN ve Sema BAL'a, PCR çalışmasında yardımlarını esirgemeyen Uzm.Dr. Vet. Hekim F.Seda BİLİR ORMANCI'ya, uzmanlık eğitimi almamda bana gönülden destek olan değerli komutanlarım Vet.Hekim Yzb. Ferit FİDAN, Per. Yzb. Engin COŞKUN, Tnk. Bnb. Olcay ve Top.Bnb. Serdar ALTINOK'a, TSK.'da beni yetiştiren çok değerli Komutanlarıma, bu günlere gelmemde hayatlarını ortaya koyan çok değerli aileme ve uzmanlık eğitimim boyunca ilgisini hep yüreğimde hissettiğim sevgili eşim Dr. Fatma MUTLU SARIGÜZEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

## SİMGELER ve KISALTMALAR

| | |
|---|---|
| α | Alfa |
| $a_w$ | Su aktivitesi |
| β | Beta |
| °C | Celcius (Santigrad derece) |
| CPE | *Clostridium perfrigens* Enterotoksini |
| *cpe* | *Clostridium perfrigens* Enterotoksin geni |
| ε | Epsilon |
| δ | Gamma |
| ι | İota |
| κ | Kappa |
| kDA | Kilo Dalton |
| kob | Koloni Oluşturan Birim |
| λ | Uzay sabiti |
| μ | Mikron |
| $\mu_m$ | Mikrometre |
| mg | Miligram |
| MID | Minimal İnfeksiyon Dozu |
| MIC | Minimal Inhibitory Consantration |
| MPN | Most Probable Number (En Muhtemel Sayı) |
| Nm | Nöramidaz |
| n | Number (Sayı) |
| PEM | Perfringens Enrichment Medium |
| *plc* | Phospholipase C |
| θ | Theta |
| TSC | Tryptose Sulphite Cycloserine |

# ŞEKİLLER

**Şekil 1.1.** *C. perfringens* enterotoksininin (CPE) fonksiyonel bölgeleri 13

**Şekil 1.2.** CPE'nin zamana bağlı etkisi 14

**Şekil 1.3.** *C. perfringens* gıda infeksiyonunun oluşum mekanizması 16

**Şekil 1.4.** *cpe* geninin genetik lokalizasyonu 18

**Şekil 1.5.** *C. perfringens*'den kaynakl enteritis nekrotikansın patojenitesi 24

**Şekil 2.1.** *C. perfringens*'in izolasyon ve identifikasyon şeması 44

# ÇİZELGELER

**Çizelge 1.1.** Çeşitli ülkelerde yıllık hindi eti üretim miktarları 2

**Çizelge 1.2.** *C. perfringens*'i tiplendirmek için kullanılan toksinlerin genetik lokalizasyonu 7

**Çizelge 1.3.** *C. perfringens* toksinleri 10

**Çizelge 1.4.** Değişik ülkelerde *C. perfringens*'in neden olduğu gıda infeksiyon olguları 21

**Çizelge 1.5.** CDC'nin 1990-1999 yılları arasında ABD'de bildirmiş olduğu *C. perfingens* ile kontamine hindi etinden kaynaklanan gıda infeksiyonları 26

**Çizelge 1.6.** Kanatlılardan elde edilen *C. perfringens* izolatlarının bazı ABF'lere olan dirençliliği ve kanatlı yemlerindeki dozajları 27

**Çizelge 1.7.** Çeşitli antibiyotiklerin baharatlardan izole edilen *C. perfringens*'e karşı etkisi 28

**Çizelge 2.1.** *C. perfringens*'in identifikasyonu için kullanılan testler 42

**Çizelge 3.1.** Ankara'da tüketime sunulan hindi kıymalarından izole edilen *C. perfringens*'in mevsimsel dağılımı 51

# RESİMLER

**Resim 2.1.** *C. perfringens* kolonilerinin TSC agardaki tipik görünümü 43

**Resim 2.2.** Nitrat motilite testi 46

**Resim 2.3.** Laktoz fermentasyon ve Jelatini sıvılaştırma testi 47

**Resim 2.4.** Reverse-CAMP testi 48

**Resim 2.5.** Asit fosfataz testi 49

# GRAFİKLER

**Grafik 3.1.** Ankara'da tüketime sunulan hindi kıymalarından izole edilen *C.perfringens*'in mevsimsel dağılımı. 52

**Grafik 3.2.** Ankara'da tüketime sunulan hindi kıymalarından izole edilen *C.perfringens*'in aylara göre yüzde değerleri 52

# 1. GİRİŞ

Günümüzde "çiftlikten sofraya gıda güvenliği" temel yaklaşımının yeterince uygulanmaması sonucu dünyada her yıl milyonlarca insanın sağlıklı olmayan gıdalardan kaynaklanan infeksiyon ve intoksikasyonlardan etkilendiği ve bu olgular içerisinde hayvansal gıdaların en önemli paya sahip olduğu bildirilmiştir. Hayvansal gıdalardan kaynaklanan infeksiyon ve intoksikasyonlar ile kontaminantların insan sağlığına olan olumsuz etkilerinin yanında, ülkelerin ekonomilerinde ciddi kayıplara yol açması nedeniyle tüm dünyada önemli gündem maddelerinden birini oluşturmaktadır (Erol, 2004).

Dünyada son 20 yıl içinde hayvansal gıda üretiminde kanatlı eti üretiminin payı dünya nüfusunun hızla artması, sağlıklı beslenme, yeni tüketim alışkanlıkları ve ekonomik olmasına bağlı olarak hızla artmaktadır (Bryan ve Doyle, 1995). FAO'nun 2004 yılı verilerine göre dünya tavuk eti üretimi 54.654.000 ton, hindi eti üretimi ise 5.113.000 tondur (Çizelge 1.1). Ülkemizdeki kanatlı eti üretimi de dünyadaki bu gelişmelere paralel olarak hızla artarak tavuk eti üretimi yaklaşık 650.000 ton hindi eti üretimi ise yaklaşık 10.000 tona ulaşmıştır (Anon, 2001 a; 2004).

Hindi etinin, yüksek oranda protein içermesi, esansiyel aminoasitlerin dağılımının uygun olması, kolesterol ve kalori düzeyinin düşük olması nedeniyle beslenmede sağlıklı bir hayvansal gıda olarak değerlendirilmesi sonucu tüketimi ülkemizde de son yıllarda artarak sadece yılbaşı mönüleriyle sınırlı kalmayıp yılın diğer zamanlarında da tercih edilmeye başlanmıştır(Masiero, 1993; Anon, 2001a). Diğer taraftan, sürü içerisinde zoonotik etkenlerin yaygın olarak bulunması ve kesim teknolojisinde çapraz kontaminasyon riskinin yüksek olması nedeniyle, insanlarda kanatlı eti tüketiminden kaynaklanan gıda infeksiyon ve intoksikasyonlarına sıklıkla rastlanmaktadır (Bryan ve Doyle, 1995; Erol, 2000; Erol, 2002).

Amerika Birleşik Devletleri'nde 1977-1984 yılları arasında gerçekleşen gıda infeksiyon ve intoksikasyonlardan % 10'unun kanatlı etinden kaynaklandığı ve bu olgularda hindi etinin % 56'lık bir paya sahip olduğu belirtilmiştir (Bryan, 1988).

Aynı şekilde ABD Hastalık Kontrol Merkezi (CDC) tarafından 1988-1992 yılları arasında rapor edilen olgularda % 4'lük diliminin hindi eti tüketiminden kaynaklandığı bildirilmiştir (Bean ve ark.,1996).

**Çizelge 1.1.** Çeşitli ülkelerde yıllık hindi eti üretim miktarları (Anon, 2003a,b; 2004)

| ÜLKE ADI | ÜRETİM MİKTARI (1000 TON) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **1999** | **2000** | **2001** | **2002** | **2003** | **2004** |
| ABD | 2.372 | 2.419 | 2.490 | 2.557 | 2.559 | 2.592 |
| Fransa | 682 | 738 | 746 | 695 | 634 | 625 |
| İtalya | 343 | 330 | 341 | 340 | 340 | 340 |
| Almanya | 271 | 295 | 339 | 366 | 361 | 310 |
| İngiltere | 267 | 255 | 254 | 232 | 229 | 230 |
| Brezilya | 115 | 137 | 165 | 182 | 191 | 220 |
| Polonya | 92 | 115 | 150 | 165 | 170 | 175 |
| Kanada | 139 | 152 | 149 | 147 | 145 | 147 |
| Macaristan | 73 | 78 | 84 | 88 | 90 | 93 |
| Şili | 48 | 62 | 80 | 74 | 60 | 67 |
| Portekiz | 41 | 43 | 46 | 44.6 | 45 | 45 |
| Hollanda | 43 | 43 | 45 | 48 | 40 | 40 |
| Arjantin | 34 | 34 | 34 | 34 | 35 | 35 |
| İrlanda | 39 | 34 | 34 | 34 | 34 | 34 |
| İspanya | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 |
| Meksika | 12 | 12 | 13 | 13 | 14 | 17 |
| **Türkiye** | **12** | **11.8** | **11.6** | **10.2** | **10.2** | **10.2** |
| Rusya | 8 | 7 | 7 | 9 | 12 | 12 |
| Güney Afrika | 2 | 3 | 4 | 3 | 4 | 5 |
| Tayvan | 2 | 5 | 5 | 5 | 4 | 4 |
| Dünya hindi eti ürt. | 4.883 | 5.109 | 5.306 | 5.383 | 5.241 | 5.113 |
| Dünya tavuk eti ürt. | 47.562 | 50.019 | 51.695 | 52.825 | 52.833 | 54.654 |

Hindi etinden kaynaklanan infeksiyon ve intoksikasyonlarda *Clostridium perfringens*'in sıklıkla izole edilen mikroorganizmalardan biri olduğu bildirilmiştir (Bremner ve Johnston, 1996). Bu olgularda kontamine hindi etlerinden hazırlanan yemeklerin pişirilmesini takiben yeterli ve hızlı uygulanmayan soğutma işlemi sonrası, ısıya dirençli spor formların vejetatif hale dönüşmesi ve hızla çoğalmasına bağlı olarak gıda infeksiyonunun gerçekleştiği çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (McClane, 1992; Juneja ve Thippareddi, 2004).

*C. perfringens* değişik tip toksinleri üretmesine karşın, gıda infeksiyonlarının oluşumundan asıl virulens faktörü olan *Clostridium perfringens* enterotoksini (CPE) sorumlu tutulmaktadır(McClane, 1994; Brynestad ve Granum, 2002).

Yapılan araştırmalarda CPE sentezlenmesinin *cpe* (*Clostridium perfringens* enterotoksin geni) tarafından regüle edildiği ve bu geni taşıyan suşların gıda infeksiyonlarına neden olduğu bildirilmiştir (Canard ve ark., 1992; Rood, 1998).

Türkiye'de çiğ hayvansal gıdalar arasında yer alan kıymaların hazırlanmasında sanitasyon koşullarının yeteri düzeyde olmadığı ve buna bağlı olarak *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* ve *Clostridium perfringens* ile önemli düzeylerde kontamine olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur (Erol, 1999b; Şireli ve Erol, 1999; Çakmak ve Erol 2002, Çakmak ve ark. 2004).

Yukarıda belirtilen nedenlerle bu çalışmada, uygun olmayan kesim, muhafaza ve taşıma koşulları ile yetersiz personel hijyeni ve çapraz kontaminasyona bağlı olarak kontamine olmuş hindi kıymalarında, gıda infeksiyonlarına yol açan *Clostridium perfringens*'in varlığı ve saptanan izolatların *cpe* geni yönünden incelenmesi amaçlanmıştır.

## 1.1. Tarihçe

Eski adı *Clostridium welchii* olan *C. perfringens* ilk kez 1897 yılında Amerikalı bakteriyolog Welch tarafından ciddi yara infeksiyonları ile gazlı gangrene neden olan, anaerob, Gram pozitif, spor formlu bir bakteri olarak tanımlanmıştır (Adams ve Moss, 1995; Yoo ve ark.,1997). Bu bakteri ilk kez İngiltere'de izole edildiği bir gıda infeksiyonunda *C. welchii* olarak adlandırılmasına karşın, daha sonra yapılan tiplendirme çalışmaları sonucunda *C. perfringens* olarak adlandırılmış ve Bergey's Manual sistematiğinde bu adla yerini almıştır. Perfringens terimi Latince kökenli olup "içten parçalayan" anlamındadır (Holt ve ark.,1994)

*C. perfringens* gıda infeksiyonu etkeni olarak ilk kez 1943 yılında İngiltere'de tavuk etinden hazırlanan yemeği tüketen okul çocuklarından izole edilerek tanımlanmıştır (Gross ve ark., 1989) .

ABD, Kanada ve İngiltere'de 1960'lı yıllarda yapılan çalışmalarda çeşitli gıdalardan izole edilen *C. perfringens* suşlarının hemolitik özellikte, ısıya duyarlı sporlar oluşturdukları ve A tipi gıda infeksiyonlarının ortaya çıkmasından enterotoksinin (CPE) sorumlu olduğu saptanmıştır (Hall ve ark.,1963; Hauschild ve Thatcher 1967; Sutton ve Hobbs 1968; Duncan ve Strong ,1969).

1971 yılında Stark ve Duncan'ın CPE'nin bütün klinik belirtilerini ilk olarak ortaya koyduğu; Skelkvale ve Uemura'nın 1977 yılında gönüllü kişilerde yaptığı çalışmayla bunu desteklediği bildirilmiştir (Brynestad ve Granum, 2002).

II. Dünya Savaşı sonrası Almanya'da konserve etlerin tüketilmesiyle ortaya çıkan ve "enteritis necroticans" olarak tanımlanan sindirim sistemi hastalığına *C. perfringens* tip C neden olmuştur. Benzer şekilde tip C Yeni Gine'de domuz etinin yenilmesiyle görülen "Pig bel" infeksiyonuna da neden olmaktadır (Murrell ve ark., 1966; Skjelkvale ve Duncan, 1975).

ABD'de görülen gıda kaynaklı infeksiyon ve intoksikasyonlar arasında *C. perfringens* olgularının 1969–1970 yıllarını kapsayan dönemde *S. aureus* intoksikasyonlarını takiben ikinci sırada; 1983–1997 yılları arasında ise üçüncü sırada yer aldığı bildirilmiştir (Lowenstein, 1972, McClane , 2001).

Bununla birlikte başta Kanada, İngiltere ve İskoçya olmak üzere birçok ülkede 1975 – 1990 yılları arasında *C. perfringens* kaynaklı gıda infeksiyonu geniş bir yayılım göstermiştir (Jay, 1992). Son yıllarda yapılan çalışmalarda *C. perfringens*'in toksin tipleri ve bunları regüle eden virulens genlerin tespit edilmesi halk sağlığının korunması için yapılacak moleküler epidemiyolojik çalışmalara yol göstermiştir (Petit ve ark., 1999; McClane 2000).

## 1.2. *C. perfringens*'in Klasifikasyonu ve Genel Özellikleri

*C. perfringens*, Bacillaceae familyasından Gram pozitif, çubukcuk formunda, 0,6-0,8 µm çapında, sporlu, hareketsiz, polisakkaritten yapılmış kapsülü olan bir mikroorganizmadır (Bisping ve Amtsberg, 1988; Labbe, 1989; Adams ve Moss, 1995).

*C. perfringens*, katı besi yerinde düzenli, yuvarlak, hafif opak ve parlak koloni oluşturur. Koloniler kanlı agarda genellikle çift hemoliz zonu oluşturmaktadır. Sözkonusu zonlar alfa toksinin oluşturduğu bulanık dış zon ve theta toksinin oluşturduğu iç zon şeklindedir (Brynestad ve Granum, 2002).

Bu mikroorganizmanın boyutları, geliştiği besi yerine ve bulunduğu faza bağlı olarak farklılık göstermektedir. Örneğin, glikozdan zengin bir besi yerinde gelişmesi halinde durgunluk fazındaki bakterilerin boyları daha kısa iken, nişasta içerikli besi yerinde sporlanmış olanların boylarının uzun olduğu bildirilmiştir (Labbe, 1989).

*C. perfringens*, gelişmesi için 13-14 amino asit (biotin, pantotenik asit, pridoksal, adenin v.b.) ile 5-6 vitamin ve bazı mineral maddelere ihtiyaç duyması nedeniyle en iyi et veya et bazlı gıdalarda bulunur ve gelişir. Heterofermentatif özelliği nedeniyle de çoğu karbonhidratları parçalar ( Jay , 1992 ).

*C. perfringens*'in sporları oval ve subterminal olup ısıya ve kurumaya dayanıklıdır. *C. perfringens*'in anaerob özelliği *C. botulinum*'da olduğu kadar kesin bir parametre olmayıp etken, ortamda düşük seviyedeki oksijen varlığında üreyebilmekte ve 72 saat canlı kalabilmektedir (Javetz ve ark., 1987; Labbe, 1989; Rood ve Cole, 1991; Quinn ve ark., 1994; Erol, 1999a). Bu mikroorganizma anaerob olmasına rağmen $E_h$+350 mV'ın altında hatta -400 mV seviyede üreme özelliğine sahiptir (Labbe, 2000).

Mezofilik bir mikroorganizma olan *C. perfringens*'in optimal üreme sıcaklığı 45°C (43-46°C) olup, 14°C'nin altında ve 50°C'nin üzerinde üremediği vejetatif formlarının gıdalarda 15-50 °C arasında bulunduğu zaman, generasyon süresinin 7-8 dakikanın altında olduğu bildirilmiştir (Labbe, 2000).

*C. perfringens* için optimal pH değeri 6-7 olup pH <5 ile pH >9 arasında üreme görülmez. Bu nedenle *C. perfringens* asidik koşullara C. *botulinum'* dan çok daha duyarlıdır (Frazier ve Westhoff, 1988; Labbe, 1989).

*C. perfringens* düşük $a_w$ değerine dirençli olmayıp gelişmesi $a_w$ değeri 0.95-0.97 arasında baskılanmaktadır. En düşük $a_w$ değerinin; sıcaklık, pH, $E_h$ ve çözelti gibi faktörlere bağlı olduğu ve sporlanmanın gerçekleşebildiği minimal $a_w$ değerinin 0.98 olduğu bildirilmiştir (Labbe, 1989; Jay, 1992, Erol, 1998). Mikroorganizmanın üremesi genelde % 6'lık tuzlu ortamda ( bazı suşlar % 8'e kadar) baskılanırken ( Frazier ve Westhoff, 1988; Labbe, 1989; Jay, 1992; Adams ve Moss, 1995 ), spor formları % 21.5 NaCl'de canlılığını koruyabilmektedir (Erol, 1999a).

Etkenin vejetatif formları ısıya duyarlı olup, yaklaşık % 90'ı 60°C'de 5 dakikada yıkımlanır. Buna karşın sporlar için ısıya duyarlılık suşların genetik özellikleri ile çevresel faktörlere göre büyük değişkenlik gösterir. Isıya dirençli sporlarda $D_{90}$°C değeri 15-145 dakika, ısıya duyarlı sporlarda 3-5 dakikadır (Labbe, 1989). Yine sporlar suşa bağlı değişkenlik göstererek, 100 °C'de 0.31-38 dakika arasında yıkımlanırlar (Jay, 1992; Hobbs ve Roberts, 1993; Adams ve Moss, 1995). Sporlar için $D_{95°C}$ değerinin 200 dakika kadar yüksek olabileceği bildirilmiştir (Labbe, 2000). $D_{55°C}$ değerinin, *cpe*'nin kromozomal olarak kopyalanmış vejetatif suşlarda, *cpe* negatif ya da *cpe*'nin plazmid üzerinde olduğu suşlara göre iki kat fazla olduğu bildirilmiştir. Aynı şekilde $D_{100°C}$ değeri spor formunda yaklaşık 60 kat daha fazladır. Bu ısı rezistansı *C. perfringens*'deki *cpe*'nin kromozomal kopyalanması ile gıda infeksiyonlarının ortaya çıkması arasındaki ilişkiyi açıklamaktadır (Sarker ve ark., 2000). *C. perfringens*'in A'dan E'ye kadar tiplendirilmesinde kullanılan belli başlı 4 letal toksinden 3'ünün genetik yerleşiminin plazmid üzerinde olduğu saptanmıştır (Canard ve ark., 1992; Katayoma ve ark., 1996)(Çizelge 1.2.).

