



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**KESİMHANELERDEN ALINAN PİLİÇ BOYUN DERİSİ ÖRNEKLERİNDE
Clostridium Perfringens VARLIĞI,
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE
ANTİBİYOTİK DİRENÇ PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ**

Güzin İPLİKÇİOĞLU ÇİL

**GIDA HİJYENİ ve TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. F. Seda BİLİR ORMANCI**

2013- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KESİMHANELERDEN ALINAN PİLİÇ BOYUN DERİSİ ÖRNEKLERİNDE
Clostridium Perfringens VARLIĞI,
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE
ANTİBİYOTİK DİRENÇ PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ**

Güzin İPLİKÇİOĞLU ÇİL

**GIDA HİJYENİ ve TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. F. Seda BİLİR ORMANCI**

2013- ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Doktora Programı

çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından

Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 08.11.2013



Prof. Dr. Belgin SARİMEHMETOĞLU
Ankara Üniversitesi Veteriner Faköltesi
Jüri Başkanı



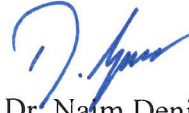
Prof. Dr. Hakan YARDIMCI
Ankara Üniv. Veteriner Faköltesi



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



Doç. Dr. F. Seda BİLİR ORMANCI
Ankara Üniv. Veteriner Faköltesi



Doç. Dr. Naim Deniz AYAZ
Kırıkkale Üniv. Veteriner Faköltesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	viii
Çizelgeler	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Tarihçe	4
1.2. Taksonomi	5
1.3. <i>Clostridium perfringens</i> 'in Etiyolojisi ve Biyokimyasal Özellikleri	5
1.4. <i>Clostridium perfringens</i> 'in Gıdalarda Gelişimini Etkileyen Faktörler	6
1.4.1. Sıcaklık	6
1.4.2. Sodyum Klorür (NaCl) ve Kürleme Ajanları	7
1.4.3. Su Aktivitesi	7
1.4.4. pH	8
1.4.5. Gaz-Atmosfer (Eh)	8
1.4.6. Işınlama	8
1.5. <i>Clostridium perfringens</i> 'in Antibiyotik Dirençliliği	9
1.6. <i>Clostridium perfringens</i> 'in Başlıca Virülens Faktörleri	11
1.6.1. α -toksin	11
1.6.2. β -toksin	12
1.6.3. ι -toksin	12
1.6.4. ε -toksin	13
1.6.5. θ -toksin	13
1.6.6. Nöraminidaz	14
1.6.7. Enterotoksin	14
1.7. <i>Clostridium perfringens</i> 'in Kontaminasyon Kaynakları	15
1.7.1. Toprak	16
1.7.2. Su	17
1.7.3. Dışkı	17

1.8. <i>Clostridium perfringens</i> 'in Gıdalarda Bulunuşu	19
1.8.1. Kırmızı Et ve Ürünleri	19
1.8.2. Kanatlı Eti ve Ürünleri	20
1.8.3. Su Ürünleri	21
1.8.4. Diğer Gıdalar	22
1.9. <i>Clostridium perfringens</i> 'in Neden Olduğu Hastalıklar	22
1.9.1 <i>Clostridium perfringens</i> Tip A Kaynaklı Gıda Enfeksiyonu	23
1.9.2. Enteritis Nekrotikans	24
1.9.3. Gazlı Gangren	25
1.9.4. Diğer Hastalıklar	25
1.10. Gıda Kaynaklı <i>C. perfringens</i> Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi	27
1.11. Korunma ve Kontrol	28
2. GEREÇ VE YÖNTEM	30
2.1. Gereç	30
2.1.1. <i>Clostridium perfringens</i> 'in İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri ve Diğer Kimyasallar	30
2.1.2. <i>Clostridium perfringens</i> İzolatlarının PCR Analizinde Kullanılan Kimyasallar	34
2.1.3. <i>Clostridium perfringens</i> 'in İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Testinde Kullanılan Besiyerleri ve Antibiyotik Diskleri	36
2.1.4. Test Suşları	37
2.2. Yöntem	37
2.2.1. <i>Clostridium perfringens</i> 'in İzolasyonu	37
2.2.2. <i>Clostridium perfringens</i> İdentifikasyonu	38
2.2.2.1. Gram Boyama ve Mikroskopik Bakı	39
2.2.2.2. Katalaz Testi	40
2.2.2.3. Nitrat Motilite Testi	40
2.2.2.4. Laktoz Jelatin Testi	41
2.2.2.5. Reverse-CAMP (Christie Atkins Munch Petersen) Testi	41
2.2.2.6. Asit Fosfataz Testi	42
2.2.3. PCR Tekniği	42
2.2.3.1. DNA Ekstraksiyonu	43
2.2.3.2. <i>Cpa</i> geni için PCR amplifikasyonu	43
2.2.3.3. Elektroforez	43
2.2.3.4. Multipleks PCR ile Toksin Genlerinin Tespiti	44

2.2.3.5. Elektroforez	45
2.2.4. Antibiyotik Direnç Testi	45
2.2.5. <i>Clostridium perfringens</i> İzolatlarının Muhafazası	46
2.2.6. İstatistiksel Analizler	46
3. BULGULAR	47
3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon	47
3.2. PCR Sonuçları	48
3.3. Mevsimsel Dağılım	49
3.4. Antibiyotik Dirençlilik Sonuçları	50
4. TARTIŞMA	52
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	57
ÖZET	58
SUMMARY	59
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	73

ÖNSÖZ

Tavuk eti, yüksek kalitede dengeli ve yeterli protein içeriği, ürün çeşitliliği, diğer et ürünlerine göre ucuz olması ve kültürel ya da dinsel farklılık gözetmeksizin herkes tarafından tercih edilebilmesi sayesinde tüm Dünya’da ve ülkemizde tüketilen hayvansal gıdalar arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Ancak, bu değerli gıdanın sağlıklı hayvanlardan, uygun hijyenik ve teknolojik yöntemlerle elde edilmediği takdirde insan sağlığını tehdit eden bir unsura dönüşeceği unutulmamalıdır. Her yıl milyolarca insan gıda kaynaklı infeksiyonlarla karşı karşıya kalmakta, hatta bazıları bu nedenle hayatını kaybetmektedir. Gıda infeksiyonlarına neden olan etkenlerin gıdalarda güvenilir metotlarla tespiti, identifikasyon ve antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi halk sağlığının korunması açısından büyük önem taşımaktadır.

Buradan yola çıkarak, bu çalışmada, tavuk eti tüketimiyle insanlarda infeksiyon oluşturan önemli etkenlerden biri olan *C.perfringens*’ in piliç boyun derilerinde prevalansı araştırılmıştır. Elde edilen izolatların, ileri tekniklerle toksin üretme yetenekleri incelenmiş, antibiyotik direnç profilleri belirlenmiştir.

Bu çalışmamda bana ı ışık tutan, bilgi ve desteğini esirgemedi her aşamada yanımda olan, mesleki ve özel hayatım boyunca örnek alacağım danışman hocam Doç. Dr. F. Seda BİLİR ORMANCI’ya sonsuz teşekkürlerimisunarım. Desteğini esirgemeyen, sabır gösteren ve yalnız olmadığımı hissettiren başta eşim Sinan ÇİL olmak üzere bütün aileme teşekkür ederim. Doktora süresi boyunca emeği geçen bütün hocalarıma saygılarımla.