**Çizelge 1.2.** *C. perfringens*'i tiplendirmek için kullanılan toksinlerin genetik lokalizasyonu (Canard ve ark., 1992; Katayama ve ark., 1996; Brynestad ve Granum, 2002).

| Tip | α -toksin | β -toksin | ε –toksin | ι-toksin | Enterotoksin |
|---|---|---|---|---|---|
| **A** | + | - | - | - | + |
| **B** | + | + | + | - | + |
| **C** | + | + | - | - | + |
| **D** | + | - | + | - | + |
| **E** | + | - | - | + | + |
| **Gen** | *plc* | *cpb1*<br>*cpb2* | *etx* | *iap*<br>*ibp* | *cpe* |
| **Genetik Yerleşim** | Kromozom | Plazmid | Plazmid | Plazmid | Plazmid / Kromozom |

Buna ilave olarak, etkenin vejetatif formu gıdada çok hızlı çoğalma özelliğine sahiptir. Bu özellik ve sporların yüksek ısıya dirençli oluşu gıda infeksiyonlarının oluşumunda büyük rol oynar. Buna karşın dondurma işlemi sırasında oluşan soğuk şok etkisinin *C. perfringens* ve sporları üzerine çok etkili olduğu ve uzun süreli donmuş muhafaza koşullarında (-18°C'de 3-6 ay) etkenlerin büyük bölümü canlılığını kaybettiği bildirilmiştir. Hipoklorit, *C. perfringens* sporları üzerine öldürücü etkiye sahiptir (Strong ve Canada, 1964; Jay, 1992). *C. perfringens* sporlarının sadece pH 8.5 altındaki hipoklorit çözeltilerinde ya da U.V. ışığı etkisiyle öldüğü saptanmıştır (Granum ve Magnussen, 1987).

Gıdaların normal mikroflorasında bulunan; örneğin et ve et ürünlerindeki psikrofiller, aerob mezofil bakteriler ve enterokoklar *C. perfringens*'in gelişmesini baskılar. Ayrıca bakteriyosin *C. perfringens* üzerine kuvvetli inhibitörik etki gösterir. *C. botulinum* gibi *C. perfringens'in* gelişmesi de $NaNO_2$ ile baskılanır (Erol, 1999a). $NaNO_2$ aynı zamanda sporların germinasyonunu da baskılar. Laboratuvar koşullarında 300 ppm $NaNO_2$ ilavesi halinde *C. perfringens*'in hiçbir gelişme göstermediği saptanmıştır. Bu nedenle kürlenmiş et tüketimine ilişkin olarak bildirilen *C. perfringens* infeksiyonu çok azdır (Frazier ve Westhoff, 1988 ; Labbe , 1989).

*C. perfringens* toprakta suda, sütte, atıksuda, insan ve hayvan intestinal kanalında bulunabilen ubiquiter bir mikroorganizmadır (Hatheway, 1990).Toprakta ve dışkıda bulunabilen *C. perfringens* sporları intermitent bir fekal kontaminasyon kaynağı ve indikatörüdür (Fujioka ve Shizumura, 1985). Ayrıca içme sularına virüs ve protozoal kistlerin inaktivasyonu için uygulanan işlemler için de bir indikatör faktördür (Payment ve Franco, 1993). *C. perfringens*'in bu temel özellikleri Avrupa'da yüzey ve kaynak sularının indikatör parametresi olarak kullanılmasını sağlanmıştır (Brynestad ve Granum, 2002).

### 1.3. *C. perfringens*'in Virülens Faktörleri

Gazlı gangren ve gıda infeksiyonlarına neden olan *C. pefringens* enterotoksinin de dahil olduğu 13 toksin, hemolizin , nöraminidaz (sialidaz) ve hidrolitik enzim sentezleyen güçlü metabolik aktivitesi ile toplam 16 virülens faktörüne sahiptir (Rood ve Cole,1991). *C. perfringens* değişik tip toksinleri üretmesine karşın, gıda infeksiyonlarının oluşumundan CPE ve β- toksin sorumlu tutulmaktadır. Toksinlerin lesitinaz (fosfolipaz C) içerdiği ve CPE'nin bağırsak epitel hücresine zarar vererek etkisini gösterdiği bildirilmiştir (Brynestad ve Granum, 2002).

#### 1.3.1 *C. perfringens*' in Toksin Tipleri

*C. perfringens*, enterotoksini de içeren 13 farklı toksin salgılamaktadır. Bakterinin ürettiği nekrotik, hemolitik ve letal özellikteki 4 büyük toksin (α, β, ε, ι) içeriği esas alınarak A-E olarak tanımlanan 5 değişik tipe ayrılmıştır (Bisping ve Amtsberg, 1988; Labbe, 1989; Swartz, 1990).

Birçok toksijenik mikroorganizmanın durgunluk fazı boyunca toksin oluşturduğu ve virulens faktörlerin aktive edilmesinde hücre yoğunluğunun önemli bir faktör olduğu belirtilmiştir (Bassler, 1999). *Clostridium perfringens*'te bunlardan farklı olarak, hücre yoğunluğunun düşük olduğu üreme fazının ortasında dört temel toksininin (α, β, ε ve ι) üretildiği Petit ve ark. (1999) tarafından ortaya konmuştur.

Çeşitli araştırıcılar *Clostridium perfringens*'in, toksin üretimini düzenleyen genlerinin koordinasyonunu sağlayan VirR/VirS iki komponentli regülasyon sistemine sahip olduğunu tespit etmişlerdir (Shimizu ve ark.,1994; Banu ve ark., 2000). Aynı şekilde türler arası iletişimde önemli rol oynayan *luxS* geninin AI-2 (Auto Inducer-2) sinyali ile *Clostridium perfringens*'in VirR/VirS regülasyon sistemini uyarıp alfa, kappa ve teta toksinlerin üretimini artırdığı bazı araştırmalar sonucunda ortaya çıkarılmıştır (Shimizu ve ark.,1994; Ohtani ve ark., 2002).

Bir AI-2 analoğu olan askorbik asidin varlığı ve yokluğunda AI-2 aktivitesinin ölçüldüğü bir araştırmada AI-2 üretiminin üreme , sporulasyon ve enterotoksin üretiminde belirgin etki yaptığı ortaya çıkarılmıştır. Kıyma süpernatantlarına askorbik asit ilavesiyle AI-2 aktivitesinin 100 kat azaldığı ve buna bağlı olarak spor üretiminin de azaldığı tespit edilmiştir. Askorbik asidin bulunmadığı durumda 24 saati müteakiben CPE seviyesinin en üst düzeye ulaştığı Western immunoblot tekniği ile yapılan analizlerle ortaya çıkarılmıştır (Novak ve Fratamico, 2004).

CPE, *C. perfringens* kaynaklı gıda infeksiyonlarındaki başlıca virulens faktörüdür. Sarker ve ark. 2000 yılında gen aktarım tekniği ile elde ettiği bulgularla enterotoksin üretiminin gıda infeksiyonu semptomlarının tek sebebi olduğunu bildirmiştir. *C. perfringens* tarafından salgılanan toksinlerin dağılımı Çizelge 1.3'de gösterilmiştir.

**Çizelge 1.3.** *C. perfringens* toksinleri (Rood ve Cole, 1991).

| *C. perfringens* tip | Üretilen Toksinler | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | α | β | ε | ι | δ | θ | κ | λ | μ | ν | Nm[a] | En[b] |
| A | +++ | - | - | - | - | + | + | - | + | + | + | + |
| B | + | ++ | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| C | + | ++ | - | - | + | + | + | - | + | + | + | + |
| D | + | - | ++ | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| E | + | - | - | + | - | + | + | + | - | + | + | + |

Nm[a] nöraminidaz ve sialidaz
En[b], enterotoksin

**α - toksin:** Hücre membranına etki ederek hücre ölümüne neden olan lesitinaz (fosfolipaz) etkili bir toksindir. *C. perfringens*'in tüm tipleri tarafından salgılanmaktadır. Bu toksin insanda gazlı gangrenden, hayvanlarda da nekrotik enteritis ve enterotoksemiden sorumludur (Rood ve Cole, 1991; Quinn ve ark., 1994; Adams ve Moss, 1995; Yoo ve ark., 1997).

**β - toksin:** *C. perfringens* tip B ve C tarafından salgılanan letal ve nekrotik özellikte bir toksindir. Tripsine karşı çok duyarlıdır. β-toksin 40 kDA ağırlığında, polipeptid zincirli ve ısıya dirençli bir proteindir. β-toksin, hayvanlarda tip C'den ileri gelen enteritis nekrotikansın önemli bir faktörüdür ( Shandera ve ark., 1983; Niilo, 1986; Rood ve Cole, 1991; Quinn ve ark., 1994; Adams ve Moss, 1995 ).

β toksinin normalde ince bağırsakta bulunan tripsin ile hızlı bir şekilde inaktif olması fizyolojik olarak önemlidir. Yüksek miktarda tripsin inhibitörünü içeren tatlı patates ile birlikte domuz etinin yenilmesi enteritis nekrotikans (pig bel) oluşumuna yardımcı olmaktadır (Granum, 1990).

**ε - toksin:** α, β ve ι toksinleri gibi letal ve nekrotik özellikte olmakla birlikte biyolojik etkisi kesin olarak tanımlanamamıştır. Bu toksin, B ve özellikle D tipi tarafından salgılanır. ε toksin, koyunlarda yumuşak böbrek hastalığının nedenidir. Protoksin salgılayarak tripsine benzer şekilde bağırsak proteazlarını etkilemektedir. Toksin bağırsak permeabilitesini artırarak dolaşım sisteminde emilir. Akciğer ödemi ve perikardial sıvı kaybına neden olmaktadır (McDonel, 1986; Quinn ve ark.,1994).

**ι - toksin:** Bu toksinin *C. perfringens* tip E tarafından salgılanan letal etkili bir protoksin olduğu bildirilmiştir (Yoo ve ark., 1997). Toksin, iki bağımsız polipeptidden oluşmaktadır. Dana ve koyunda önemli bir enterotoksemi faktörüdür (Rood ve Cole, 1991; Quinn ve ark., 1994).

**θ - toksin:** Etkenin tüm tipleri letal ve hemolitik özellikteki bu toksini salgılar. Toksin θ hemolizin, perfringolizin veya thiol etkili sitolizin olarak da bilinmektedir (Tweten, 1988). θ toksin, *C. perfringens* tarafından oluşturulan gazlı gangren ile ilişkili olup doku nekrozunda rol oynamaktadır. Ayrıca düşük konsantrasyonları polimorfonükleer lökositin morfolojisi, metabolizması ve taşınmasını değiştirmektedir (Stevens ve ark., 1987).

**μ - toksin:** Bu toksin *C. perfringens*'in A-D tipleri tarafından oluşturulur. Hyaluronidaz yapıda olup bağ dokunun önemli bir öğesi olan hyaluronik asidi azaltır. Bu toksin, nöraminidazın ticari preparatlarında yaygın olarak bulunmaktadır (McDonel, 1986).

**Nöraminidaz:** Glikoprotein, glikolipid ve oligosakkaridlerin nöraminik aside bağlanmasıyla oluşmuştur. Toksin, bakterinin tüm tipleri tarafından salgılanır. Bağ dokunun zarar görmesi veya hücre yüzeyinde yer alan reseptörlerin yıkımlanması sonucunda hastalık oluşturmaktadır (McDonel, 1986).

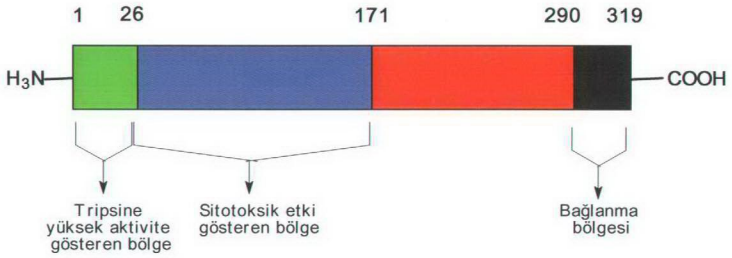
**Diğer toksinler:** Hemolizin olan δ toksin, kollagenaz κ toksini, proteaz λ toksini, nükleaz δ toksini, eta ile gamma toksinleri *C. perfringens*'in değişik suşlarınca salgılanan diğer toksinlerdir (Rood ve Cole, 1991).

### 1.3.2. Enterotoksinin Biyokimyasal Özellikleri ve Etki Şekli

*C. perfringens* enterotoksini (CPE) bu bakterinin ürettiği en az 13 değişik toksinden birisi olup (McClane ve ark., 1988; Labbe, 1989; McClane, 1992), etken tarafından salgılanan asıl virülens faktörüdür (McClane, 1994). CPE'nin protein yapısında olduğu ilk defa 1970'li yılların başında saptanmış (Richardson ve Granum, 1985) ve klonlanabildiği çeşitli çalışmalar sonucunda ortaya çıkarılmıştır (Iwanejko ve ark., 1989; Van Damme–Jangsten ve ark, 1989, Czeczulin ve ark, 1996).

A tipi gıda infeksiyonlarından sorumlu *C. perfringens* suşlarında toksine ait sekans yüksek miktarda bulunmakla birlikte zarar görmüş kopyalarının iota toksinle ilişkili E tipi *C. perfringens* suşlarında da bulunduğu tespit edilmiştir (Billington ve ark., 1998). CPE, 319 aminoasitten oluşan polipeptid yapıda 3,5 kDA ağırlığında izoelektrik noktası 4,3 olan ve bilinen diğer proteinlerle benzerliği bulunmayan, sadece *C. botulinum* protein kompleksi ile homolog olduğu bildirilen bir enterotoksindir (Stark ve Duncan, 1972; Kokai–kun ve Mc Clane, 1997). Yapısında serin, lösin, glutamik asit, izolösin, glisin ve tironin amino asitlerinin dominant olduğu bildirilmiştir (Hauschild ve ark., 1973).

CPE proteini iki ana parçadan oluşmaktadır. CPE'nin C terminal ucu ( 290-319 aminoasitler) bağırsaklardaki protein reseptörlerine bağlanma bölgesini içermektedir (Şekil 1.1). Bu reseptörler bir çok hücrenin bağlanma bölgelerinde yerleşmiş 22 kDa'lık claudin proteinleri olarak bildirilmiştir ( Katahira ve ark 1997; McClane, 2000). Antikorlar CPE'nin sitotoksitesini bu bağlanma bölgesinden nötralize etmektedir. N- terminal ucun ilk 44 aminoasit ve C-terminal ucun 3 aminoasitlik kısmının çıkarılmasıyla herhangi bir aktivasyon kaybının gözlenmediği bildirilmiştir (Kokai–kun ve Mc Clane, 1997). CPE'nin ilk 25-34 aminoasitlik kısmının ise bağırsaklarda tripsinasyon ve kemotripsinasyon özelliği taşıdığı bildirilmiştir (Granum, 1990). CPE'de 44 – 171 aminoasitler arasında kalan bölgenin sitotoksite ve içine yerleşme özelliği gösterdiği bildirilmiştir ( Brynestad ve Granum, 2002 ).

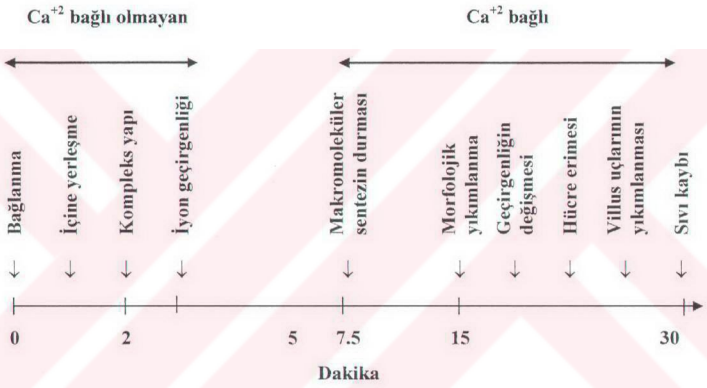



**Şekil 1.1.** *C. perfringens* enterotoksininin (CPE) fonksiyonel bölgeleri (Brynestad ve Granum, 2002)

CPE'nin biyolojik aktivitesinin % 90'ının 60 °C'de 5 dakikada kaybolduğu ve bu toksinin 60 °C'de 10 dakikada tamamen yıkımlandığını bildirilmiştir (McDonel, 1986; McClane ve ark., 1988; Labbe, 1989; Jay, 1992). CPE, proteaz ve subtilizinle inaktif olurken bazı proteolitik enzimlere (tripsin, kemotripsin, bakteriyel lipaz, α-amilaz, papain) direnç göstermektedir (Jay, 1992; Granum, 1990). CPE'nin –20 °C'de 20 gün veya 37 °C'de 7 gün muhafaza edildiğinde serolojik aktivitesini koruduğu, ancak biyolojik etkisini kaybettiği saptanmıştır (Labbe, 1989).

Sporlanma ile CPE üretimi arasında direkt ilişki mevcut olup gıda ile alınan milyonlarca canlı vejetatif formun bir kısmı midenin asitliğinde canlılığını sürdürerek ince bağırsaklara geçmekte ve burada spor formlarını oluşturmaktadır. CPE, sporlanmış *cpe*-pozitif suşlara ait hücrelerin içinde oluşmakta ve hücrenin lize olması ile ortama salınmaktadır (McClane, 1992). Smith ve McDonel (1980) sporlanmadan 1 saat sonra enterotoksinin oluştuğunu tespit etmişlerdir. CPE sadece bakterinin A tipi tarafından değil C ve D tipleri tarafından da salgılanmaktadır (McDonel, 1986).

*S. aureus* enterotoksini veya *C. botulinum* neurotoksini gıdada bulunurken *C. perfringens* enterotoksini gıdalarda bulunmamaktadır (Lindsay ve ark., 1985). Czeczulin ve ark. (1996) *C. perfringens*'in sporlanmamış vejetatif formlarının çok düşük seviyede de olsa CPE salgıladığını saptamışlardır. Laboratuvar koşullarında Duncan-Strong (DS) besi yerine *C. perfringens*'in vejetatif formların inokulasyonundan yaklaşık 24 - 36 saat sonra 1 - 100 µg/ml düzeyinde enterotoksin oluştuğu diğer araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir (Harmon ve Kautter, 1986; Jay, 1992).



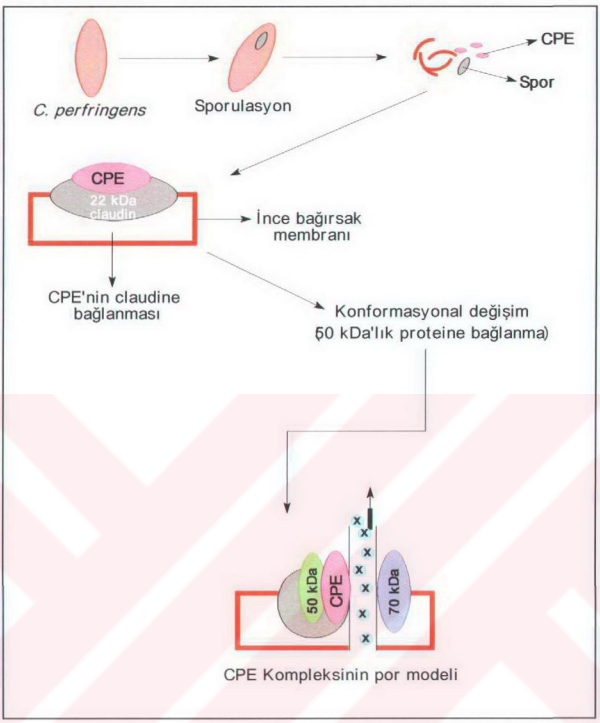

**Şekil 1.2.** CPE'nin zamana bağlı etkisi (McClane, 1992).

Enterotoksin, ince bağırsak epitel hücrelerinin membran yüzeyinde yer alan spesifik protein reseptörlerine bağlanarak hızlı bir şekilde içeriye girmektedir (McDonel ve Duncan, 1977; McClane, 1992). İnce bağırsağın tüm kısımları enteroktoksinden etkilenmektedir. Kolera toksinlerinin aksine CPE en yüksek aktivitesini ileumda, en düşük aktivitesini de duodenumda göstermektedir (McDonel, 1986; Labbe, 1989). CPE, bağırsak epitel hücrelerinin geçirgenliğini değiştirmektedir. Bağırsak içerisinde sıvı birikmesine ve aynı zamanda $Na^+$ ve $Cl^-$ artışına neden olmaktadır. Buna karşın $K^+$ ve $HCO_3^-$ emilimi etkilenmemektedir (McClane ve ark., 1988; McClane, 1992).

CPE'nin etki mekanizmasının belirlenmesinde ilk olarak bilinen diğer enterotoksinler ile karşılaştırılması yapılmış ve CPE'nin süratle hareket ederek ince bağırsak villuslarına bağlanıp villusların uçlarını yıkımladığı ve bu işlem için de en az 30 dakikaya gereksinim duyduğu saptanmıştır. CPE etkisinin zamana bağlı olarak değişimi bir çizgi halinde Şekil 1.2'de gösterilmiştir(McClane ve ark.,1992).

Gıda infeksiyonu sonucu oluşan semptomların 6-12 saat içinde görülmesi, CPE'nin etki etmesinin dışında sentezlenip hücrenin lize olması sonucu serbest kalması için geçecek zamanı da içermektedir. CPE'nin bağırsak hücrelerinin morfolojik yıkımlanması ve villusların yıkımlanması için ekstraselüler $Ca^{+2}$ iyonlarına gereksinim duyduğu bildirilmiştir (Granum, 1990; Mahony ve ark.1986 ; McClane ve ark. 1988). CPE'nin oldukça sitotoksik bir enterotoksin olduğu ve i.v. olarak injekte edildiğinde letal etkili olduğu bildirilmiştir (Mc Donel,1986). Bağlanma, içine yerleşme, kompleks yapının oluşması ve küçük molekül permeabilitesinin bozulması gibi CPE etkilerinin oluşmasından sonra memeli hücrelerinin canlılığını yitirdiği saptanmıştır. Sözkonusu dört etkinin her birinin CPE sitotoksitesi için gerekli olduğu bildirilmiştir (McClane, 1992).

Günümüzde kabul edilen CPE etki modeli, CPE'nin 2 farklı kompleks olduğunu gösteren birkaç çalışmanın temeline dayanmaktadır. İlk kompleksin şekillenmesi CPE'nin ince bağırsak claudin reseptörlerine bağlanmasıyla oluşmaktadır. Bu küçük kompleks 50 kDA'luk proteinle birlikte konformasyonal değişim geçirerek 70 kDA'luk proteinle birleşir ve küçük molekül permabilitesinin gelişmesine neden olan oldukça hidrofobik büyük bir kompleks oluşturur (McClane, 1997;Brynestad ve Granum, 2002) (Şekil 1.3). Böylece *C. perfringens* enterotoksinin insan intestinal epitel hücrelerinin apikal membranlarında porlar oluşturduğu bildirilmiştir (Hardy ve ark, 1999).




**Şekil 1.3.** *C. perfringens* gıda infeksiyonunun oluşum mekanizması ( Brynestad ve Granum, 2002).

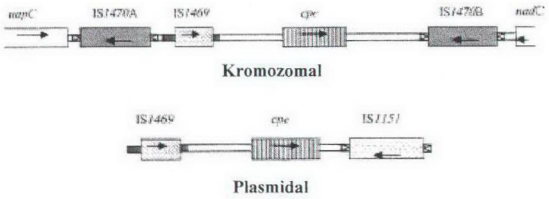
CPE'nin kolera toksini ve *E. coli* enteroktoksininden ayrılan birkaç özelliği bulunmaktadır. Bunlar: (i) CPE bağırsak cAMP düzeylerini etkilemez (ii) Bağırsakta glikoz emilimini engeller (iii) CPE, oluşumundan itibaren 15 – 30 dakika sonra hızla bağırsak dokusunu yıkımlar. Bu durum en önemli ayırt edici özelliktir (McClane ve ark., 1988; Labbe, 1989; McClane, 1994).

### 1.4. *C. perfringens* Enterotoksin Geni (*cpe*)

Çeşitli epidemiyolojik araştırmalarda CPE sentezlenmesini regüle eden *cpe*'nin tüm *C. perfringens* izolatları içerisinde %5'ten daha az oranda bulunduğu bildirilmiştir (Daube ve ark.,1996; Kokai-Kun ve ark.,1994; Songer ve Meer, 1996).

Bununla birlikte, *cpe*'nin *C. perfringens* tip A gıda infeksiyonlarından elde edilen izolatlarda kromozom üzerinde; gıda kaynaklı olmayan gastrointestinal hastalıklarla, hayvanlardan elde edilen izolatlarda plazmid üzerinde yer aldığı birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Canard ve ark., 1992; Cornillot ve ark., 1995; Collie ve McClane, 1998; Brynestad ve Granum, 1999; Sparks ve ark. 2001). Kromozomal *cpe* içeren izolatların hem vejetatif hem de spor formlarının ısıya dirençli oldukları tespit edilerek bu durumun pişmiş et ve et ürünlerinden kaynaklanan A tipi gıda infeksiyonlarında en önemli rolü oynadığı bildirilmiştir (Sarker ve ark., 2000). Bazı araştırmacılar da Southern blot çalışmalarıyla kromozom üzerinde yer alan *cpe*'nin IS*1470*(A,B) ve IS*1469* İnsersiyon Sekansları ile bağlantılı olduğunu ortaya çıkarmışlardır (Canard ve ark., 1992; Cornillot ve ark., 1995; Brynestad ve ark.1997). Buna ek olarak kromozomal *cpe*'nin, Şekil 1.4'te belirtildiği gibi, IS*1470* içeren 6.3-kbp ağırlığındaki transpozon üzerinde yer aldığı tespit edilmiş olup transpozonun çıkarılmasıyla enterotoksin üretimininin durduğu bildirilmiştir (Brynestad ve Granum, 1999; Petit ve ark. 1999).

Son yıllarda yapılan moleküler biyolojik çalışmalarda insanlarda görülen gıda kaynaklı olmayan (antibiyotiğe bağlı ve sporadik) diyareler ile hayvanlardan elde edilen *C. perfringens* tip A izolatlarında *cpe*'nin yaklaşık 100-kbp ağırlığındaki büyük bir plazmidin üzerinde yer aldığı bildirilmiştir (Cornillot ve ark., 1995; Collie ve McClane, 1998; Sparks ve ark., 2001). Ayrıca plazmidal *cpe*'nin konjugasyon ile $10^3$ transkonjugat/donör oranında transfer edilebildiği, kromozomal *cpe*'den farklı olarak IS*1469* ve IS*1151* ile bağlantılı olduğu bildirilmektedir (Cornillot ve ark., 1995; Brynestad ve ark., 2001).




**Şekil 1.4.** *cpe* geninin genetik lokasyonu ( Brynestad ve Granum, 2002).

*Cpe*'nin konjugasyonla aktarımı ve bu aktarıma mobil elementlerin de dahil olması doğada az sayıda bulunan *cpe*–pozitif suşların yeterli *cpe* kaynağı olduğunun göstergesi olarak kabul edilmektedir. CPE üretiminin bağırsaklarda etkin olduğu durumlarda *cpe*'nin pozitif suşlardan negatif suşlara geçişi yeni *cpe*–pozitif suşların ortaya çıkmasına yol açmaktadır (Brynestad ve Granum, 2002).

Enterotoksin üretiminin sporulasyon sırasında regüle edildiği ve *cpe* -pozitif izolatlarda sporulasyonda üretilen total proteinin yaklaşık %15 - %30'unu CPE'nin oluşturduğu çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Sporulasyon mutantlarında yapılan çalışmalarda vejetatif üreme sırasında enterotoksin üretiminin çok az miktarda olduğu ve sporulasyon sırasında üretilen enterotoksinin çok fazla miktarda olduğu Western blot ve mRNA analizleriyle doğrulanmıştır. CPE sekresyon edilmeyip ana hücrenin lize olması sırasında ortama salınmaktadır (McClane, 1997; Brynestad ve Granum, 2002). Başlangıç kodonunun 58'den 143 bp'lik upstreamından 3 promotor haritalanmıştır. P1, P2, P3'ün upstreamindeki sekanslar sporulasyon bağımlı sigma faktörler olan Sig K ve Sig E bağımlı promotorlar ile önemli derecede benzerlik göstermektedir. P2 ve P3'ün transkripsiyonu durgunluk faza girişte başlatılmakta olup CPE'nin ekspresyonunda bu promotorlara ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir (Zhao ve Melville, 1998). *Cpe* mRNA'sı 58 dakikalık yarı ömrüyle oldukça stabil yapıdadır (Labbe ve Duncan, 1977). *C. perfringens* alt yapısı fazla miktarlarda CPE üretimi için yeterli ve esansiyeldir.

Ancak *cpe*-negatif suşlara eklenen *cpe*'nin normal enterotoksin üretimini sağladığı bildirilmiştir (Melville ve ark., 1994; Czeczulin ve ark.,1996). Bunun dışındaki muhtemel bir regulasyon mekanizması da *B. subtilis*'te bulunan Hpr'e bağlı geçici bir regulatördür (Brynestad ve ark., 1994).

## 1.5. *C. perfringens* Kaynaklı Gıda İnfeksiyonları

### 1.5.1. A Tipi *C. perfringens* Gıda İnfeksiyonları

Gıda kaynaklı A tipi *C. perfringens* infeksiyonları, CPE'den kaynaklanan ve en sıklıkla görülen formudur (Skelkvalve ve Uemura, 1977; Sarker ve ark., 1999). CPE, *C. perfringens* hücre sayısının ince bağırsaklarda en az $10^7$ düzeyinde olması durumunda sentezlenmektedir. Genelde kontamine gıdalarla alınan vejetatif formların çoğu mide asidinin etkisiyle yok olurken bir kısmı canlı kalmaktadır. Etken protein varlığında mide asidinden korunmaktadır. Proteinin mide asidine olan etkisinden dolayı proteinli gıdalar ile hastalık olguları arasında ilişkinin olduğu görülmüştür (McClane, 1992). Canlılığını devam ettiren *cpe*(+) vejetatif formlar ince bağırsağa taşınarak burada uygun koşullarda çoğalıp sporlanır ve protein özelliğindeki enterotoksinleri üretirler. Enterotoksin, sporlanmış hücrelerin içinde oluşur ve hücrelerin lize olması ile ortama salınır. Enterotoksinler sporangium hücrelerinin lize olmalarından hemen önce en üst düzeyde oluşturulurlar. *C. perfringens*'in tüm izolatları gıda infeksiyonuna neden olmamaktadır. Çünkü izolatların tümü *cpe* geni taşımaz ve buna bağlı olarak da enterotoksin üretme yeteneğine sahip değildirler (Rood, 1998). Bu enterotoksin ince bağırsak epitel hücrelerini morfolojik olarak yıkımlamaktadır. CPE bağırsak epitel hücrelerini etkileyerek bağırsak lümenine proteinlerin geçişi ve glikoz transportunun baskılanmasına neden olur. Özellikle de epitel hücrelerin villus uçlarının ayrılmasını sağlayarak sıvı kaybı ve krampları da içeren *C. perfringens* gıda infeksiyonu semptomlarına neden olmaktadır (McClane, 1992; Mims ve ark., 1993).

İnfeksiyon, kontamine gıdanın tüketilmesinden yaklaşık 8 – 12 saat sonrasında akut abdominal sancı, bulantı ve diyare semptomları ile başlamaktadır. İnfeksiyonun 24 saat içinde tüm belirtileri geçmekle birlikte, yaşlılarda ve bebeklerde şiddetli dehidrasyon sonucunda nadiren ölüm görülebilmektedir.

İnfeksiyonun seyrinin kısa olması ve genellikle iyi sonlanması nedeniyle *C. perfringens*'ten etkilenen insanların çoğunun hastanelere müracaat etmedikleri bildirilmektedir. Bu nedenle *C. perfringens* gıda infeksiyonları rapor edilmeyen hastalıklardan olup bildirilen vaka sayılarının gerçek vaka sayısından çok daha düşük olduğu tahmin edilmektedir. Bununla beraber sanayileşmiş toplumlarda görülen gıda kaynaklı infeksiyonların içinde *C. perfringens*'ten kaynaklananların önemli bir yer tuttuğu bildirilmektedir (McClane, 1997; Rood, 1998).

Finlandiyada yapılan epidemiyolojik araştırmada 1975-1999 yılları arasında gıda infeksiyonlarından etkilenen toplam 58.000 kişiden 6.900 kişinin *C. perfingens* kaynaklı gıda infeksiyonlarından etkilendiği bildirilmiştir. Aynı araştırmada sözkonusu 25 yıl içinde *C. perfingens*'e bağlı 238 gıda kaynaklı salgının olduğu ve bunun tüm salgınların %20.0'sini oluşturduğu bildirilmiştir (Lukinmaa ve ark., 2002).

Norveç'te, *C. perfringens* kaynaklı gıda infeksiyonları 1988–1995 yılları arasında görülen tüm gıda infeksiyonu vakalarının yaklaşık üçte birini oluşturduğu tespit edilmiştir (Brynestad ve Granum, 2002). Amerika'da 1983 ile 1994 yılları arasında rapor edilen vaka sayısının 202-1240 arasında, Japonya' da 288-4571 arasında, İngiltere ve İskoçya'da 562-1716 arasında değiştiği bildirilmiştir (Labbe, 2000). Söz konusu kontamine gıdalar, genellikle ısı işlemi uygulanması sonucu, yarışmacı floranın yok edildiği ve *C. perfringens* sporlarının canlı kaldığı gıdalardır. *C. perfringens* genellikle dominant flora olmakla beraber zaman zaman *Bacillus cereus* gibi spor formlu mikroorganizmalar da beraber bulunabilmektedir (Andersson ve ark., 1995).

**Çizelge1.4.** Değişik ülkelerde *C. perfringens*'in neden olduğu gıda infeksiyon olguları (Brunner ve Eisgruber, 1996).

| Ülke, Yıl | Sorumlu olan gıdalar | Hastalıktan etkilenenlerin sayısı | *C. perfringens* sayısı |
|---|---|---|---|
| Almanya, 1969 | Çikolatalı sos | 40 | $1.6 \times 10^7$ kob/g |
| İngiltere, 1980 | Nedeni bilinmeyen | 1056 (57 olgu) | Saptanamamış |
| Almanya, 1983 | Pirinçli tavuk çorbası | 20 | $2.6 \times 10^5$ kob/g |
| İngiltere, 1985 | Kuzu eti | 12 | Saptanamamış |
| ABD, 1985 | Kızartma sosu | 305 | $10^5 - 10^7$ kob/g |
| İngiltere, 1978-1987 | Et, çorba | 899 (25 olgu) | Saptanamamış |
| ABD, 1987 | Domuz eti | 20 | Saptanamamış |
| ABD, 1987 | Hindi eti | 86 | $2.5 \times 10^7$ kob/g |
| ABD, 1987 | Nedeni bilinmeyen | 25 | $10^4 - 10^{12}$ kob/g |
| İngiltere, 1985 | Kıyma | 58 | Saptanamamış |
| ABD, 1987 | Nedeni bilinmeyen | 243 | Saptanamamış |
| ABD, 1994 | Ton balığı salatası | 52 | Saptanamamış |
| İngiltere, 1989 | Domuz eti | 17 | Saptanamamış |

*C. perfringens* kaynaklı gıda infeksiyonlarının çoğu toplu yemek pişiren kurumlar ve/veya yemek servisi yapan birimlerde ortaya çıkmaktadır. Gıdalar pişirildikten sonra soğutulma işleminin yavaş olması veya yeniden ısıtma işleminin yeterince yapılmaması durumunda, *C. perfringens* hızla çoğalmaktadır.

Okul, hastane, kantin, yemekhane vb. gibi çok fazla kişiye sunulmak üzere büyük miktarlarda hazırlanan veya büyük parçalar halinde pişirilen et ve kanatlı etleri bu tür infeksiyonların oluşumuna önemli bir kaynak teşkil etmektedir (Fukushima ve ark., 1987; Labbe, 1989; Ali ve ark., 1991; Hobbs ve Roberts, 1993). Çeşitli ülkelerde meydana gelen *C. perfringens* gıda infeksiyonlarında sorumlu tutulan gıdalar ve etkilenen kişi sayısı Çizelge 1.4'te gösterilmiştir.

*C. perfringens* 20 esansiyel aminoasitten 13'ünü üretme kabiliyetinden yoksun olması nedeniyle proteince zengin gıdalarda hızla çoğalabilmekte bunun sonucunda et ve et ürünlerinden kaynaklanan gıda infeksiyonların %75'inde saptanmaktadır (Johnson ve Gerding, 1997). *C. perfringens*' in infeksiyona neden olduğu gıdalar arasında biftek, Meksika yemekleri, bezelye çorbası, güveç, somon balığı, lazanya, ren geyiği eti ve vakum paketli domuz etinin olduğu epidemiyolojik olarak açıklığa kavuşturulmuştur (Hatheway, 1990). Modifiye atmosferle paketleme ile *C. perfringens* 'in üremesi baskılanmaktadır (Labbe, 2000).

*C. perfringens* 'ten ileri gelen gıda infeksiyonlarının oluşumu için gerekli koşullar aşağıda bildirilmiştir (Hobbs ve Roberts, 1993);

- Gıdaların *C. perfringens* ile kontamine olması,
- Gıdaların yetersiz pişirilmeleri sırasında etkenin vejetatif formlarının yıkımlanmasına karşın, ısıya dirençli sporların canlılığını koruması,
- Yetersiz pişirme sırasında etin serbest oksijen düzeyi düşürüldükten sonra gıdada anaerobik koşulların oluşması,
- Pişirmeyi takiben yeterli ve hızlı uygulanmayan soğutma işlemi (özellikle 15 – 60 °C'ler arasında yavaş soğutma) sonucu gıdalardaki spor formların vejetatif forma dönüşerek çoğalması.

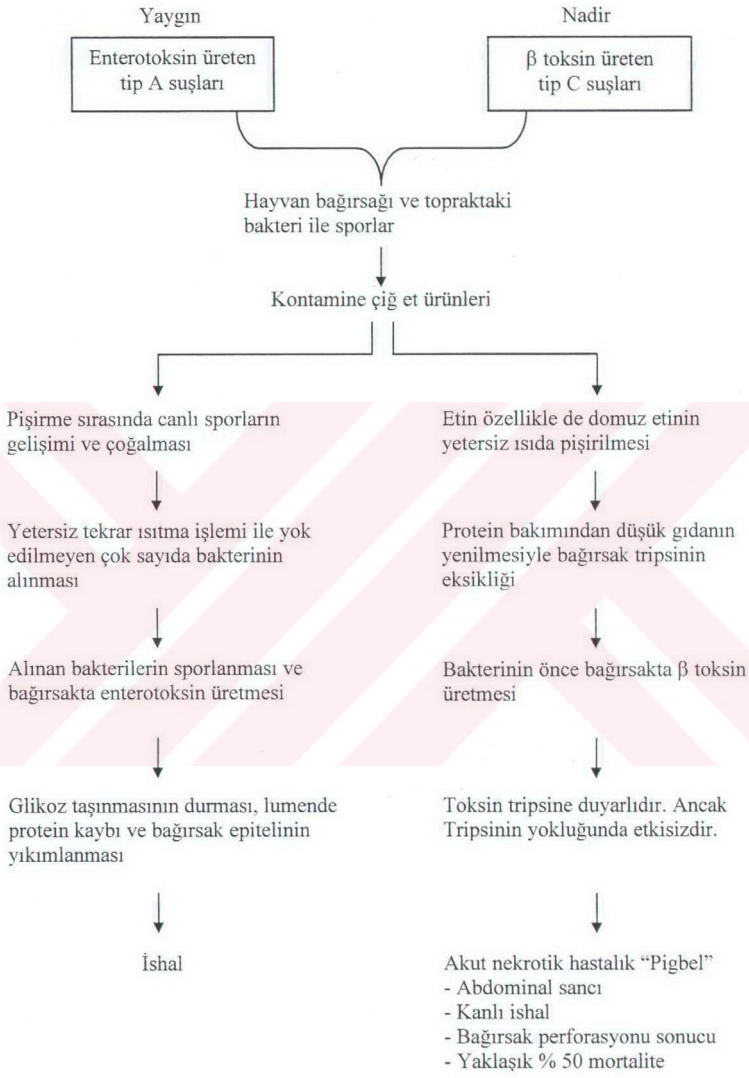
*C. perfringens*'den ileri gelen bir gıda infeksiyonu meydana gelebilmesi için 8–10 mg toksinin barsaklarda etkimesi gerekmektedir. Stafilokokal intoksikasyonlar (1 μ) ile karşılaştırıldığında bu değerin oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (Labbe, 1989).

### 1.5.2. C Tipi *C. perfringens* Gıda İnfeksiyonları (Pig Bel, Enteritis necroticans)

*C. perfringens*'in nekrotik özellikte β toksinini üreten C tipi suşlarının neden olduğu nekrotik enteritis ile karakterize nadir görülen bir gıda infeksiyonudur. *C. perfringens* tip C gıda infeksiyonunun gelişmiş ülkelerde nadiren görüldüğü, Avrupa'da geçmiş on yıl içinde herhangi bir vakaya rastlanmadığı bildirilmiştir.