SİMGELER ve KISALTMALAR

Å: Angström
 ADP: Adenosine diphosphate-Adenozin difosfat
 ATCC: American Type Culture Collection-Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
 a_w : Activity of water - Su aktivitesi
 Ca^{+2} : Kalsiyum
 CAMP: Christie Atkins Munch Peterson
cat: Chloramphenicol acetyltransferase-Kloramfenikol asetiltransferaz
 CCUG: Culture Collection University of Göteborg -Göteborg Üniversitesi Kültür Koleksiyonu
 CDC : Center for Disease Control and Prevention- Amerika Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezi
 cm^2 : Santimetre kare
 CPE: *C. perfringens* enterotoksin
 Da: Dalton
 DNA : Deoxyribonucleic acid - Deoksiribonükleik asit
 DNase: Deoxyribonuclease-Deoksiribonükleaz
 dNTP: Deoxynucleotide triphosphate-Deoksinükleotid trifosfat
 E_h : Redox potential-Redoks potansiyeli
erm: Erythromycin resistance methylase- Eritromisin rezistans metilaz
 g: Gram
 GHP: Good Hygienic Practice-İyi Hijyen Uygulamaları
 GMP: Good Manufacturing Practice-İyi Üretim Uygulamaları
 H_2O_2 : Hidrojen peroksit
 H_2S : Hidrojen sülfür
 HACCP : Hazard Analysis and Critical Control Points – Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları
 K^+ : Potasyum
 kDa: Kilo dalton
 kGy: Kilo gray
 $MgCl_2$: Magnezyum Klorür
 ml: Mililitre
 N: Normal
 Na^+ : Sodyum
 NaCl: sodyum Klorür
 $NaNO_2$: Sodyum Nitrit
 $NaNO_3$: Sodyum Nitrat
 NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards - Klinik Laboratuvar Standartları Ulusal Komitesi
 NCTC: The National Collection of Type Cultures-Ulusal Tip Kültür Koleksiyonu
 nm: Nano metre
 PCR : Polymerase chain reaction - Polimeraz zincir reaksiyonu
 PEM: *Perfringens* Enrichment Medium
 ppm: Parts per million-Milyonda bir

SIDS: Sudden infant syndrome-Ani bebek ölümü sendromu

TBE: Tris-Borik Asit-EDTA

Tet: Tetracyclineresistance- Tetrasiklin direnç

TSC: Tryptose Sulphite Cycloserine

Zn⁺²: Çinko

α : Alfa

β : Beta

ϵ : Epsilon

θ : Tita

ι : İota

λ : Lamda

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. TSC agarda <i>C. perfringens</i> şüpheli kolonilerin görünümü	38
Şekil 2.2. <i>C. perfringens</i> 'in izolasyon ve identifikasyon şeması	39
Şekil 2.3. Hareket testi (a) ve nitrat redüksiyon testi (b)	40
Şekil 2.4. Jelatinaz testi	41
Şekil 2.5. Reverse-CAMP ve asit fosfataz test	42
Şekil 2.6. <i>C. perfringens</i> 'in Mueller Hinton agarda disk difüzyon testi görünümü	46
Şekil 3.1. Tavuk boyun derisi örneklerinde klasik kültür tekniği ile <i>C. perfringens</i> izolasyon oranı	47
Şekil 3.2. PCR ile <i>cpa</i> geni tespit edilmiş <i>C. perfringens</i> izolatlarının elektroforez görüntüsü	48
Şekil 3.3. Multipleks PCR ile <i>cpa</i> , <i>cpb</i> , <i>etx</i> , <i>ia</i> , <i>cpb2</i> , <i>cpe</i> genlerinin elektroforez görüntüsü	49
Şekil 3.4. Aylara göre tavuk boyun derisi örneklerinde <i>C. perfringens</i> kontaminasyonu dağılımı	50

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Dünyada ve bazı ülkelerde tavuk eti üretim miktarları	1
Çizelge 1.2. Türkiye’de yıllara göre piliç eti üretimi	2
Çizelge 1.3. Dünya’da ve bazı ülkelerde kişi başına et tüketimleri	2
Çizelge 1.4. Türkiye’de kişi başına kanatlı eti ve piliç eti tüketimi	3
Çizelge 1.5. <i>C. perfringens</i> tarafından üretilen toksinler ve etkenin tiplendirilmesi	5
Çizelge 1.6. <i>C. perfringens</i> ’in üreme koşulları	6
Çizelge 1.7. <i>C. perfringens</i> toksinleri ve hayvanlarda oluşturduğu hastalıklar	26
Çizelge 1.8. Çeşitli ülkelerde rapor edilen <i>C. perfringens</i> salgınları	28
Çizelge 2.1. Primerler	35
Çizelge 3.1. Mezbahalara göre tavuk boyun derisi örneklerinde <i>C. perfringens</i> izolasyonu görüntüsü	48
Çizelge 3.2. <i>C. perfringens</i> izolatlarının antibiyotik direnç profilleri	51

1. GİRİŞ

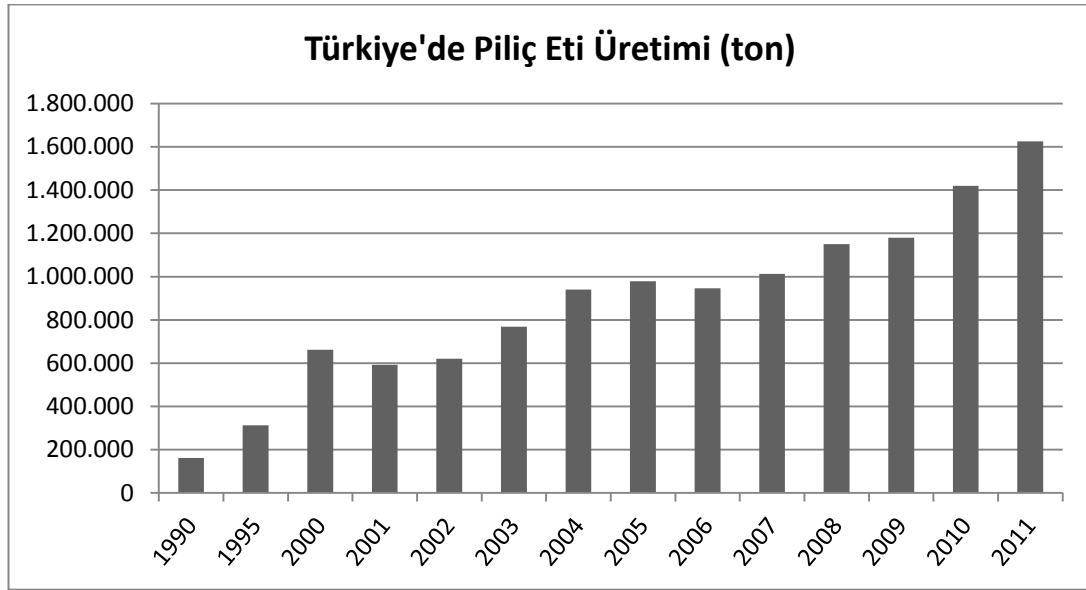
Dünya’da kanatlı eti üretimi sürekli bir artış eğilimindedir. Üretiminin kısa sürede gerçekleşmesi ve ekonomik olması bu süreci hızlandırmaktadır. Tavuk eti üretimi toplam kanatlı etinin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Dünya’da tavuk eti üretimi 2012 yılında 82 422 milyon tona ulaşmıştır. Dünya üretiminde en büyük pay Amerika Birleşik Devletlerine aittir ve Türkiye, Dünya sıralamasında ülke bazında 8. sırada yer almaktadır (Çizelge 1.1) (Anon., 2012a).

Çizelge 1.1. Dünyada ve bazı ülkelerde tavuk eti üretim miktarları (bin ton) (Anon., 2012a)

	2008	2009	2010	2011	2012
Amerika Birleşik Devletleri	16 561	15 935	16 563	16 694	16 476
Çin	11 840	12 100	12 550	13 200	13 700
Brezilya	11 033	11 023	12312	12863	12 750
Avrupa Birliği (27 Ülke)	8 594	8 756	9 202	9 310	9 480
Meksika	2 853	2 781	2 822	2 906	2 945
Hindistan	2 490	2 550	2 650	2 900	3 160
Rusya	1 680	2 060	2 310	2 575	2 750
Arjantin	1 435	1 500	1 680	1 770	1 936
Türkiye	1 170	1 250	1 430	1 614	1 687
Endonezya	1 350	1 409	1 465	1 515	1 540
Tayland	1 170	1200	1 280	1 350	1 550
Dünya	72 807	73617	77 872	80 661	82422