Hastalık II. Dünya Savaşı sonunda Almanya ve Norveç'teki "Darmbrand" hastalığı ve 1950–1960 yılları arasında Papua Yeni Gine'de geleneksel domuz eti yeme festivalinden sonra genç ve yetişkin insanlarda görülen "Pig bel" hastalığı olarak da bilinmektedir (Labbe,1989). Beslenme ve sosyal faktörler hastalığın epidemiyolojisinde önemli rol oynar. Enteritis nekrotikans, protein içeren etli yemeklerin (özellikle de domuz eti) yenilmesi ile ortaya çıkmaktadır (Rood, 1998). β-toksinin bağırsak proteazına direnci yoktur (Labbe, 1989; Swartz, 1990).

İnfeksiyonda inkübasyon süresi 5 – 6 saattir ve semptomlar arasında ani başlayan abdominal sancı ve zaman zaman kanlı bir ishal, bazen de kusmayı takiben ince bağırsaklarda nekrotik bir yangı bulunur. Hastalık tedavi edilmezse genellikle ölümle sonuçlanmakta, tedavi edilirse mortalite oranı % 15 – 25'e düşmektedir. Bu hastalık çoğunlukla nekrotik β–toksin üretiminden kaynaklanmakta olup δ – toksin ve θ – toksinin katkısı da bulunmaktadır (Granum 1990; Jolivet–Reynaud ve ark.,1986). Söz konusu toksinler, *C. perfringens* tip C'nin vejetatif forma geçmesi ile birlikte salgılanmaktadır. Çoğunlukla düşük düzeyli proteinli gıdaların alınması sonucu ince bağırsakda proteolitik enzimlerin düşük yoğunlukta bulunması buna katkıda bulunmaktadır. β-toksin, normalde duodenumda ve ince bağırsağın diğer kısımlarında tripsin aktivitesine bağlı olarak β–barrel bölgesinden parçalanarak 2 lizinli kalıntıya ayrılır (Granum 1990; Hunter ve ark. 1993). *C. perfringens*'den ileri gelen enteritis nekrotikansın patojenitesi Şekil 1.5'te gösterilmiştir. Enteritis nekrotikansın patojenitesinden tripsin tarafından sindirim sisteminde hızla inaktif olan ekstraselüler özellikteki β toksin sorumludur. Protein bakımından düşük diyetler tripsin gibi pankreatik enzimlerin miktarını düşürerek β toksinin inaktif olmasını engellemektedir (Lawrence ve Walker, 1976; Labbe, 1989). Ayrıca tripsin inhibitörü içeren tatlı patates Papua Yeni Gine'nin hastalığa endemik olarak rastlanan bölgesinde temel besin maddesi olup geleneksel festivallerde domuz eti ile birlikte tüketilmektedir. Sindirim sisteminde tripsin düzeyinin azalması ile seyreden bu inhibitörün varlığı üretilen β toksinin normal olarak inaktif olmasını engellemektedir. Bu toksin, bağırsak villuslarının yıkımlanmasına ve hemorajik nekroza neden olmaktadır (Rood, 1998).




**Şekil 1.5.** *C. perfringens*'den kaynaklanan gıda infeksiyonu ile enteritis nekrotikansın patojenitesi (Mims ve ark., 1993).

### 1.5.3. *C. perfringens* ile Kontamine Hindi Etinden Kaynaklanan Gıda İnfeksiyonları

İtalya'nın Florence kentinde 1976 yılında bir ilkokulda servis yapılmadan önce tekrar ısıtılmış hindi etinin yenmesi sonucunda *C. perfringens*'in neden olduğu gıda infeksiyonunda 300 ilkokul öğrencisi etkilenmiş, hindi etinin depolama sıcaklığı, pişirme sonrası periyot ve taşıma araçlarındaki yanlış uygulamalara bağlı olarak infeksiyonun meydana gelmiş olabileceği bildirilmiştir (Caroli ve ark.,1977).

CDC'ye 1987-1991 yılları arasında bildirilen kanatlı eti tüketiminden kaynaklanan toplam 128 gıda infeksiyon ve intoksikasyon olgusunda 3500'ün üzerinde kişinin etkilendiği rapor edilmiş, hindi eti tüketiminin %36 oranında bir paya sahip olduğu ve bu olguların %28'inde *C. perfringens*'in sorumlu olduğu belirlenmiştir (Anon,1991). CDC'nin 1990 ile 1999 yılları arasında ABD'de bildirdiği *C. perfringens*'le kontamine hindi eti tüketiminden kaynaklanan gıda infeksiyonları sayıları Çizelge 1.5'te gösterilmiştir.

ABD'nin Multnomah şehrinde bir restoranda düzenlenen şükran günü yemeğinde hindi etinin tüketilmesi sonucunda 50 kişi gıda infeksiyonundan etkilenmiştir. Bu olguda hem hindi etinden hem de gıdayı tüketenlerin dışkılarından *C. perfingens*'in izole edildiği bildirilmiştir.Epidemiyolojik taramalar, hindi etinin lavaboda soğuk su içinde iki saatte çözündürüldüğünü, ayrıca uygunsuz pişirme ve yetersiz soğutmanın bu tehlikeye yol açtığını ortaya koymuştur (Anon,2001b).

ABD'de Halk Sağlığı Laboratuvar Servisi Bulaşıcı Hastalık Tarama Merkezine (Public Health Laboratory Service Communicable Disease Surveillance Center), 1992-1999 yılları arasında bildirilen 1426 olguda toplam 7000 kişinin etkilendiği ve 17 kişinin de yaşamını yitirdiği bildirilmiştir. Sözkonusu olguların %20'sinin kanatlı eti tüketiminden kaynaklandığı saptanmış olup, bu olguların da %75'inin tavuk eti, %10.0'unun hindi eti tüketiminden köken aldığı belirlenmiştir. Sorumlu tutulan etkenlerin %21'inin *C. perfingens* olduğu bildirilmiştir (Kessel ve ark.,2001).

ABD'nin Wichita şehrinde 67 kişinin katıldığı bir partide ikram edilen hindi etinin yenmesiyle görülen gıda infeksiyonu sonucunda yapılan laboratuvar incelemelerinde hindi etlerinden *C. perfringens* izole edilmiştir. Sözkonusu gıda infeksiyonu; tam pişirilmeyen hindi etinin soğutulmadan 85°C'de iken kaplara konulması ve servis edilene kadar aradan uzun bir zamanın geçmesi, ayrıca hindi etinin uygun ısıda tekrar ısıtılması yerine sıcak su içinde tutulmasına bağlı olarak, yüksek protein içeriğine sahip hindi etinde etkenin infeksiyon oluşturacak düzeye yükselmesiyle oluştuğu bildirilmiştir (Tezaguic ve ark.,2000).

**Çizelge1.5.** CDC'nin 1990 -1999 yılları arasında ABD'de bildirmiş olduğu *C.perfingens* ile kontamine hindi etinden kaynaklanan gıda infeksiyonları (Anon, 2001c; 2003c,d)

| Yıl | Etkilenen Kişi Sayısı |
|---|---|
| 1990 | 20 |
| 1991 | 645 |
| 1992 | 100 |
| 1994 | 56 |
| 1996 | 80 |
| 1999 | 13 |

### 1.6. *C. perfringens'* in Antibiyotik Dirençliliği

Kanatlı eti üretiminde söz sahibi olan ülkelerde, büyük ekonomik kayıplara neden olduğu tespit edilen, *Clostridium perfringens* kaynaklı kanatlı hastalıklarına karşı Gram pozitiflere etki eden antimikrobiyal büyütme faktörlerinin (ABF) ve iyonoforlu antikoksidiyallerin (İA) sıklıkla kullanıldığı bildirilmiştir (Prescot ve ark.,1978; Thomke ve Elwinger, 1998). Büyütme faktörlerinin ekonomik yönden olumlu etkilerinin yanında kanatlı yemlerine çok düşük düzeylerde katılmaları nedeniyle (1-50 gram/ton) söz konusu antibakteriyellere yapısal benzerlik gösteren, özellikle de beşeri hekimlikte sağıltıcı amaçla kullanılan bazı antibiyotiklere karşı çapraz direnç gelişebildiği bildirilmiştir ( Thomke ve Elwinger, 1998; Anadon ve Martinez, 1999; Bogaard ve Stobberingh, 2000; Witte, 2000; Emborg ve ark., 2001).

**Çizelge1.6.** Kanatlılardan elde edilen *C. perfringens* izolatlarının bazı ABF'lere olan dirençliliği ve kanatlı yemlerindeki dozajları (Watkins ve ark., 1997).

| Antibiyotikler | Tavuk İzolatları | | | Hindi İzolatları | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $MIC_{50}$ (mg/L) | $MIC_{90}$ (mg/L) | Yem Dozajı (ppm) | $MIC_{50}$ (mg/L) | $MIC_{90}$ (mg/L) | Yem Dozajı (ppm) |
| Avilamisin | 0.5 | 0.5 | 2.5-20 | 0.25 | 0.25 | 2.5-20 |
| Avoparsin | 0.13 | 0.13 | 5-40 | 0.25 | 0.25 | -------- |
| Basitrasin | 256 | >256 | 4.5-55 | 8 | 16 | 4.5-55 |
| Linkomisin | 64 | >256 | 2.2-4.5 | 16 | >256 | --------- |
| Monensin | 1 | 1 | 100-121 | 1 | 1 | 60-100 |
| Narasin | 0.25 | 0.5 | 60-80 | 0.25 | 0.25 | --------- |
| Penisilin | 0.13 | 0.25 | 2.8-55 | 0.06 | 0.13 | 2.8-55 |
| Tilmikosin | 2 | 4 | ------- | 2 | 256 | --------- |
| Tiylosin | 2 | 2 | 4.5-55 | 2 | 256 | --------- |
| Virginiyamisin | 2 | 16 | 5.5-22 | 2 | 16 | 11-22 |

ABD'de yapılan bir çalışmada, ticari tavuk ve hindi sürülerinden alınan dışkı örneklerinden elde edilen *Clostridium perfringens* izolatlarında; tavuklardan izole edilenlerde basitrasin ve linkomisine ; hindilerden izole edilenlerde ise linkomisin, tilmikosin ve tiylosine karşı direnç geliştiği tespit edilmiştir (Çizelge 1.6.) (Watkins ve ark., 1997).

Avrupa'da yapılan bir çalışmada ise İsviçre, Norveç ve Danimarka'da nekrotik enteritis görülen kanatlı sürülerinden elde edilen 102 *Clostridium perfringens* izolatında, tetrasikline karşı dirençliliğin İsviçre kaynaklılarda %76, Norveç kaynaklılarda %29, Danimarka kaynaklılarda ise %10 düzeyinde olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada söz konusu izolatların %80'inde tetrasiklin direnç genleri olan *tetA(P)* ve *tetB(P)*; %20'sinde de sadece *tetA(P)* geninin tespit edildiği bildirilmiştir (Johansson ve ark., 2004).

**Çizelge1.7.** Çeşitli antibiyotiklerin baharattan izole edilen *C. perfringens*'e karşı etkisi (Banerjee ve Sarkar, 2004).

| Antibiyotik | Duyarlı | Ortadereceli Duyarlı | Dirençli |
|---|---|---|---|
| Ampisilin | 7 | 0 | **93** |
| Basitrasin | 64 | 0 | **36** |
| Karbenisilin | 68 | 21 | **11** |
| Sefalotin | 14 | 29 | **57** |
| Kloramfenikol | 100 | 0 | **0** |
| Siprofloksasin | 75 | 25 | **0** |
| Kloksasilin | 4 | 0 | **96** |
| Eritromisin | 0 | 0 | **100** |
| Gentamisin | 0 | 25 | **75** |
| Kanamisin | 0 | 0 | **100** |
| Metranidazol | 0 | 0 | **100** |
| Nalidiksik Asit | 11 | 3 | **86** |
| Norfloksasin | 75 | 25 | **0** |
| Penisilin G | 14 | 43 | **43** |
| Polimiksin B | 4 | 21 | **75** |
| Rifampisin | 14 | 11 | **75** |
| Streptomisin | 0 | 0 | **100** |
| Tetrasiklin | 100 | 0 | **0** |
| Trimethoprim | 100 | 0 | **0** |
| Vankomisin | 36 | 21 | **43** |

Hindistan'da besinlere katılan baharattan elde edilen *Clostridium perfringens* izolatlarında yapılan bir çalışmada elde edilen sonuçlar Çizelge 1.7'de belirtilmiştir (Banerjee ve Sarkar, 2004).

Domuz, güvercin ve insan dışkılarından elde edilen *Clostridium perfringens* izolatlarında yapılan çalışmalarda tetrasiklin, eritromisin ve kloramfenikole karşı direnç geliştiği ve bunu regüle eden genlerin sırasıyla *tet*(P), *erm*BP-*erm*Q ve *cat*P-*cat*Q olduğu saptanmıştır. Ayrıca eritromisine olan direncin linkomisin ve klindamisinle birlikte görüldüğü bildirilmiştir (Rood ve Cole ,1991).

### 1.7. *C. perfringens'* in Gıdalarda Varlığı

Protein bakımından zengin kırmızı et ve ürünleri ile kanatlı eti ve ürünleri *C. perfringens* bakımından riskli gıdalar arasında yer almaktadır (Labbe 1989; Hobbs ve Roberts, 1993; Gillespie ve ark., 2000). Özellikle yağ oranı düşük yüksek proteinli kanatlı eti veya sığır eti içeren sebze yemekleri bakterinin gelişimine yardımcı olmaktadır (Wrigley, 1990). Sucuk, sosis, salam gibi baharatlı et ürünleri de bu etkeni içermektedir (Guzman ve ark., 1990; Sharma ve ark., 1993). Ayrıca *C. perfringens* ile kontamine su ürünleri özellikle somon balığı ile deniz kabuklularından istiridyenin gıda infeksiyonu bakımından tehlike kaynağı olabileceği bildirilmiştir (Hewitt ve ark., 1986; Saito, 1990).

#### 1.7.1. Kırmızı Et ve Ürünlerinde *C. perfringens'*in Varlığı

Yapılan çalışmalarda kırmızı et ve ürünlerinin önemli bölümünün yüksek düzeyde kontamine olmasına, özellikle kesim aşamasındaki hijyenik koşulların yeterli olmayışına bağlı olarak dışkı ve bağırsak içeriğinin neden olduğu bilinmektedir. Bu çerçevede; Miwa ve ark. (1997) sığır, domuz ve tavuk bağırsak içerikleri üzerinde yaptıkları bir çalışma kapsamında incelenen 50 sığırın 38'inden (% 76.0), 50 domuzun 22'sinden (% 44.0), 50 tavuğun da 40'ından (% 80.0) *C. perfringens* izole ettiklerini ve bakterinin dışkı / bağırsak içeriği yoluyla kesim sırasında karkasların kontaminasyonuna neden olduğunu bildirmişlerdir.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada, sığır kıymalarında *C. perfringens*'in varlığı ve kontaminasyon düzeyinin belirlenmesi amacıyla Ankara'nın değişik semtlerindeki market ve kasaplardan alınan örneklerin % 65.0'inin 2.51 MPN/g düzeyinde *C. perfringens* ile kontamine olduğu saptanmıştır (Çakmak ve Erol, 2002).

Guang-Hua ve Xiao-Ling (1994) tüketime sunulan 31 sığır eti örneğinin 20'sinden (% 65.0), 28 koyun eti örneğinin tamamından (% 100) ve 30 domuz eti örneğinin 23'ünden (% 77.0) *C. perfringens* izole etmişlerdir.

Aynı araştırmacılar, inceledikleri 11 pişmiş sucuk örneğinin 3'ünden (% 27.0), 11 pişmiş jambon örneğinin 4'ünden (% 36.0) ve 20 Çin usulü baharatlı sığır eti örneğinin 1'inden (% 5.0) olmak üzere toplam 52 değişik et ürünü örneğinin 10'undan da (% 19.0) *C. perfringens* saptamışlardır.

### 1.7.2. Kanatlı Eti ve Ürünlerinde *C. perfringens*'in Varlığı

Değişik araştırıcılar tarafından yapılan çalışmalarda kanatlı eti ve ürünlerinin de *C. perfringens* ile önemli düzeyde kontamine olduğu bildirilmiştir.

Saito (1990) 68 tavuk eti örneğinin 16'sından (% 24) *C. perfringens* izole ve identifiye etmiştir.

Ali ve Fung (1991) 55 hindi kıyması örneğinin 40'ında (% 73) *C. perfringens* saptadıklarını bildirmişlerdir.

ABD Tarım Bakanlığı Gıda Güvenliği ve Kontrolü Servisi'nce(USDA/FSIS) Ocak-Mart 1995 ve Eylül-Kasım 1995 tarihlarini kapsayan soğuk aylarda hindi kıymalarında yapılan örneklemelerde 296 örneğin 82'inde (%28.1) *C. perfringens* izole etmişlerdir.

Panebianco ve ark. (1992) 128 pişmiş tavuk etinin 3'ünde (%2.3) *C. perfringens*'e rastlamışlardır.

Fukushima ve ark. (1987) 120 tavuk etinin 13'ünden (% 10.8) *C. perfringens* izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Guang-Hua ve Xia-Ling (1994) yaptıkları bir araştırmada Pekin'de tüketime sunulan 16 piliç karkasının 14'ünde (% 88) ve 10 kızartılmış tavuk örneğinin 2'sinden (% 20) *C. perfringens* saptamışlardır.

Kontaminasyon düzeyine ilişkin olarak yapılan bir çalışmada Hatheway ve Farmer (1991) Kanada'da tüketilen hindi etinin $10^5$>kob/g düzeyinde *C. perfringens* ile kontamine olduğunu kaydetmişlerdir. .

ABD'nin Massachusetts eyaletinde yapılan çalışmada marketlerde satışa sunulan kanatlı etlerinden alınan örneklerde *C. perfringens*'in %26 oranında izole edildiği ve hindi etinden alınan örneğin kontaminasyon düzeyinin 42.7 MPN/g olduğu bildirilmiştir (Lin ve Labbe, 2003). Yine ABD'nin Pittsburgh kentinde kasap ve marketlerde satışa sunulan hindi etlerinden alınan örneklerin % 28'inin, tavuk etlerinden alınan örneklerin ise % 38'inin *C. perfringens* ile kontamine oldukları tespit edilmiştir (Wen ve McClane, 2004).

### 1.7.3. Diğer Gıdalarda *C. perfringens*'in Varlığı

Massa ve Iaquierdo (1994) İspanya'nın Barcelona kenti yakınlarındaki 7 kasabanın bar ve lokantalarından topladıkları 476 sıcak ve soğuk meze örneklerinin (yumurtalı, sebzeli, etli ve balıklı gıdalar) % 10.3'ünden *E. coli, S. aureus* ve *C. perfringens* saptadıklarını bildirmişlerdir.

Yürük ve ark. (1996) yaptıkları bir çalışmada 155 sebze konservesinin 20'sinden (% 13), 27 etli konservenin 10'undan (% 37) ve 25 balık konservesinin 3'ünden (% 12) *C. perfringens* izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Saito (1990) incelediği 41 istiridye örneğinin tamamında (% 100) *C. perfringens* saptadığını bildirmiştir.

Yine Saito (1990), Japonya'nın Aichi kentindeki deniz ve nehir sularından aldıkları 15 deniz suyu örneğinin 14'ünden (% 93), 5 nehir suyu örneğinin tamamından (% 100) olmak üzere toplam 20 su örneğinin 19'undan (% 95) *C. perfringens* izole etmiştir.

### 1.8. *C. perfringens*'in Gıdalardan Saptanması ve Tiplendirilmesi

*C. perfringens*'in gıdalardan izolasyon ve identifikasyonu amacıyla değişik yöntem ve besi yerleri geliştirilmiştir. Son yıllarda yapılan metodolojik çalışmalarda DNA hibridizasyonuna dayalı saptama tekniklerinin geliştirilmesinin yanı sıra, klasik kültür tekniklerinin de hız ve duyarlılığının geliştirilmesi yönünde önemli sonuçlar alınmıştır. Bu amaçla *C. perfringens*'in yüksek sıcaklıkta (46 °C) üreyebilme yeteneği üzerine Labbe (1989), Baumgart ve ark. (1990), Schalch ve ark. (1996) ile Baumgart (1997) tarafından önerilen hızlı ve güvenilir yöntem kullanılmaktadır

*C. perfringens* doğada yaygın olarak ve özellikle de çiğ gıda ve gıda içeriklerinde bulunmaktadır. Bazı durumlarda çok az sayıda etken ile kontamine gıda ve su örneklerinde *C. perfringens*'in kontaminasyon düzeyinin belirlenmesinde zenginleştirme işlemine dayalı klasik kültür yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır (Labbe ve Harmon, 1992; Rhodehamel ve Harmon, 1998). Zenginleştirme işleminde kullanılan besi yerleri aşağıda verilmiştir.