Türkiye’de etlik piliç üretimi; 1970’li yıllarda aile işletmeciliği şeklinde pahalı ve sınırlı üretim kapasitesi ile gerçekleştirilirken, 1980’li yıllarda entegre tesislerin ve sözleşmeli üretim modelinin artmaya başlaması ile önemli bir ilerleme kaydetmiş, 1990’lı yıllarda başlayan büyük yatırımlar ile 2000’lerde Avrupa ve Dünya standartlarını yakalamıştır. Piliç eti üretimi 1990 yılında 162 569 ton iken 2000 yılında 662 096 tonla 4,1 katına, 2011 yılında 1 625 000 tonla 10 katına çıkmıştır (Çizelge 1.2) (Anon., 2012b)

Çizelge 1.2. Türkiye’de yıllara göre piliç eti üretimi (Anon., 2012b).



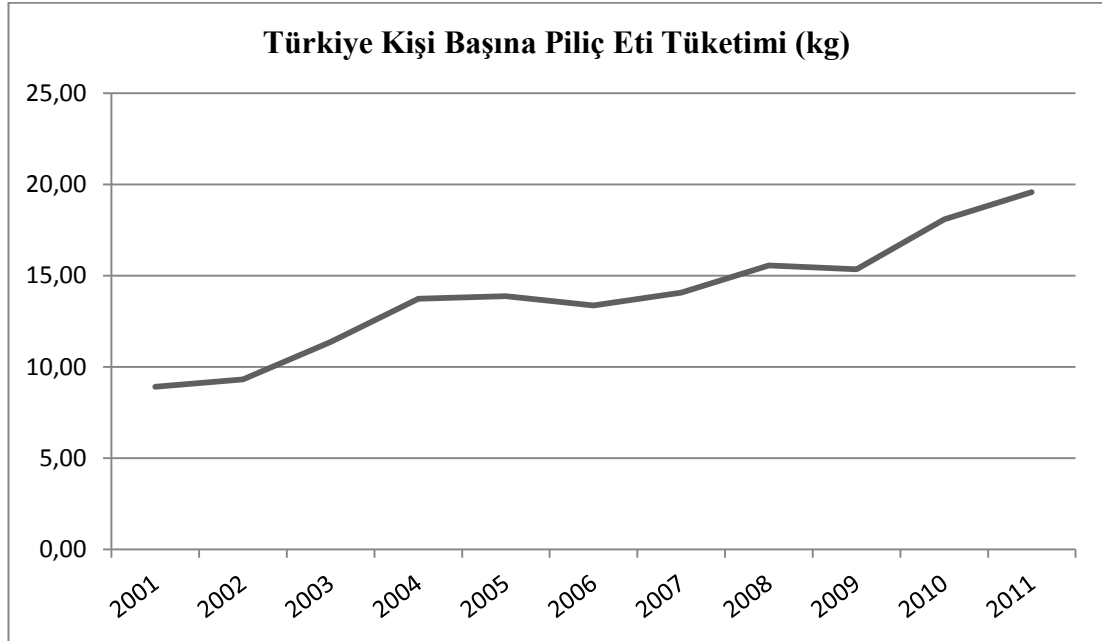
Yüksek kalitede dengeli ve yeterli protein içeriği, ürün çeşitliliği, diğer et ürünlerine göre ucuz olması ve kültürel ya da dinsel farklılık gözetmeksizin herkes tarafından tüketilebilmesi tavuk etini hayvansal gıdalar arasında ön sıralara taşımaktadır (Magdelaine ve ark, 2008). Tavuk eti Avrupa Birliği’nde domuz etinden sonra en çok tüketilen hayvansal gıdadır. Amerika’da ise diğer et türleri arasında ilk sırada yer aldığı bildirilmektedir (Çizelge 1.3) (Anon., 2012c).

Çizelge 1.3. Dünya’da ve bazı ülkelerde kişi başına et tüketimleri (Anon., 2012c).

ÜLKELER	SIĞIR	DOMUZ	PİLİÇ	KOYUN	TOPLAM
Amerika Brileşik Devletleri	38,3	26,0	43,3	-	107,5
Avrupa Birliği	16,2	40,9	17,5	2,6	96,2
Avustralya	34,2	22,7	34,2	-	91,0
Çin	4,3	38,2	9,7	1,9	54,1
Güney Afrika	14,2	-	30,8	-	46,0
Hindistan	1,8	-	2,3	-	4,1
Japonya	10,7	19,3	16,1	-	45,6
Rusya	15,7	22,6	19,7	-	58,0
Türkiye	9,0	-	19,6	2,3	30,9

Türkiye’de tavuk eti tüketimi, üretimdeki artışa bağlı olarak yükselmiştir ancak, elde edilen verilere göre bu artışın ihracat nedeniyle üretimdeki artış kadar yüksek olmadığı bilinmektedir. 2001 yılında 8,9 kg olan kişi başı tüketim miktarı, 2011 yılında 19,5 kg’a çıkmıştır (Çizelge 1.4) (Anon., 2012b, Anon., 2012d).

Çizelge 1.4. Türkiye’de kişi başına kanatlı eti ve piliç eti tüketimi (Anon.,2012b, Anon., 2012d).



Kümes hayvanlarında insanlar için patojen olan mikroorganizmaların yaygın olarak bulunması, sürü içinde hızlı bir yayılım göstermesi ve kesim tekniğinedeniyle kanatlı hayvan etleri, insanlarda görülen gıda kaynaklı hastalıklarınoluşumunda önemli bir role sahiptir (Bryan ve Doyle, 1995). Yapılan bir çok çalışma, tavuk etinin başta *Salmonella* olmak üzere, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* gibi patojenlerle kontamine olduğunu ortaya koymaktadır (Erol, 2007).

Amerika Birleşik Devletleri’nde her yıl yaklaşık 9,4 milyon gıda kaynaklı hastalık olgusu bildirilmekte, bu vakaların 55 bini hastanede tedavi edilirken, 1 351’i ölümle sonuçlanmaktadır. Bu vakalara neden olan etkenlerin başında da *Norovirus* (5,5 milyon, %58), non-tifoidal *Salmonella* spp. (1 milyon,% 11) ve *Clostridium perfringens* (1 milyon, %10) gelmektedir. Bu da *Clostridium perfringens* Tip A ile

kontamine gıdaların tüketilmesi sonucu oluşan gıda infeksiyonunun önemli bir halk sağlığı sorunu olduğunu göstermektedir (Scallan ve ark, 2011).

Clostridium perfringens, doğada, hayvanların ve insanların bağırsaklarında yaygın olarak bulunan bir bakteridir. Ubiquiter özelliği, sporlu olması ve çevresel şartlara direnç göstermesi, gıdaların etkenle kontaminasyon riskini arttırırken, korunma ve kontrolünü zorlaştırmaktadır (Linch ve ark, 2006).

Gıda kaynaklı hastalıklara neden olan bakterilerin antibiyotiklere karşı geliştirdiği direnç de önemli bir diğer halk sağlığı sorunudur. Özellikle kanatlı yetiştiriciliğinde su ve yeme katılarak, hastalıktan korunmak ve gelişmeyi arttırmak amacıyla kullanılan antibiyotikler, bir çok mikroorganizmada direnç gelişimine neden olmaktadır. *C. perfringens*'in de, tetrasiklin, kloramfenikol, klindamisin ve metronidazol gibi antibiyotiklere dirençli suşlarının bulunduğu bilinmektedir (Bogaard ve Stobberingh, 2000, Leclercq ve Courvalin, 1991).

1. 1. Tarihçe

Clostridium perfringens ilk kez Dr. Welch tarafından, otopsi yaptığı bir hastadan izole edilmiş ve ölümden sonra çoğalan, gaz oluşturan bakteri olarak tanımlanmıştır. Dr. Welch ve Dr. Nuttal'ın 1892 yılında *Bacillus aerogenescapsulatus* olarak isimlendirdiği bu mikroorganizma daha sonra Migula tarafından Dr. Welch' e ithafen *Clostridium welchii* olarak adlandırılmıştır (Lucey ve Hutchins, 2004). Daha sonra, Latince'den gelen ve içten parçalayan anlamını taşıyan '*perfringens*'den köken alan *C. perfringens* olarak Bergey's Manual'de yer almıştır (Holt ve ark, 1994).