- Chopped Liver Broth
- Trypticase Pepton Glucose Yeast Extract Broth (TPGY)
- Lactose Sulphite Medium (LS)
- Rapid Perfringens Medium (RPM)
- Perfringens Enrichment Medium (PEM:Fluid Thioglycollate Medium + D-cycloserine)
- Iron Milk Medium

*C. perfringens*'in izolasyon amacıyla kullanılan bazı katı besi yerleri:

- Sulphite–Polymyxin–Sulphadiazine (SPS) Agar
- Tryptone–Sulphite–Neomycin (TSN) Agar
- Shaidi–Ferguson–Perfringens (SFP) Agar
- Oleandamycin–Polymyxin–Sulphadiazine Perfringens (OPSP) Agar
- Blood Free Pyruvate Clostridium Perfringens (BCP) Agar

- Tryptose Sulphite Cycloserine Egg Yolk (TSC) Agar
- Trytose Sulphite Cycloserine (TSC) Agar
- Sulphite Cycloserine Azid (SCA) Agar
- Bizmuth Iron Sulphite Cycloserine (BISC) Agar

*C. perfringens*'in izolasyonu amacıyla kullanılan zenginleştirme besi yerlerinden RPM; Neomycin ve Polymyxin B Sulphate, PEM'de D-cycloserine gibi suplementler içerdiğinden gıdalarda *C. perfringens* dışındaki bazı anaerob veya fakültatif anaerobların gelişimi engellenmektedir (Labbe, 1989; Labbe ve Harmon, 1992). Zenginleştirme işlemi 46 °C'de 20 saat gibi kısa bir inkübasyon süresinde anaerob koşullarda gerçekleşmektedir. Muhtemel *C. perfringens* varlığında tüplerde laktoz fermentasyonu sonucunda bulanıklık ve gaz oluşmaktadır (Labbe, 1989; Baumgart ve ark., 1990; Labbe ve Harmon, 1992; Baumgart, 1997).

Son yıllarda *C. perfringens*'in izolasyon ve identifikasyonunda egg yolk içermeyen Tryptose Sulphite Cycloserine (TSC) agar tercih edilmektedir. Bu besi yerinde ferric ammonium citrate ve sodium metabisulphite yer aldığından diğer katı besi yerlerinden farklılık göstermektedir. Sülfit bakteri tarafından sülfide indirgenir. Besi yerindeki demir III amonyum sitratın demir sülfid oluşturmasına bağlı olarak siyah koloniler meydana gelmektedir. Ayrıca TSC agara *Clostridium*'lar dışında sülfid indirgeyen bakterilerin inhibe edilmesi amacıyla D-cycloserine ilave edilmesinin gerekli olduğu bildirilmiştir (Hauschild ve Hilsheimer, 1974; Banwart, 1979; Labbe, 1989; Labbe ve Harmon, 1992).

Counterimmunoelektroforez çok sayıda örneğin CPE yönünden belirlenmesinde kullanılan en eski analiz yöntemlerinden birisi olup CPE belirlemede duyarlı testlerin ELISA ve Reverse-Passive Latex Aglutination Assay (RPLA) olduğu bildirilmiştir(McClane, 1992). CPE saptamada ELISA testinin RPLA'ya göre daha iyi sonuç verdiği *C. perfringens*'in *cpe* geninin tespitinde PCR tekniği başarıyla uygulandığı bildirilmiştir(Mear ve Songer, 1997; Yamagishi ve ark., 1997).

Gıdalarda *C. perfringens*'in izolasyon ve identifikasyonunda DNA hibridizasyonu kullanılmakta olup bu hızlı yöntemler içerisinde PCR tekniğinin gıdalardan 10 kob/g dan daha düşük düzeydeki *C. perfringens*'in saptanmasında başarıyla kullanıldığı bildirilmiştir (Wang ve ark., 1994; Baez ve ark., 1995; Miwa ve ark., 1996). Gıdada ve hastalarda aynı suşun varlığının identifikasyonunda ve şuşlar arası yakınlığın saptanmasında Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) kullanılmaktadır (Ridel ve ark., 1998). *C. perfringens* şüpheli gıda infeksiyonlarının teşhisinde ve serotiplendirilmesinde Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) yönteminin de hızlı ve hassas bir yöntem olduğu bildirilmiştir (McLauchlin ve ark., 2000).

### 1.9. Korunma ve Kontrol

*C. perfringens*'in neden olduğu gıda infeksiyonlarından korunma ve kontrolünde dikkat edilmesi gereken hususlar aşağıda belirtilmiştir (Frazier ve Westhoff, 1988; Labbe, 1989; Erol, 1999a).

- Kasaplık hayvanlar sağlıklı koşullarda yetiştirilmeli, uygun hijyenik ve teknolojik koşullarda kesilmelidir.
- Karkas ve çiğ kanatlı etlerinin çevresel kaynaklardan kontaminasyonunu önleyecek tedbirler alınmalıdır.
- Gıdalar iyice pişirilmeli, sıcak gıdalar servis öncesi 60°C'nin üzerinde tutulmalı veya hemen soğutulmalı (10°C'nin altında), mümkünse pişirildikten hemen sonra tüketilmelidir.
- Gıdaların 15 – 65°C'lerde özellikle 25 – 50°C'ler arasında uzun süre tutulması önlenmelidir.
- Yeniden ısıtılacak pişmiş ve donmuş gıdalardaki vejetatif formların tüketilmeden önce yok edilmesi için iç sıcaklığı 74°C olacak şekilde (74 – 100°C) hızlı ısıtma işlemi uygulanmalıdır.

- Gıdaların pişirme ve soğutma işlemleri tercihen küçük porsiyonlar halinde yapılmalıdır.
- Gıdaların oda sıcaklığında tutulması ile donmuş gıdaların oda sıcaklığında çözündürülmeleri önlenmelidir.

Pişirilmiş gıdaların çiğ gıdalarla veya kirli çalışma yüzey ve alet-ekipmanla çapraz kontaminasyonu önlenmelidir. Mutfak ve personel hijyenine özen gösterilmelidir.

Restoranlarda ve gıda üretimi yapan işletmelerdeki kritik noktalarda uygulanan ve kurallarına uygun temizlik ve dezenfeksiyon işleminin *C. perfringens* kaynaklı gıda infeksiyonlarının kontrolündeki en uygun ve etkin yol olduğu bildirilmiştir (Granum ve Magnussen, 1987).

# 2.GEREÇ VE YÖNTEM

## 2.1.Gereç

Bu çalışma kapsamında Aralık 2003-Ağustos 2004 tarihleri arasında değişik firmalar tarafından Ankara'da tüketime sunulan 100 hindi kıyması (en az 200' er g) örneği materyal olarak kullanılmıştır.

### 2.1.1. *C. perfringens*'in izolasyon ve identifikasyonunda kullanılan besi yerleri ve ayıraçlar:

**Perfringens Enrichment Medium (PEM:Fluid Thioglycollate Medium) (Baumgart, 1997)**

**Bileşimi**

| | |
|---|---|
| Pepton casein | 15.0 g |
| Yeast extract | 5.0 g |
| Sodium chloride | 2.5 g |
| L (+) cystine | 0.5 g |
| Sodium thioglycollate | 0.5 g |
| Distile su | 1000 ml |
| pH | 7.1 ± 0.2 |

**Hazırlanışı**

Hazırlanan karışım 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra 50 °C'ye kadar soğutuldu. 500 ml hazırlanarak soğutulan PEM'e steril olarak 1 vial Perfringens (TSC) Supplement (Oxoid SR 88E) ilave edilerek karıştırıldı.

**Perfringens (TSC) Supplement (Oxoid SR 88E)**

Vial içeriği (her bir vial 500 ml besi yeri için standart olarak hazırlanmıştır):
D-cycloserine 200 mg

**Tryptose Sulphite Cycloserine (TSC) Agar (Oxoid CM 587)**

Hazır TSC agardan 23 g tartılarak 500 ml distile su içerisinde çözündürülüp sıcak su banyosu içerisinde tamamen eritildi. 121 °C'de 10 dakika otoklavda sterilize edilen besi yeri 50 °C'ye kadar soğutuldu. Bu sıcaklıkta hazırlanan besi yeri içerisine steril olarak Perfringens Supplement (TSC) (Oxoid SR 88)'den 1 vial 2 ml steril distile suda eritilip ilave edilerek karıştırıldı. Daha sonra steril petrilere 12 – 13 ml döküldü.

**Columbia Blood Agar Base (Oxoid CM 331)**

Bu hazır besi yerinden 39 g alınarak 1 litre distile suda çözündürüldü ve sıcak su banyosunda tamamen eritildi. 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra 50 °C kadar soğutuldu ve üzerine % 7'lik steril defibrine koyun kanı ilave edildi. Besi yeri steril petrilere dökülerek hazırlandı.

**Lactose Gelatin Medium (Baumgart, 1997)**

**Bileşimi**

| | |
|---|---|
| Pepton casein | 15.0 g |
| Yeast extract | 10.0 g |
| Lactose | 10.0 g |
| $Na_2HPO_4$ | 5.0 g |
| Phenol red (% 1'lik çözeltisi) | 5 ml |
| Gelatine | 120 g |
| Distile su | 1000 ml |
| pH | 7.5 ± 0.2 |

**Hazırlanışı**

Jelatin hariç diğer bileşenler 1 litre suda çözündürülüp pH değeri 7.5'e ayarlandı. Daha sonra jelatin ilave edilerek su banyosunda eritildi. 16 x 150 mm tüplere 10'ar ml konularak 121 °C'de 15 dakika otoklav edildi.

**Motility Nitrate Medium, Buffered (Sigma M 0928)**

Hazır besi yerinden 23.5 g tartılarak 1 litre distile suda çözündürüldü ve 5 ml gliserin ilave edildi. pH değeri 7.3 ± 0.1'e ayarlandıktan sonra sıcak su banyosunda iyice eritildi. Daha sonra 16 x 150 mm tüplere 11 ml paylaştırılarak 121 °C'de 15 dakika otoklav edildi. Besi yeri 4 saat içinde kullanılmadığı durumlarda, sıcak su banyosunda 10 dakika tutulup, soğuk su içerisinde katılaştırıldıktan sonra kullanıldı.

| **Griess Ilosvay Solusyonu (A)** | | **Griess Ilosvay Solusyonu (B)** | |
|---|---|---|---|
| Sulfanilic acid | 0.8 g | α-naphthylamine | 0.5 g |
| Acetic acid 5 M | 100 ml | Acetic acid 5 M | 100 ml |

**Asit Fosfataz Testi**

**Fosfataz Ayıracının Bileşimi (Baumgart, 1997)**

| | |
|---|---|
| 1 Naphtyl phosphate sodium salt (Merck 6815) | 0.2 g |
| Fast Blue Salt B (Merck 3191) | 0.4 g |

**Hazırlanışı**

Yukarıdaki maddeler 10 ml 0.2 M sodyum sitrat buffer içerisinde çözündürülüp pH 4.5'e ayarlandı. 1 saat 4 °C'de bırakıldıktan sonra membran filtrasyon tekniği ile filtre edildi. Kullanılmak üzere buzdolabında 3 haftaya kadar muhafaza edildi.

**Sodium Citrate Buffer Hazırlanışı (Baumgart, 1997)**

9.882 g trinatrium citrate x 2 $H_20$ 20 ml NaOH'de (1 mol/l) çözündürüldükten sonra distile suyla 100 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 2:1 oranında 1 M HCl ile karıştırıldı.

**Katalaz Test**

% 3'lük hidrojen peroksit ($H_2O_2$) (Merck 8597) ile yapıldı.

**Gas Generating Kit (Oxoid B 38)**

**Test Suşu**

Reverse-CAMP testinde belirleyici mikroorganizma olarak Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı'ndan temin edilen *Streptococcus agalactiae* (Ref.No.: 55118 Inst.Pasteur) suşu kullanıldı.

**2.1.2. *C. perfringens* Enterotoksin Geni (*cpe*) tespitinde kullanılan PCR malzemeleri**

***Taq* DNA Polymerase**

500µ , EP0402, 3 ml.'lik 10x PCR Buffer , 3 ml.'lik 10x PCR Buffer $(NH_4)_2$ $SO_4$ solüsyonuyla birlikte, 3 ml. 25 mM Mg $Cl_2$ Solüsyonu (Fermentas,Litvanya).

**dNTP Set**

4x0.25 µmol, R0181, 100 mM'lük dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Fermentas,Litvanya).

**Gene Ruler**

100bp DNA Ladder Plus, SM0321, 0,05 mg 1ml.'lik 6x Loading dye (Fermentas, Litvanya).

**Primerler (Meer ve Songer, 1997; Lin ve Labbe, 2003)**

Primer – I (5'-GGAGATGGTTGGATATTAGG) (Thermo)
Primer – II (5'-GGACCAGCAGTTGTAGATA) (Thermo)

**Agarose-Basica LE, Prona**

**Titriplex II (EDTA Sodium Salt)**
MERCK 1.08417.0250

**Borik Asit**, MERCK 1.12015.0500

**Ethidium Bromid** (%1'lik Solusyonu, Elektroforez için)
MERCK 111608

**Tris-Hydroxymethylaminomethane**
MERCK 1.01549.0500

**TBE Solusyonu**

| | |
|---|---|
| **T**ris | 54.5 g |
| **B**orik asit | 27.8 g |
| **E**DTA (Titriplex II) | 2.9 g |

**Hazırlanışı**

Yukardaki maddeler 1 litre distile su içerisinde iyice çözündürüldü. Bu stok solüsyondan 200 ml alınıp 1 litreye tamamlanıncaya kadar üzerine distile su eklenerek kullanıma hazır 1xTBE elde edildi.

**Agaroz Jel (%1.5'lik)**

| | |
|---|---|
| Agarose | 4.5 g |
| TBE | 300 ml |

**Hazırlanışı**

Yukarıdaki maddeler karıştırılıp su banyosunda eriyinceye kadar tutuldu. Hazırlanan agarose jel 1µl/ml oranında ethidium bromid ile boyandı.

## 2.2.Yöntem

Aseptik koşullarda termoslu kaplara alınan 200'er gram kıyma örnekleri soğuk zincir altında laboratuvara getirildikten hemen sonra *C. perfringens* yönünden analiz edildi. Kıyma örneklerinde *C. perfringens*'in varlığı, Labbe (1989), Baumgart ve ark. (1990), Schalch ve ark. (1996) ile Baumgart (1997) tarafından önerilen yönteme göre tespit edildi. Yöntem gereğince kıyma örnekleri aşağıda açıklandığı üzere sırasıyla zenginleştirme işleminden sonra katı besi yerine geçildi ve kolonilerin değerlendirilmesi yapıldı (Şekil 2.1). *C. perfringens*'in identifikasyonu için Çizelge 2.1'de verilen testler uygulandı. Elde edilen izolatlar PCR analizi ile *cpe* tespiti için Cooked Meat Medium 'da saklandı. İzolatlarda *cpe* geninin tespiti Lin ve Labbe (2003) tarafından önerilen PCR tekniği ile yapıldı.

**Çizelge 2.1.** *C. perfringens*'in identifikasyonu için kullanılan testler (Labbe, 1989; Schalch ve ark., 1996; Baumgart, 1997).

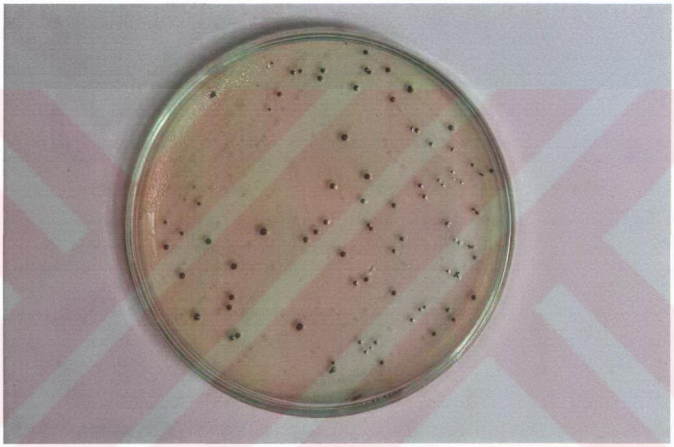
| Etken | Gram boyama | Katalaz | Reverse-CAMP test | Asit fosfataz | Hareket | Nitrat | Laktoz | Jelatin |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *C.perfringens* | + | - | + | + | - | + | + | + |

### 2.2.1.Zenginleştirme

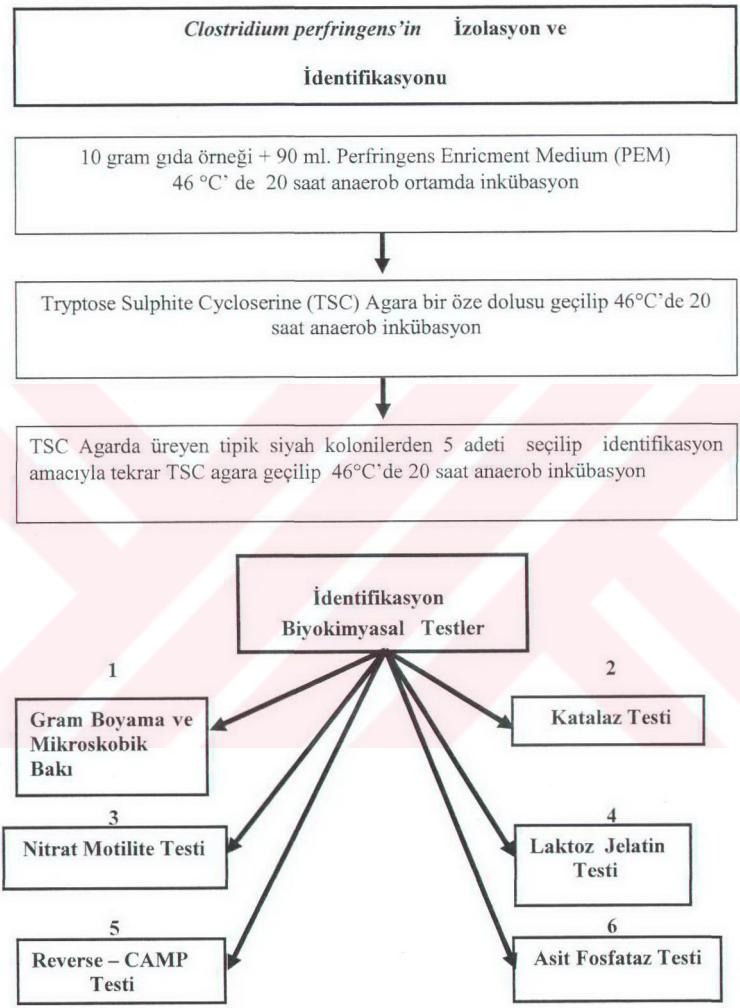
Homojenize edilen her bir örnekten 10 gram içinde 90'ar ml Perfringens Enrichment Medium (PEM: Fluid Thioglycollate Medium + Perfringens (TSC) Supplement Oxoid SR 88E) bulunan steril kavanozlara ilave edildi (10 g numune + 90 ml PEM). Kavanozların üzerleri steril parafin ile kapatılarak 46 °C'de 20 saat süre anaerob koşullarda inkübe edildi

### 2.2.2.Katı Besi Yerine Ekim

Zenginleştirme sonrası gaz ve bulanıklık oluşan kavanozlardan bir öze dolusu homojenat alınarak Tryptose Sulphite Cycloserine (TSC) agar (Oxoid CM 587) yüzeyine çizme plak yöntemi ile ekim yapıldı ve plaklar anaerob koşullarda (Gas generating kit Oxoid BR 38) 46 $^{o}$C'de 20 saat inkübe edildi(Resim 2.1).



**Resim 2.1.***C. perfringens* kolonilerinin TSC agardaki tipik görünümü.




**Şekil 2.1.** *C. perfringens*'in izolasyon ve identifikasyon şeması

### 2.2.3.*C. perfringens*'in İdentifikasyonu

TSC agarda 46 °C'de anaerob koşullarda 20 saat inkübasyon sonucunda üreyen yaklaşık 2–4 µm çapındaki siyah renkli *C. perfringens* şüpheli kolonilerden (Resim 2.1) 3–5'i seçilerek identifikasyon için TSC agara geçildi ve plaklar 46 °C'de anaerob koşullarda 20 saat inkübasyona bırakıldı. Bu işlem sonunda Çizelge 2.1'deki biyokimyasal testler yapılarak *C. perfringens*'in identifikasyonu gerçekleştirildi. Test sonuçlarına göre Gram pozitif, katalaz negatif, laktoz pozitif, jelatin pozitif, hareket negatif, nitrat pozitif, reverse–CAMP testi pozitif ve asit fosfataz testi pozitif reaksiyon veren koloniler *C. perfringens* olarak değerlendirildi.

#### 2.2.3.1.Gram Boyama ve Mikroskobik Bakı

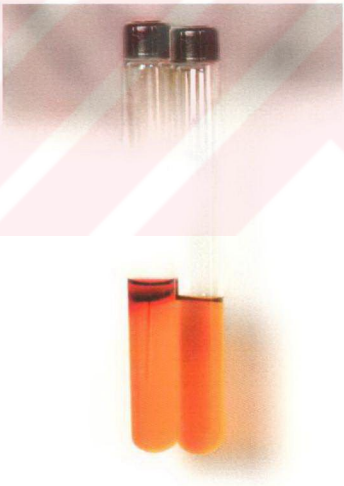
Şüpheli *C. perfringens* kolonilerden Gram boyama yapıldı. Mikroskobun (YS2- H Nikon, Japan) immersiyon objektifinde mavi-menekşe renkli yuvarlak çubukçuk formunda görülen mikroorganizmalar Gram pozitif olarak değerlendirildi.

#### 2.2.3.2.Katalaz Test

Bu amaçla, % 3'lük $H_2O_2$ solusyonundan bir öze dolusu bir lam üzerine alınarak, üzerine öze yardımı ile şüpheli *C. perfringens* kolonisinden konulup karıştırıldı. 1 – 2 sn içerisinde köpürme şeklindeki gaz oluşumunun görülmemesi katalaz negatif olarak değerlendirildi.

### 2.2.3.3.Nitrat Motilite Testi

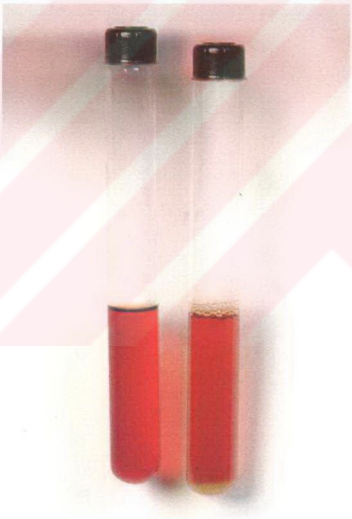
TSC agardan alınan şüpheli koloniler içerisinde 11'er ml Motility Nitrat Medium bulunan tüplere inokule edilerek 35 – 37 °C'de 24 saat aerob koşulda inkübe edildi. Yalnızca inokulum yapılan hatta meydana gelen üreme hareket negatif olarak değerlendirildi. Aynı besi yerine nitrat ayıracının (0.2 ml Griess A + 0.2 ml Griess B) damlatılmasından 15 dakika sonra kırmızı veya menekşe rengin oluşumu nitratın nitrite indirgendiğini gösterdiğinden nitrat pozitif, herhangi bir renk oluşmaması nitrat negatif olarak değerlendirildi. Renk oluşmaması durumunda bir miktar çinko tozu ilave edilerek kırmızı renk oluşumu ile nitratın indirgenmediği belirlendi (Resim 2.2) (Labbe, 1989; Baumgart ve ark., 1990; Schalch ve ark., 1996; Baumgart, 1997).



**Resim 2.2.** Nitrat motilite testi

### 2.2.3.4.Laktoz Jelatin Testi

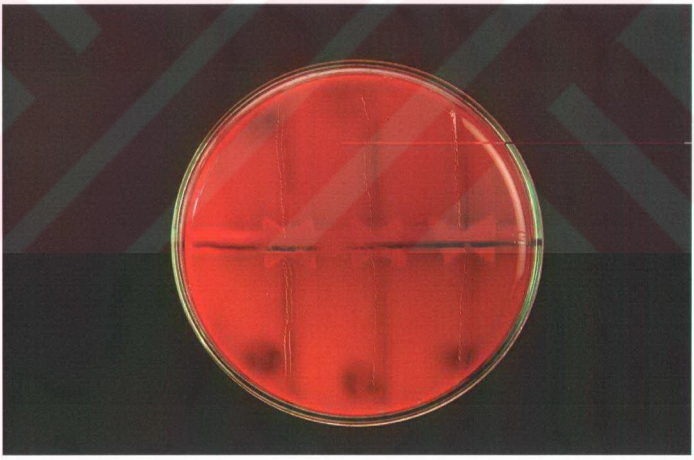
İçerisinde 10'ar ml laktoz jelatin medium bulunan tüplere şüpheli koloniler inokule edilerek 35 – 37 °C'de 24 – 48 saat aerob koşulda inkübe edildi. Gaz kabarcıklarının meydana gelmesi ve kırmızıdan sarıya renk değişikliğinin oluşması laktoz pozitif olarak değerlendirildi. İnkübasyondan sonra (35 – 37 °C'de 24 – 48 saat) tüpler 5°C'de 1 saat bekletildiğinde jelatin sıvı halde ise pozitif olarak değerlendirildi (Resim 2.3) (Labbe, 1989; Baumgart ve ark., 1990; Schalch ve ark., 1996; Baumgart, 1997).



**Resim 2.3.**Laktoz fermentasyon ve Jelatini sıvılaştırma testi

### 2.2.3.5.Reverse-CAMP Testi

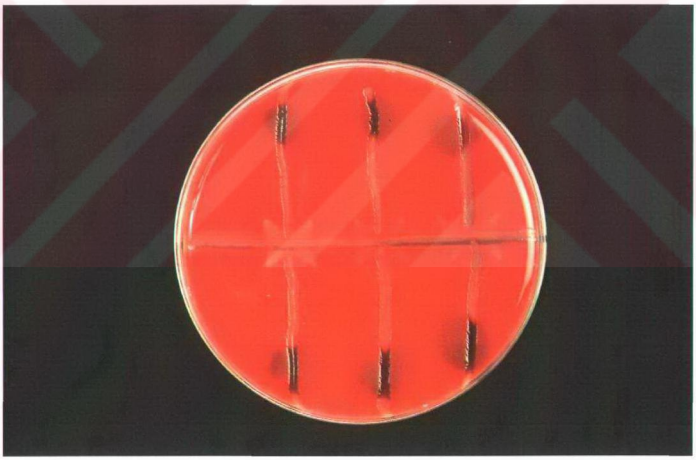
Bu test için *Str.agalactiae* (Ref.No.: 55118 Inst.Pasteur) suşu belirleyici mikroorganizma olarak kullanıldı. Columbia Blood Agar'ın (CBA) ortasına referans *Str.agalactiae* suşu bir hat şeklinde geçildi. Şüpheli *C. perfringens* şuşları birbirine paralel 2 cm aralıklarla ve geçilen *Str.agalactiae*'den 1 mm uzaklıkta dikey olarak geçildi ve 37 $^{o}$C'de 24 saat anaerob ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda referans suşa yakın yerde yarım ay şeklindeki zon reverse–CAMP testi pozitif olarak değerlendirildi(Resim 2.4) (Baumgart ve ark., 1990; Schalch ve ark., 1996; Baumgart, 1997).



**Resim 2.4.** Reverse-CAMP testi

### 2.2.3.6.Asit Fosfataz Testi

Daha önceden 37 °C'ye ısıtılmış fosfataz ayıracından birkaç damla reverse-CAMP testinden hemen sonra Columbia Blood Agar (Oxoid CM 331) üzerindeki seçilen kolonilere damlatıldı. Kolonilerin 3 dakika içerisinde kahverengi-menekşe renge dönüşmesi pozitif olarak değerlendirildi (Resim 2.5) (Schalch ve ark., 1996; Baumgart, 1997).



**Resim 2.5.** Asit fosfataz testi

### 2.2.4. PCR ile *cpe* Tespiti

Elde edilen *C. perfringens* izolatlarında *cpe* geninin tespiti Lin ve Labbe (2003) tarafından önerilen PCR tekniği ile yapıldı. İzolatlar, Fluid Thioglycollate Medium'da 37 °C'de 18-20 saat inkübe edilerek zenginleştirildi. Kütürden 1ml alınarak 5000 devirde 15 dakika santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5417R) edildi. Dipte kalan tortu iki kez steril bidistile su ile yıkanıp süspanse edildikten sonra tekrar santrifüj işlemine tabi tutuldu. Süpernatant, 200 µl steril bidistile su ile süspanse edildi ve 94 °C 'deki su banyosunda (Memmert WB/OB 7-45, WBU 45) 20 dakika bekletilip buz parçacıkları içine yerleştirildi. Toplam 50 µl'lük PCR volümu: 10 µl hedef DNA , 5 µl *Taq* DNA polimeraz buffer, 1 µl Primer-I, 1 µl Primer-II, 4 µl dNTP mix (her birinden 0.2 mM), 4 µl (1.5 mM) Mg $Cl_2$ Solüsyonu, 0.5 µl *Taq* DNA polimeraz ve 24.5 µl steril bidistile sudan oluşturuldu. Daha sonra tüpler amplifiye edilmek amacıyla Thermal Cycler ( Biometra Personal Cycler)'a yerleştirildi. Thermal Cycler'da 94 °C'de 1 dakika, 55 °C'de 2 dakika, 72 °C'de 3 dakika 30 siklus, 72 °C'de 4 dakika daha tutulduktan sonra 4 °C'de muhafaza edildi. Örneklerin herbiri 2 µl phicol brom phenol blue ile boyandı. Örnekler, pozitif kontrol, negatif kontrol ve DNA Marker'ın herbirinden 20 µl alınarak daha önceden hazırlanmış olan %1.5 agaroz jeldeki kuyucuklarına yerleştirildi. Elektroforezde (Biometra Agagel Maxi B15359) ethidium bromid ile 1 µl/ml oranında boyanmış TBE solusyonuyla, 80 Volt altında(Güç kaynağı:Biometra Power Pack P25) 30 dakika yürütüldü. Agaroz jel, transilümünatöre (Biometra TI1 UV 9511011) taşınarak DNA Marker'ın yardımı ve *cpe*'nin 233-bp'lik DNA fragmenti UV ile gözlenerek değerlendirmeye alındı.

# 3. BULGULAR

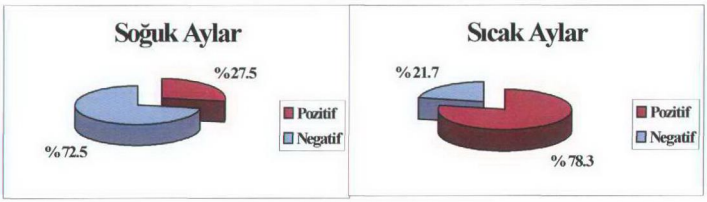
Bu çalışmada, Aralık 2003-Ağustos 2004 tarihleri arasında Ankara'da tüketime sunulan değişik firmalara ait 100 hindi kıyması örneğinde *Clostridium perfringens*'in varlığı belirlenmiştir. Analiz bulguları sonucunda, toplam 100 hindi kıyması örneğinin 58'inden (%58.0) *C. perfringens* izole ve idendifiye edilmiştir. Elde edilen izolatların hiçbirisinin *cpe* geni taşımadığı yapılan PCR analizi sonucu saptanmıştır.

*C. perfringens* 'in varlığının yanı sıra mevsimsel farklılıktan kaynaklanan olası insidens farkını ortaya koyabilmek amacıyla bu çalışma, Aralık 2003 – Ağustos 2004 tarihlerini kapsayan periyot içinde yapılmıştır. Bu çerçevede; soğuk aylarda (Aralık – Mart) alınan 40 örneğin 11'inden (%27.5), sıcak aylarda (Mayıs – Ağustos) alınan 60 örneğin 47'sinden (%78.3) *C. perfringens* izole ve identifiye edilmiştir (Çizelge 3.1; Grafik 3.1,2). Her bir dönemde incelenen örnek sayıları baz alınarak *C. perfringens* saptanan örnek sayılarının değerlendirilmesi sonucunda mevsime bağlı sıcaklık artışına paralel olarak *C. perfringens*'in izolasyon ve identifikasyonunda artış olduğu tespit edilmiştir

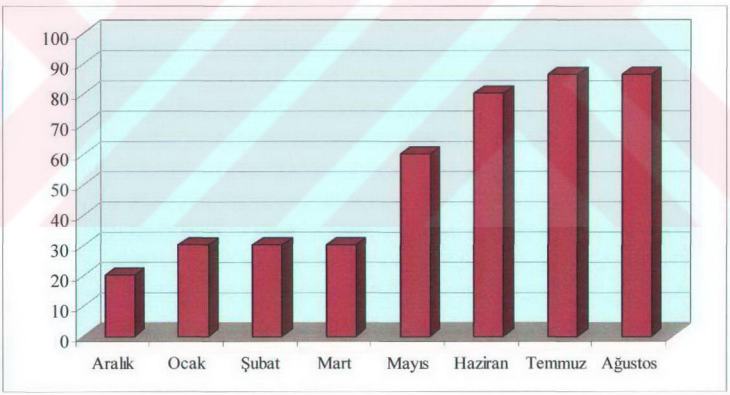
**Çizelge 3.1.** Ankara'da tüketime sunulan hindi kıymalarından izole edilen *C. perfringens*'in mevsimsel dağılımı

| Örneklerin Alındığı Aylar | Örnek Sayısı (n) | Pozitif Örnek Sayısı | Yüzde Değerleri |
|---|---|---|---|
| Sıcak Aylar (Mayıs,Haziran, Temmuz,Ağustos) | 60 | 47.0 | %78.3 |
| Soğuk Aylar (Aralık,Ocak, Şubat,Mart) | 40 | 11.0 | %27.5 |
| Toplam | 100 | 58.0 | %58.0 |

**Grafik 3.1.** Ankara'da tüketime sunulan hindi kıymalarından izole edilen *C.perfringens*'in mevsimsel dağılımı.




**Grafik 3. 2.** Ankara'da tüketime sunulan hindi kıymalarından izole edilen *C.perfringens*'in aylara göre yüzde değerleri.



# 4. TARTIŞMA

Ankara'da Aralık 2003 – Ağustos 2004 tarihlerini kapsayan periyot içinde tüketime sunulan toplam 100 hindi kıyması örneğinde *C. perfringens*'in varlığı ve elde edilen izolatların *cpe* geni yönünden PCR ile incelendiği bu çalışmada, toplam 58 (%58.0) örnekte *C. perfringens* saptanmıştır.

Bu çalışma sonuçlarını teyit eder şekilde Ali ve Fung (1991) yapmış oldukları çalışmada ABD'de satışa sunulan 55 hindi kıyması örneğinin 31'inden (%56.0) *C. perfringens* izole etmişlerdir. Wen ve McClane (2004) yine aynı ülkede market ve kasaplarda satışa sunulan bir kısmı ısı işlemi görmüş 68 hindi eti örneğinin 19'unda (%28.0) *C. perfringens* saptadıklarını bildirmişlerdir. Wen ve McClane'nin (2004) bulmuş oldukları oranın bu çalışma sonuçlarından düşük olmasında sözkonusu çalışmadaki bazı örneklerin ısı işlemi görmüş olmasıyla açıklanabilir. Yapılan çalışmalarda ülkemizde, kesimhane ve et işletmelerinin sanitasyon ve hijyenik koşullarının yeterli düzeyde olmadıkları, etlerin çekilmesi, karıştırılması ve parçalanması işlemleri sırasında satırların, bıçakların, tezgahların ve çalışan personelin özellikle kıymaların çapraz kontaminasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Tekinşen ve ark., 1980; Kalkan, 1993).

Yapılan litaratür taramalarında diğer kanatlı et ve ürünlerinde *C. perfringens*'in varlığına yönelik araştırmalarda elde edilen sonuçların da bu çalışmayı teyit eder şekilde olduğu tespit edilmiştir. Ülkemizde, Çakmak ve ark. (2004) tarafından yapılan çalışmada kanatlı kesimhanelerinden alınan 40 tavuk kıyması örneğinden 28'inde (%70.0) , Craven (2001) piliç karkaslarından almış olduğu örneklerin %67.0'sinde, benzer şekilde Miwa ve ark.(1998) Japonya'da satışa sunulan tavuk etlerinden alınan 50 örneğin 42'sinde (%84.0) *C. perfringens* saptadıklarını bildirmişlerdir.Bu çalışma ve diğer araştırıcıların bulgularından farklı olarak Kalinowski ve ark.(2003) ABD'de satışa sunulan 154 hindi kıyması örneğinde spor formunda *C. perfringens* tespit edememişlerdir.

Bu çalışmada, toplam 58 pozitif hindi kıyması örneğinde *C. perfringens* izolasyon oranının sıcak aylarda (Mayıs 2004 – Ağustos 2004) %78.3 , soğuk aylarda (Aralık 2003 – Mart 2004) % 27.5 bulunması nedeniyle mevsimsel etkinin önemi de ortaya koyulmaktadır. Ülkemizde kırmızı et ve kanatlı et ürünlerinin sıcak yaz aylarında hijyenik kalitesinin önemli ölçüde düştüğü çeşitli araştırıcılar tarafından saptanmıştır. Bu çalışma bulgularını teyit eder biçimde Çakmak ve ark.(2004) kanatlı kesimhanelerinden haziran – ağustos dönemini kapsayan sıcak aylarda alınan tavuk kıyması örneklerinde *C. perfringens* izolasyonunun ekim-aralık dönemine göre (%67.9 - %32.1) daha fazla olduğunu saptamışlardır. Diğer bir çalışmada Ankara'nın değişik semtlerindeki market ve kasaplardan haziran-eylül aylarında alınan sığır kıymalarının % 67.3'ünün *C. perfringens* ile kontamine olduğu saptanmıştır (Çakmak ve Erol, 2002).Aynı şekilde Erol (1999b) Ankara'da tüketime sunulan hazır kıymalarda *Salmonella*'ların varlığı yönünden yaptığı çalışmada, haziran – eylül dönemini kapsayan sıcak aylarda izolasyon oranının daha yüksek olduğunu bildirmiştir.

ABD Tarım Bakanlığı Gıda Güvenliği ve Kontrolü Servisi tarafından (USDA/FSIS) Ocak-Mart 1995 ve Eylül-Kasım 1995 tarihlerini kapsayan soğuk aylarda hindi kıymalarında yapılan örneklemelerde 296 örneğin 82'inde (%28.1) *C. perfringens* izole etmişlerdir. Aynı şekilde hindi etlerinde yapılan örneklemelerde ise *C. perfringens* izolasyon oranlarının Ağustos 1996- Haziran 1997 tarihleri arasında %29.2 ile %42.9 arasında değiştiği bildirilmiştir (Juneja ve Thippareddi, 2004; Anon, 2005).

ABD'de yapılan çalışmada Lin ve Labbe (2002), Massachusetts eyaletindeki market ve kasaplarda satışa sunulan hindi etlerinde 42.7 MPN/g düzeyinde *C. perfringens* ile kontamine olmasına rağmen yapılan PCR analizinde *cpe*'ye rastlamamışlardır.Aynı ülkedeki benzer bir çalışmada Wen ve McClane (2004) Pittsburg'daki market ve kasaplarda satışa sunulan 68 hindi eti örneğinde *C. perfringens* izole edilen 19 (% 28.0) örnekte yapılan PCR analizinde 2 (% 1.0) izolatın *cpe* geni taşıdığı saptanmıştır. Aynı çalışmada, toplam 887 et ve et ürünü

örneğininde yapılan PCR analizinde sadece 10 (% 1.4) örnekte *cpe* (+) *C. perfringens* izole edilebilmiştir.

Çeşitli araştırıcılar tarafından yapılan Gen prop, Western immunoblot ve PCR çalışmalarında *C. perfringens* izolatlarının çok küçük bir kısmının (% 1-5) *cpe* geni taşıdığı saptanmıştır ( Songer ve Meer, 1996; Daube ve ark., 1996; Kokai-Kun ve ark., 1994; Van Damme ve ark., 1989).

Bu çalışmada *cpe* yönünden PCR ile analiz edilen örneklerde söz konusu genin saptanamaması Wen ve McClane (2004)'in bulguları ile uyum göstermektedir. Diğer çalışmalarda *cpe* genini saptama düzeyinin oldukça düşük olduğu ve test edilen izolat sayısının bu çalışmadaki izolat sayısına göre çok yüksek olduğu görülmektedir.

# 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, bu çalışmada Ankara'da tüketime sunulan değişik firmalara ait toplam 100 adet hindi kıyması örneğinden 58'nin (%58.0) *C. perfringens* ile kontamine olduğu saptanmıştır. Örneklerin önemli bir bölümünün kontamine olduğu gözönüne alındığında, özellikle sıcak mevsimlerde uygun olmayan muhafaza ve hazırlama koşullarına bağlı olarak hindi kıymasının potansiyel sağlık riski oluşturabileceği düşünülmelidir. Bu durum özellikle çiğ veya yetersiz pişirilmiş hindi kıyma tüketiminin yanında ısıya dirençli *C. perfringens* suşlarından kaynaklanan gıda infeksiyonları yönünden daha da büyük önem kazanmaktadır.

Ülkemizde tüketimi her geçen gün biraz daha artan hindi eti ve ürünlerinden kaynaklanabilecek gıda infeksiyon ve intoksikasyonlardan halk sağlığının korunması ile ekonomik kayıpların azaltılması ; sağlıklı hindi sürülerinin veteriner hekimlerin kontrolünde HACCP konseptinin uygulandığı kesimhanelerde AB normlarına uygun şekilde kesilmesi, sekonder ve çapraz kontaminasyonun önlenmesi, soğuk zincirin sürekliliğinin sağlanması, personelin eğitimi ve tüketicinin bilinçlendirilmesi ile gerçekleştirilebilir.

Ayrıca ülkemizde *C. perfringens* infeksiyonlarının oluşumunda özellikle et ve et ürünlerinin rolü DNA analizlerine dayalı epidemiyolojik çalışmalarla rapor edilip, suşların antibiyotik dirençlilikleri belirlenerek gerekli önlemler alınmalıdır.

# ÖZET


## Hindi Kıymalarında *Clostridium perfringens*'in Varlığı ve İzolatların *cpe* Geni Yönünden PCR İle İncelenmesi

Bu çalışmada, Ankara'da tüketime sunulan hindi kıymalarında *Clostridium perfringens*'in varlığı ve elde edilen izolatlarda *cpe* geninin saptanması amaçlanmıştır. Bu çerçevede Aralık 2003-Ağustos 2004 ayları arasında Ankara'da mevcut değişik marketlerde tüketime sunulan toplam 100 hindi kıyması örneği materyal olarak kullanılmıştır. Örneklerden 60'ı Mayıs-Ağustos , 40'ı Aralık-Mart ayları arasında alınmıştır. Aseptik koşullarda alınan örnekler soğuk zincir altında laboratuara getirilmiştir.

*Clostridium perfringens*'in izolasyon ve identifikasyonu asit fosfataz ve reverse-CAMP testlerini de içeren kültür tekniğiyle, elde edilen *Clostridium perfringens* izolatlarında *cpe* geninin tespiti ise PCR tekniğiyle yapılmıştır.

Analiz bulguları sonucunda toplam 100 hindi kıyması örneğinin 58'inden (%58.0) *Clostridium perfringens*'in izole ve identifiye edilmiştir. Mayıs- Ağustos dönemini kapsayan sıcak aylarda alınan toplam 60 hindi kıyma örneğinin 47'sinde (%78.3), Aralık-Mart dönemini kapsayan soğuk aylarda alınan toplam 40 hindi kıyma örneğinin 11'inde (% 27.5) *Clostridium perfringens* tespit edilmiştir. Elde edilen izolatların hiçbirisinin *cpe* geni taşımadığı yapılan PCR analizi sonucu saptanmıştır.

Sonuç olarak, özellikle sıcak aylarda hindi kıymalarının *Clostridium perfringens* yönünden önemli bir kaynak oluşturabileceği tespit edilmiş olup halk sağlığının korunması için hindi kıymaları uygun hijyenik ve teknolojik koşullar altında üretilmelidir.


**Anahtar Kelimeler:** Hindi kıyma, *Clostridium perfringens*, *cpe*, PCR

## SUMMARY

### Occurrence of *Clostridium perfringens* in Ground Turkey and Investigation of the Isolates for the Presence of *cpe* by PCR

The objective of this study was to determine the occurrence of *Clostridium perfringens* and the presence of *cpe* gene of the isolates in ground turkey samples marketed in Ankara. A total of 100 ground turkey samples were obtained from different markets between December 2003 to August 2004. Sixty of the samples were taken in May to August and 40 of the samples in December to March. The samples were taken aseptically and transported to the laboratory in refrigerated containers and started to test the same day.

The isolation and identification of *Clostridium perfringens* from samples was made using cultural technique and selected biochemical tests, including acid phosphatase and reverse CAMP test. PCR was used for the presence of *cpe* gene in *Clostridium perfringens* isolates.

*Clostridium perfringens* was isolated in 58 (58.0 %) of 100 ground turkey samples tested. *Clostridium perfringens* was detected in 47 of 60 samples (78.3 %) taken in warm months of May to August only in 11 of the 40 samples (27.5 %) taken in cold months of December to March. None of the isolates were identified as carrying the *cpe* gene by PCR.

In conclusion, ground turkey may be considered a significant source of *Clostridium perfringens* primarily in warm months. Therefore, ground turkey should be produced under suitable hygienic and technological conditions for the prevention of public health.


**Key Words :** Ground turkey, *Clostridium perfringens*, *cpe,* PCR.

# KAYNAKLAR


ADAMS, M.R., MOSS, M.O. (1995). *Bacterial agents of foodborne illness*. In: Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry, Cambridge. **p.:** 177-181.

ALI, M.S., FUNG, D.Y.C., KASTNER, C.L. (1991). Comparison of rapid methods for isolation and enumeration of *Clostridium perfringens* in meat. *J. Food Sci.,* **56 (2):** 367-370.

ALI, M.S., FUNG, D.Y.C. (1991). Occurrence of *Clostridium perfringens* in ground beef and ground turkey evaluated by three methods. *J. Food Safety,* **11 (3):** 197-203.

ANADON, A., MARTINEZ, M.R., (1999). Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products: regulatory aspects. *Livestock Product. Sci.* **59:** 183-198

ANDERSSON, A., RO¨NNER, U., GRANUM, P.E. (1995). What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *Int. J. Food Microbiol.*, **28:** 145–156

ANON (1991). Communicable Disease Report. Poultry-associated outbreaks of food poisoing. *CDR Weekly*, **1(52):** 231-234.

ANON (2001a). Devlet Planlama Teşkilatı, Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı, Kanatlı Etleri ve Yumurta Ürünleri Sanayi Alt Komisyon Raporu. http://www.ekutup.dtp.gov.tr/gida/oik646.pdf. (erişim tarihi: 01.03.2004).

ANON (2001b).Anatomy of a foodborne disease oubreak. *Food Protection Update*, **6(1):**1-7

ANON (2001c). Communicable Disease report. General outbreaks of foodborne illness England and Wales: Laboratory reports October to December 2000.,*CDR Weekly*, **11(23).**

ANON (2003a).Turkey summary selected countries. http://www.fas.usda.gov/dlp/circular/2003-10LP/turk_sum.pdf (erişim tarihi:15.03.2004)

ANON (2003b). Broiler summary selected countries. http://www.fas.usda.gov/dlp/circular/2003/03-10LP/poultry.sum.pdf (erişim tarihi:15.03.2004).

ANON (2003c).Centers for Disease Control. 1999 foodborne diseases outbreaks. http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/us_outb/fbo1999/bacterial99b.htm. (erişim tarihi:24.08.2003)

ANON (2003d). Outbreaks traced to USDA-regulated foods, 1990-2000. http://www.cspinet.org/reports/outbreak_alert/appendix_b.htm (erişim tarihi:12.07.2003)

ANON (2004). FAO. Poultry meat products. http://www.fao.org/ag/againfo/subject/en/products. (erişim tarihi:03.03.2005).

ANON (2005). United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Science and Technology, Microbiology Division, May 1996, Nationwide Raw Ground Turkey Microbiological Survey. http://www.fsis.usda.gov/OPHS/baseline/rwgrturk.pdf. (erişim tarihi:18.01.2005).

BAEZ, L.A., JUNEJA, V.K., SACKITEY, S.K. (1995). Detection of *Clostridium perfringens* by polymerase chain reaction. *IFT Annuual Meeting,* **p.:** 251 (Abstr.).

BANERJEE, M., SARKAR, P.K. (2004). Antibiotic resistance and susceptibility to some food preservative measures of spoilage and pathogenic micro-organisms from spices. *Food Microbiol.* **21:** 335-342.

BANU, S., OHTANI, K., YAGUCHI, H., SWE, T., STEWART, T.C., HAYASHI, H., SHIMIZU, T. (2000). Identification of novel VirR/VirS-regulated genes in *Clostridium perfringens. Mol. Microbiol.*, **35 (4):** 854-864.

BANWART, G.J. (1979). Foodborne illness. In: Basic Food Microbiology. AVI Publishing Co., Westport, Connecticut. **p.:** 271-284.

BASSLER, B.L. (1999). How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.*, **2**: 582-587.

BAUMGART, J. (1997). Microbiologische Untersuchung von Lebensmitteln. Behr's Verlag. Hamburg. **p.:** 75-82.

BAUMGART, J., BAUM, O., LIPPERT, S. (1990). Schneller und direkter Nachweis von *Clostridium perfringens. Fleischwirtsch.*, **70 (9):** 1010-1014.

BEAN, N.H., GOULDING,J.S., LOAL, C., ANGULA, F.J. (1996). Surveielance for foodborne-disease outbreaks-United States, 1988-1992. **In:** CDC surveillance summaries (October). *MMWR*, **45** (SS-5).

BILLINGTON, S.J., WIECKOWSKI, E.U., SARKER, M.R., BUESCHEL, D.,SONGER, J.G., McCLANE, B.A. (1998). *Clostridium perfringens* type E animal enteritis isolates with highly conserved silententerotoxin sequences. *Infect. Immun.*, **66:** 4531–4536.

BISPING, W., AMTSBERG, G. (1988). Gram-positive spore forming organisms. In: Colour Atlas for the Diagnosis of Bacterials Pathogens in Animals. Paul Parey Scientific Publishers, (Berlin and Hamburg) **p.:** 89-93.

BOGAARD, A.E., STOBBERINGH, E.E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. *Int. J. Antimic. Agent.*, **14:** 327-335.

BREMNER, A., JOHNSTON, M. (1996). Poultry processing: Domestic fowl, turkeys and ducks. **In:** Poultry Meat Hygiene and Inspection, W.B. Saunders Company Ltd., London, **p.:** 73-94.

BRUNNER, B., EISGRUBER, H. (1996). Überprüfung des Deckelgußverfahrens als Methode zur Isolierung von *Clostridium perfringens* aus Lebensmitteln. *Arch. Lebensmittelhyg.*, **47:** 135-138.

BRYNESTAD, S., IWANEJKO, L.A., STEWART, G.S.A.B., GRANUM, P.E. (1994). A complex array of Hpr consensus DNA recognition sequences proximal to the enterotoxin gene in *Clostridium perfringens* type A. *Microbiology*, **140:** 97–104.

BRYNESTAD, S., GRANUM, P.E. (1999). Evidence that Tn5565, which includes the enterotoxin gene in *Clostridium perfringens*, can have a circular form which may be a transposition intermediate. *FEMS Microbiol. Lett.*, **170:** 281–286.

BRYNESTAD, S., SYNSTAD, B., GRANUM, P.E. (1997). The *Clostridium perfringens* enterotoxin gene is on a transposable element in type A human food-poisoning strains. *Microbiology*, **143:** 2109–2115.

BRYNESTAD, S., SARKER, M.R., McCLANE, B.A., GRANUM, P.E., ROOD,J.I. (2001). The enterotoxin (CPE) plasmid from *Clostridium perfringens* is conjugative. *Infect. Immun.*, **69:** 3483–3487.

BRYNESTAD, S., GRANUM, P.E. (2002). *Clostridium perfringens* and foodborne infections. *Int.J.Food Microbiol.* **74:** 195-202.

BRYAN, F.L. (1988). Risk associated with vehicles of foodborne pathogens and toxins. *J.Food Protect.*, **51:** 498-508.

BRYAN, F.L., DOYLE, M.P. (1995). Health risks and consequenses of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. *J.Food Protect.*, **58 (3):**326-344.

CANARD, B., SAINT-JOANIS, B., COLE, S.T. (1992). Genomic diversity and organization of virulence genes in the pathogenic anaerobe *Clostridium perfringens. Mol. Microbiol.*, **6:** 1421–1429.

CAROLI, G., ARMANI, G., SCIACCA, A., BARGAGNA, M., LEVRE, E. (1977). Two outbreaks of "*Clostridium perfringens*"food poisoning: epidemiological remarks.*Ann. Sclavo.*, **19 (3):** 494-501.

COLLIE, R.E., McCLANE, B.A. (1998). Evidence that the enterotoxin gene can be episomal in *Clostridium perfringens* isolates associated with non-food-borne human gastrointestinal diseases. *J.Clin. Microbiol.*, **36:** 30– 36.

COLLIER, P.W., SHARP, J.C.M., MacCLEOD, A.F., FORBES, G.I., MACKAY, F. (1988). Food poisoning in hospitals in Scotland, 1978-1987. *Epidemiol. Infect.*, **101(3):** 661-667.

CORNILLOT, E., SAINT-JOANIS, B., DAUBE, G., KATAYAMA, S., GRANUM,P.E.,CARNARD, B., COLE, S.T. (1995).The enterotoxin gene (*cpe*) of *Clostridium perfringens* can be chromosomal or plasmidborne. *Mol.Microbiol.*, **15:** 639–647.

CRAVEN, S.E. (2001). Occurence of *Clostridium perfringens* in the broiler chicken processing plant as determinate by recover in iron milk medium. *J.Food Protect.*, **64(12):**1956-1960.

CZECZULIN, J.R., COLLIE, R.E., McCLANE, B.A. (1996). Regulated expression of *Clostridium perfringens* enterotoxin in naturally *cpe*-negative type A, B and C isolates of *C. perfringens. Infect. Immun.*, **64 (8):** 3301-3309.

ÇAKMAK, Ö. (2001). Ankara'da tüketime sunulan sığır kıymalarında *Clostridium perfringens*'in varlığı ve kontaminasyon düzeyinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bil. Enst., Ankara.

ÇAKMAK, Ö., EROL, İ. (2002). Ankara'da tüketime sunulan sığır kıymalarında *Clostridium perfringens*'in varlığı ve kontaminasyon düzeyi. V. Ulusal Mikrobiyoloji Kongresi, 24-26 Eylül 2002, Konya. **s.:** 67.

ÇAKMAK, Ö., BİLİR ORMANCI, F.S., TAYFUR, M., EROL, İ. (2004). Donmuş tavuk kıyma ve hamburgerlerinde *Clostridium perfringens*'in varlığı ve kontaminasyon düzeyi. I. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, 29-30 Eylül 2004, Ankara. **s.:** 195.

DAUBE, G., SIMON, P., LIMBOURG, B., MANTECA, C., MAINIL, J., KAECKENBEECK, A. (1996). Hybridization of 2,659 *Clostridium perfringens* isolates with gene probes for seven toxins (α, β, ε, ι, θ, μ and enterotoxin) and for sialidase. *Am. J. Vet. Res.* **57:** 496-501.

DUNCAN, C.L., STRONG, D.H. (1969). Ileal loop fluid accumulation and production of diarrhea in rabbits by cell-free products of *Clostridium perfringens. J. Bacteriol.*, **100 (1):** 86-94.

EMBORG, H.D.,ERSBOLL, A.K., HEUER, O.E., WEGENER, H.C. (2001). The effect of discontinuing the use of antimicrobial growth promoters on the productivity in the Danish broiler production. *Prevent. Vet. Med.*, **50:** 53-70.

EROL, İ. (1998). Gıda Mikrobiyolojisi Doktora Ders Notları. Ankara Üniversitesi Vet. Fak. Besin Hijyeni ve Tek. Anabilim Dalı, Basılmamış.

EROL, İ. (1999a) Gıda Hijyeni. Ankara Üniversitesi Vet. Fak. Besin Hijyeni ve Tek. Anabilim Dalı, Ankara Üniv. Basımevi.

EROL, İ. (1999b). Ankara'da tüketime sunulan kıymalarda *Salmonella*'ların varlığı ve serotip dağılımı. *Turk J. Vet. Anim. Sci.*, **23:** 321-325.

EROL, İ. (2000). Türkiye'de Hayvan Hareketleri, Kaçak Kesimler, Hayvansal Ürünlerde Gıda Güvenliği ve Halk Sağlığı. Türkiye 2000 Hayvancılık Kongresi. 31 Mart–2 Nisan 2000, Kızılcahamam, Ankara. **s.:** 242-252.

EROL, İ. (2002) Kanatlı ders notları. Ankara Üniversitesi Vet. Fak. Besin Hijyeni ve Tek. Anabilim Dalı, Basılmamış.

EROL, İ. (2004). Kongre kitapçığı önsöz. I. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, 29-30 Eylül 2004, Ankara. **s.:**III.

FRAZIER, W.C., WESTHOFF, D.C. (1988). *Food-borne illness: Bacterial* In: Food Microbiology. McGraw Hill Book Co., Singapore, **p:** 401-427.

FUJIOKA, R.S., SHIZUMURA, L.K. (1985). *Clostridium perfringens*, a reliable indicator of stream water quality. *J. Water Pollut. Control Fed.* **57:**982– 986.

FUKUSHIMA, H., HOSHINA, K., NAKAMURA, R., ITO, Y. (1987). Raw beef, pork and chicken contaminated with *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *Yersinia enterocolitica* and *Clostridium perfringens* comperative study. *Zbl. Bakt. Hyg. B.*, **184:** 60-70.

GILLESPIE, I., LITTLE, C., 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.

GRANUM, P.E., WHITAKER, J.R., SKJELKVA LE, R. (1981). Trypsin activation of enterotoxin from *Clostridium perfringens* type A. *Biochim.Biophys. Acta,* **688:** 325– 332.

GRANUM, P.E., MAGNUSSEN, J. (1987). The effect of pH on hypochlorite as disinfectant. *Int. J. Food Microbiol.*, **4:**183– 186.

GRANUM, P. (1990). *Clostridium perfringens* toxins involved in food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.*, **10:** 101-112.

GROSS, T.P., KAMARA, L.B., HATHEWAY, C.L., POWERS, P., LIBONATI, J.P., HARMON, S.M., ISRAEL, E. (1989). *Clostridium perfringens* food poisoning: Use of serotyping in an outbreak setting. *J. Clin. Microbiol.*, **27 (4):** 660-663.

GUANG-HUA, W., XIAO-LING, Q. (1994). Fleisch und Fleischprodukte aus dem Einzelhandel in Beijing. Vorkommen von *Cl. perfringens, S. aureus, Salmonellen* und *L. monocytogenes. Fleischwirtsch.*, **74 (3):** 326-328.

GUZMAN, A.M.S., MICALIZZI, B., PAGANO, C.E.T., GIMENEZ, D.F. (1990). Incidence of *Clostridium perfringens* in fresh sausages in Argentina. *J. Food Prot.*, **52 (3):** 173-175.

HALL, H.E., ANGELOTTI, R., LEWIS, K., FOTER, M. (1963). Characteristics of *Clostridium perfringens* strains associated with food and food-borne disease. *J. Bacteriol.*, **85:** 1094-1103.

HARMON, S.M., KAUTTER, D.A. (1986). Improved media for sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens. J. Food Protect.,* **49:** 706-711.

HARDY, S.P., PAREKH, N., DENMEAD, M., GRANUM, P.E. (1999). Cationic currents induced by *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in human intestinal CaCO-2 cell. *J. Med. Microbiol.,* **48:** 235–243.

HATHEWAY, C.L. (1990). Toxigenic clostridia. *Clin. Microbiol. Rev.* **3:** 68–98.

HATHEWAY, C.L., FARMER, J.J. (1991). *Clostridium perfringens* or *Klebsiella pneumoniae* as the cause of a foodborne outbreak. *J. Clin. Microbiol.,* **29:** 415-416.

HAUSCHILD, A.H.W., THATCHER, F.S. (1967). Experimental food poisoning with heat-susceptible *Clostridium perfringens* Type A. *J. Food. Sci.,* **32:** 467-471.

HAUSCHILD, A.H.W., HILSHEIMER, R. (1974). Evaulation and modifications of media for enumeration of *Clostridium perfringens. Appl. Microbiol.,* **27:** 78-82.

HAUSCHILD, A.H.W., HILSHEIMER, R., MARTIN, W.G. (1973). Improved purification and further characterization of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Can J. Microbiol.,* **19:** 1379-1382.

HEWITT, J.H., BEGG, N., HEWISH, J., RAWAF, S., STRINGER, M., GANDI, B.T. (1986). Large outbreaks of *Clostridium perfringens* food poisoning associated with the consumption of boiled sommon. *J. Hyg.,* **97:** 71-80.

HOBBS, C.B. ROBERTS, D. (1993). Food Poisoning and Food Hygiene. 6 th ed. Edward Arnold, London, **p.:** 29, 80-127.

HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T., WILLIAMS, S.T. (1994). Genus *Clostridium.* In: Bergeys Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. The Williams–Wilkins Co., Baltimore, **p.:** 15, 560-563.

HUNTER, S.E., BROWN, E.J., OYSTON, P.C.F., SAKURAI, J., TITBALL, R.W. (1993). Molecular genetic analysis of b-toxin of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with a-toxin, g-toxin, and leukocidin of *Staphylococcus aureus. Infect. Immun.*, **61:** 3958–3965.

IWANEJKO, L.A., ROUTLEDGE, M.N., STEWART, G.S.A.B. (1989). Cloning in *Escherichia coli* of the enterotoxin gene from *Clostridium perfringens* type A. *J. Gen. Microbiol.*, **135:** 903–909.

JAVETZ, E., MELNICK, J.L., ADELBERG, E.A. (1987). Review of Medical Microbiology. California: Appleton Lange, **p.:** 208-212.

JAY, J.M. (1992). Food poisoning caused by Gram-positive sporeforming bacteria. In: Modern Food Microbiology USA: AVI Book, **p.:** 479-487.

JOHANSSON, A., GREKO, C., ENGSTROM, B.E., KARLSSON, M. (2004). Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of *Clostridium perfringens* from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes. *Vet. Microbiol.* **99:** 251-257.

JOHNSON, S., GERDING, D. (1997). Enterotoxemic infections. In:Rood, J., McClane, B.A., Songer, J.G., Titball, R.W. (Eds.), The Clostridia*: Molecular Biology and Pathogenesis.* Academic Press, London, **p.** 117– 140.

JOLIVET-REYNAUD, C., POPOFF, M.R., VINIT, M.-A., RAVISSE, P., MOREAU,H., ALOUF, J.E. (1986). Enteropathogenicity of *Clostridium perfringens* b-toxin and other clostridial toxins. *Zb. Bacteriol .Microbiol. Hyg. Suppl.,* **15:** 145– 151.

JUNEJA, V.K., THIPPAREDDI, H., (2004). Inhibitory effects of organic acid salts on growth of *Clostridium perfringens* from spore inocula during chilling of marinated ground turkey breast. *Int. J. Food Microbiol.*, **93 (2):** 155-163.

KALINOWSKI, R.M., TOMPKIN, R.B., BODNARUK, P.W., PRUETT, JR., (2003).Impact of cooking, cooling, and subsequent refrigeration on the growth or survival of *Clostridium perfringens* in cooked meat and poultry products. *J. Food Protect.*, **66:** 1227-1232.

KALKAN, A. (1993). Et satış yerlerinin ve personelinin hijyenik konrolü üzerine araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bil. Enst., Ankara.

KATAHIRA, J., INOUE, N., HORIGUCHI, Y., MATSUDA, M., SUGIMOTO, N.(1997). Molecular cloning and functional characterization of the receptor for *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J. Cell Biol.*, **136:** 1239– 1247.

KATAYAMA, S.I., DUPUY, B., DAUBE, G., CHINA, B., COLE, S.T., (1996).Genome mapping of *Clostridium perfringens* strains with I-Ceu I shows many virulence genes to be plazmid-borne. *Mol. Gen.Genet.* **251:** 720– 726.

KESSEL, A.S., GILLESPIE, I.A., O'BRIEN, S.J., ADAK, G.K., HUMPHREY, T.J., WARD, L.R.(2001). General outbreaks of infectious intestinal disease linked with poultry, England and Wales, 1992-1999. *Commun. Dis. Public Health*, **4 (3):** 171-177.

KOKAI-KUN, J.F.,SONGER, J.G.,CZECZULIN, J.R.,CHEN, F., MCCLANE, B.A.,(1994).Comparison of Western immunoblots and gene detection assays for identification of potentially enterotoxigenic isolates of *Clostridium perfringens.J.Clin. Microbiol.* **32:** 2533-2539.

KOKAI-KUN, J.F., MCCLANE, B.A., (1997). *Enterotoxemic infections*. In: The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis, Eds.: Rood, J., McClane, B.A., Songer, J.G., Titball, R.W.Academic Press, London, **p:** 325–357.

LABBE, R.G., DUNCAN, C.L., (1977). Evidence for stable messenger ribonucleic acid during sporulation and enterotoxin synthesis *by Clostridium perfringens* type A. *J. Bacteriol.* **129:**843– 849.

LABBE, R.G. (1989). *Clostridium perfringens.* In: Foodborne Bacterial Pathogens, Ed.: M.P. Doyle, New York and Basel Marcel Decker Inc., **p:** 191-227.

LABBE, R.G., HARMON, S.M. (1992). *Clostridium perfringens.* In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, Ed.: C. Vanderzant, D.F. Splittstoesser. American Public Health Association, **p.:** 623-632.

LABBE, R.G., (2000). *Clostridium perfringens*. In: Lund, B., Baird-Parker, T., Gould, G. (Eds.), The Microbiological Safety and Quality of Food. Aspen Publishers, MD, USA, **p:**1110– 1135.

LAWRENCE, G., WALKER, P.D. (1976). Pathogenesis of enteritis necroticans in Papua New Guinea. *Lancet,* **1:** 125-126.

LIN, Y., LABBE, R. (2003). Enterotoxigenicty and genetic relatedness of *Clostridium perfringens* isolates from retail foods in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69 (3):** 1642-1646.

LINDSAY, J.A., SLEIGH, R.W., GHITGAS, C., DAVENPORT, J.B. (1985). Purification and properties of an enterotoxin from a coatless spore mutant of *Clostridium perfringens* type A. *Eur. J. Biochem.*, **149:** 287-293.

LOWENSTEIN, M.S. (1972). Epidemiology of *Clostridium perfringens* food poisoning. *J. Med.*, **286:** 1026-1028.

LUKINMAA, S., TAKKUNEN, E., SIITONEN, A.(2002). Molecular epidemiology of *Clostridium perfringens* related to food-borne outbreaks of disease in Finland from 1984 to 1999. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69(8):** 3744-3749.

MAHONY, D.E., CLARK, G.A., STRINGER, M.F., MacDONALD, M.C., DUCHESNE, D.R., MADER, J.A. (1986). Rapid extraction of plasmids from *Clostridium perfringens. Appl. Environ. Microbiol.*, **51 (3):** 521-523.

MASIERO, L., (1993). Nutrional qualities of turkey meat. *World Poultry Misset*, **9(1/2):** 42-43.

MASSA, P.C., IAQUIERDO, J.M. (1994). Microbiological quality of tabas foods served in public bars and restaurants in Cataluna. *Alimenteria,* **31 (252):** 71-74. (Abstr.).

McCLANE, B. (1992). *Clostridium perfringens* enterotoxin: Structure, action and detection. *J. Food Safety,* **12:** 237-252.

McCLANE, B. (1994). *Clostridium perfringens* enterotoxin acts by producing small molecule permeability alterations in plasma membranes. *Toxicology,* **87:** 43-67.

McCLANE, B., HANNA, P.C., WNEK, A.P. (1988). *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Microbiol Pathogenesis,* **4:** 317-323.

McCLANE, B. (1997). *Clostridium perfringens*. In: Doyle, M.P.,Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Washington DC, **p:** 305– 326.

McCLANE, B. (2000). *Clostridium perfringens* enterotoxin and intestinal tight junctions. *Trends Microbiol.*, **8:** 145– 146.

McCLANE, B. (2001). *Clostridium perfringens*, In: M. Doyle, L. Beuchat, T Montville (ed.) Food Microbiology: Fundamentals and frontiers. American Society for Microbiology, Washington D.C. **p :** 351-372.

McDONEL, J.L., DUNCAN, C.L. (1977). Regional localization of activity of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in the rabbit ileum, jejunum and duodenum. *J. Infect. Dis.*, **136:** 661-666.

McDONEL, J.L. (1986). Toxins of *Clostridium perfringens* types A, B, C, D and E. In: Pharmacology of Bacterial Toxins. Ed.: F. Dorner, J. Drews. Oxford: Pergamon Press, **p:** 477-517.

McLAUCHLIN, J.,RIPABELLI, G., BRETT, M.M., THRELFALL, E.J. (2000). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *C. perfringens* for epidemiological typing. *Int. J. Food Microbiol.*, **56:**21-28.

MEER, D.R., SONGER, J.G. (1997). Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *Am. J. Vet.Res.*, **58:** 702– 705.

MELVILLE, S.B., LABBE, R., SONENSHEIN, A.L., (1994). Expression from the *Clostridium perfringens* cpe promoter in *C. perfringens* and *Bacillus subtilis*. *Infect. Immun.*, **62:** 5550– 5558.

MIMS, C.A., PLAYFAIR, J.H.L., ROITT, I.M., WAKELIN, D., WILLIAMS, R., ANDERSON, R.M. (1993). Gastrointestinal tract infections. In: Medical Microbiology Mosby, London. **p:** 11-15.

MIWA, N., NISHINA, T., KUBO, S., ATSUMI, M. (1996). Most Probable Number method combined with nested Polymerase Chain Reaction for detection and enumeration of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in intestinal contents of cattle, pig and chicken. *J. Vet. Med. Sci.*, **59 (2):** 89-92.

MIWA, N., NISHINA, T., KUBO, S., HONDA, H. (1997). Most Probable Numbers of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in intestinal contents of domestic livestock detected by nested PCR. *J. Vet. Med. Sci.*, **59 (7):** 557-560.

MURRELL, T.G.C., EGERTON, J.R., RAMPLING, A., SAMELS, J., WALKER, P.D. (1966). The ecology and epidemiology of the pig-bel syndrome in man in New Guinea. *J. Hyg.*, **64:** 375-396.

NIILO, L. (1986). *Clostridium perfringens* type C enterotoxemia. *Can. Vet. J.*, **29:** 658-664.

NOVAK, J.S., FRATAMICO, P.M. (2004). Evaluation of ascorbic acid as a quorum-sensing analogue to control growth, sporulation, and enterotoxin production in *Clostridium perfringens. J. Food Sci.*, **69 (3):** 72-78.

OHTANI, K., HAYASHI, H., SHIMIZU, T. (2002). The *luxS* gene is involved in cell-cell signaling for toxin production in *Clostridium perfringens. Mol. Microbiol.*, **44 (1):** 171-179.

PANEBIANCO, A., MINNITI, A., CONTE, F., JANNUZZI, L. (1992). Indagine sulla presenza di *Clostridium perfringens* in polli cotti Allo spiedo a survey on *Clostridium perfringens* presence in chickens cooked on the spit. *Archivio Veterinario Italiano,* **43 (3):** 113-121.

PAYMENT, P., FRANCO, E., (1993). *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59:** 2418– 2424.

PETIT, L., GIBERT, M., POPOFF, M.R., (1999). *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol.*, **7:** 104– 110.

PRESCOTT, J.F., SIVENDRA, R., BARNUM, D.A. (1978). The use of bacitracin in the prevention and treatment of experimentally induced necrotic enteritis in the chicken. *Can. Vet. J.* **19:** 181-183.

QUINN, P.J., CARTER, M.E., MARKEY, B.K., CARTER, G.R. (1994). The enterotoxaemias. In: Clinical Veterinary Microbiology. London, Wolfe, **p.:** 204-207.

RHODEHAMEL, E.J., HARMON, S.M. (1998). *Clostridium perfringens*. In: FDA Bacteriological Analytical Manual. 8 th ed. USA. **p.:** 1-6.

RICHARDSON, M., GRANUM, P.E. (1985). The amino acid sequence of enterotoxin from *Clostridium perfringens* type A. *FEBS Lett.*, **182:** 479-484.

RIDELL, J., BJÖRKROTH, J., EISGRUBER, H., SCHALCH, B., STOLLE, A., KORKEALA, H. (1998). Prevalence of the enterotoxin gene and clonality of *Clostridium perfringens* strains associated with food poisoning outbreaks. *J. Food Protect.*, **61 (2):** 240-243.

ROOD, J.I. (1998). Virulence genes of *Clostridium perfringens. Ann. Rev. Microbiol.*, **52:** 533-560.

ROOD, J.I., COLE, S.T. (1991). Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens. Microbiol. Rev.*, **55 (4):** 621-648.

SAITO, M. (1990) Production of enterotoxin by *Clostridium perfringens* derived from humans, animals, foods and the natural environment in Japan. *J. Food Prot.*, **53 (2):** 115-118.

SARKER, M.R., CARMAN, R.J., MCCLANE, B.A. (1999). Inactivation of the gene (*cpe*) encoding *Clostridium perfringens* enterotoxin eliminates the ability of two *cpe*-positive *C. perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates to affect rabbit ileal loops. *Mol. Microbiol.*, **33:** 946–958.

SARKER, M.R., SHIVERS, R.P., SPARKS, S., JUNEJA, V.K., McCLANE,B.A. (2000). Comparative experiments to examine the effects of heating on vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* isolates carrying plasmid versus chromosomal enterotoxin genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66:** 3234– 3240.

SCHALCH, B., EISGRUBER, H., GEPPERT, P., STOLLE, A. (1996). Vergleich von vier Routineverfahren zur Bestaetigung von *Clostridium perfringens* aus Lebensmitteln. *Arch. Lebensmittelhyg.*, **47:** 27-30.

SHANDERA, W.X., TACKET, C.D., BLAKE, P.A. (1983). Food poisoning due to *Clostridium perfringens* in the United States. *J. Infect. Dis.*, **147:** 167-170.

SHARMA, N.K., SAINI, S.S., GILL, J.P.S., KWATRA, M.S. (1993). Occurrence of *Clostridium perfringens* in uncooked cock-tail sausages at retail level and its public health significance. *Indian J. Anim. Sci.*, **63 (2):** 112-114.

SHIMIZU, T., BA-THEIN, W., TMAKI, J., HAYASHI, H. (1994). The *virR* gene , a member of a class of two-componenet response regulators, regulates the production of the perfringolysin O, collagenase, and hemagglutinin in *Clostridium perfringens. J. Bacteriol.*, **176:** 1616-1623.

SPARKS, S.G., CARMAN, R.J., SARKER, M.R., McCLANE, B.A.. (2001). Genotyping of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with antibiotic- associated diarrhea and food poisoing in North America. *J.Clin. Microbiol.*, **39 (3):** 883-888.

SKELKVA L.E., R., UEMURA, T., (1977). Experimental diarrhea in human volunteers following oral administration of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J. Appl. Bacteriol.*, **43:** 281– 286.

SKJELKVALE, R., DUNCAN, C.L. (1975). Enterotoxin formation by different toxigenic types of *Clostridium perfringens. Infect. Immun.*, **11:** 563-575.

SMITH, W.P., McDONEL, J.R. (1980). *Clostridium perfringens* type A: Invitro systems for sporulation and enterotoxin synthesis. *J. Bacteriol.*, **144:** 306-311.

SONGER, J.G., MEER, R.M. (1996). Genotyping of *Clostridium perfringens* by polymerase chain reaction is a useful adjunct to diagnosis of clostridial enteric disease in animals. *Anaerobe,* **2:**197-203.

STARK, R.L., DUNCAN, C.L. (1972). Purification and biochemical properties of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Infect. Immun.*, **6 (5):** 662-673.

STEVENS, D.L., MITTEN, J., HENRY, C. (1987). Effects of $\alpha$ and $\theta$ toxins from *Clostridium perfringens* on human polymorphonuclear leukocytes. *J. Infect. Dis.*, **156:** 324-333.

STRONG, D.H., CANADA, J.C. (1964). Survival of *Clostridium perfringens* in frozen chicken gravy. *J. Food Sci.*, **29:** 479-482.

SUTTON, R., HOBBS, B. (1968). A report of five recent outbreaks. *J. Hyg.*, **66:** 135-142.

SWARTZ, M.N. (1990). Anaerobic spore forming bacilli the *Clostridiae.* In: Microbiology. J.B. Lippincott Co., Philadelphia, **p:** 633-635.

ŞİRELİ, U.T., EROL, İ. (1999). Hazır kıymalarda *Listeria* türlerinin araştırılması. *Türk Vet. Hayv. Derg.,* **23:** 373-380.

TEKİNŞEN, O.C., YURTYERİ, A., MUTLUER, B. (1980). Ankara'da satılan hazır kıymaların bakteriyolojik kalitesi. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.,* **27 (1-2):** 45-63.

TEZAGUIC, F., FALLS, R.S.W., HEADLEY, V. (2000). Don't let the turkey get you down. *Disease Prevention News,* **60 (24):** 1-8.

THOMKE, S., ELWINGER, K. (1998): Growth promoters in feeding pigs and poultry.Growth and feed efficiency responses to antibiotic growth promoters. *Ann. Zootech.,* **47:** 85-97

TWETEN, R.K. (1988). Nucleotide sequence of the gene for perfringolysin θ (theta toxin) from *Clostridium perfringens* significant homology with the genes for streptolysin θ and pneumolysin. *Infect. Immun.,* **56:** 3235-3240.

YAMAGISHI, T., SUGITANI, K., TANISHIMA, K., NAKAMURA, S.(1997).Polymerase chain reaction test for differentiation of five toxin types of *Clostridium perfringens. Microbiol. Immunol.,* **41:**295– 299.

YOO, H.S., LEE, S.U., PARK, K.Y., PARK, Y.H. (1997). Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.,* **35 (1):** 228-232.

YÜRÜK, B., CEYHAN, İ., BABÜR, C. (1996). Investigation of *Clostridium perfringens* in canned foods. *Türk Hij. Dern. Biy. Derg.,* **53 (2):** 21-24.

VAN DAMME-JONGSTEN, M., WERNERS, K., NOTERMANS, S. (1989). Cloning and sequencing of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol.,* **56:** 181– 190.

WAGES, D.P. (2001): *Antibiotic use in poultry.* In : Meeting on the use of antimicrobial drugs in food animals and the establishment of regulatory thresholds on antimicrobial resistance. College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, Roleig, North Carolina, January 22.

WANG, R.F., CAO, W.W., FRANKLIN, W., CAMPBELL, W., CERNIGLIA, C.E. (1994). A 16S rDNA-based PCR method for rapid and specific detection of *Clostridium perfringens* in food. *Mol.Cell. Prob.,* **8:** 131-138.

WATKINS, K.L., SHRYOCK, T.R., DEARTH, R.N., SAIF, Y.M. (1997). In-vitro antimicrobial of *Clostridium perfringens* from commercial turkey and broiler chicken origin. *Vet. Microbiol.,* **54:** 195-200.

WEN, Q., McCLANE, B.A. (2004). Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolates in American retail foods. *Appl. Environ. Microbiol.,* **70 (5):** 2685-2691.

WITTE, W. (2000). Selective pressure by antibiotic use in livestock. *Int. J. Antimic. Agent.,***16:** 19-24.

WRIGLEY, D.M. (1990). Phospholipase C production and *Clostridium perfringens* growth in soy meal / ground beef mixtures. *J. Food Safety,* **10:** 295-306.

ZHAO, Y., MELVILLE, S.B. (1998). Identification and characterization of sporulation-dependent promoters upstream of the enterotoxin gene (*cpe*) of *Clostridium perfringens. J. Bacteriol.,* 136– 142.

# ÖZGEÇMİŞ

## I- Bireysel Bilgiler

| | |
|---|---|
| Adı | : Devrim |
| Soyadı | : SARIGÜZEL |
| Doğum Yeri ve Tarihi | : MERSİN- 03.03.1973 |
| Uyruğu | : Türkiye Cumhuriyeti |
| Medeni Durumu | : Evli |
| İletişim Adresi ve Telefonu | : Sıhhiye Orduevi /ANKARA-(532) 781 73 27 |

## II- Eğitimi

| | |
|---|---|
| İlkokul (1979-1984) | : Cumhuriyet İlkokulu/MERSİN |
| Ortaokul (1984-1987) | : Dumlupınar Lisesi Ortaokulu/MERSİN |
| Lise (1987-1990) | : Dumlupınar Lisesi/MERSİN |
| Üniversite (1991-1996) | : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi |
| Yabancı dil | : İngilizce |

## III- Ünvanları

| | |
|---|---|
| Veteriner hekim | : 1996 |
| Asteğmen | : 1997-1998 |
| Teğmen | : 1998 |
| Üsteğmen | : 1999 |

## IV- Mesleki deneyimi

| | |
|---|---|
| 1997-1998 | : Ulş.Ok.ve Eğt.Mrk.K.'lığı/İZMİR |
| 1998-1999 | : As.Vet.Ok.ve Eğt.Mrk.K.'lığı/BURSA |
| 1999-2002 | : 12nci Mknz.P.Tug.K.'lığı/AĞRI |

## V- Bilimsel Etkinlikleri

| | |
|---|---|
| Seminer (2003) | : *Clostridium perfringens* Enterotoksinleri |
| Bildiri (2004) | : I. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi (29-30 Eylül 2004/ ANKARA) |
| Bildiri (2005) | : XIV. World Veterinary Poultry Congress (22-26 Ağustos 2005/ İSTANBUL) (Accepted) |