C. perfringens'in gıda kaynaklı infeksiyonlara yol açtığı İngiliz araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur. 1943'de İngiltere'de tavuk eti tüketen çocuklar arasında görülen infeksiyonun nedeni *C.perfringens* olarak belirlenmiş ve bu salgın tüm dünyada görülen ilk büyük olgu olarak kabul edilmiştir (Angelotti ve ark.,1962). Daha sonra Amerika Birleşik Devletleri'nde 1945 yılında meydana gelen salgında benzer bir tablonun olduğu McClung (1945) tarafından bildirilmiş ve etkenin gastroenteritise neden olduğu ortaya konmuştur.

Etkenin neden olduğu ve sindirim sistemi hastalığı olan enteritis nekrotikans II. Dünya Savaşı sırasında, konserve et tüketimine bağlı olarak tespit edilmiştir. *C. perfringens* tip C'nin, Yeni Gine'de domuz eti tüketimi ardından şekillenmesine ithafen Pig Bel olarak adlandırılan hastalığın da etkeni olduğu 1966 yılında ortaya konmuştur (Murrell ve Roth, 1966, Devitt ve Stamp, 1983). *C. perfringens*'in gazlı gangrene sebep olduğunun bulunmasının ardından bu etken ile ilgili yapılan çalışmalar giderek artmıştır (Niilo, 1988).

1.2. Taksonomi

Bergey's Manual' e göre *C. perfringens*; *Firmicutes* şubesinin, *Clostridia* sınıfındaki *Clostridiales* takımının *Clostridiaceae* familyasındaki *Clostridium* genusu içerisinde yer almaktadır (Vos ve ark., 2009).

C. perfringens başta ürettiği alfa, beta, gama, epsilon ve iota toksinleri ile lesitinaz, hemolizin, hiyaluridaz, kollogenaz, DNase (deoksiribonükleaz) ve amilaz gibi hidrolitik enzimlerine göre A, B, C, D ve E olmak üzere tiplendirilir (Çizelge 1.5) (Bezirtzoglou ve ark., 2000, Adams ve Moss, 2008).

Çizelge 1.5. *C. perfringens* tarafından üretilen toksinler ve etkenin tiplendirilmesi (Adams ve Moss, 2008)

Tip	Üretilen Toksin			
	α	β	ϵ	ι
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+

1.3. *Clostridium perfringens*'in Etiyolojisi ve Biyokimyasal Özellikleri

C. perfringens ubiquiter özellikte, Gram pozitif, çubukçuk formunda, 3-9/1,0-1,5 μm boyutlarında, sporlu ve hareketsiz patojen bir mikroorganizmadır. Sporları büyük,

oval şekildedir, santral veya subterminal olarak lokalize olmaktadır. Etken anaerobik özelliğe sahip olmasına karşın, düşük seviyedeki oksijenin varlığında da üreyebilmektedir. Mezofilik bir bakteri olan *C. perfringens* 15 ile 50 °C arasında çoğalabilmektedir ve optimal üreme sıcaklığı 45°C'dir. Optimal pH değeri 6-7'dir ve pH 5 ile 9 arasında üreme gösterir. Etken düşük a_w değerine dirençli değildir, gelişmesi için gereken en düşük a_w değeri 0,95-0,97 arasındadır (Çizelge 1.6) (Brynstad ve Granum, 2002, Erol, 2007, Ray ve Bhunia, 2008).

Çizelge 1.6. *C. perfringens* 'in üreme koşulları (Erol, 2007).

	Min.- Maks.	Optimal
Sıcaklık (°C)	14-50	45
pH	5-9	6-7
a_w	0,93-0,950,97	

C. perfringens'in identifikasyonunda kullanılan spesifik özellikleri arasında nitratı redükte etmesi, jelatinaz pozitif olması ve glikozu fermente etmesi yer alır. Bunun yanında etken katalaz negatif, H₂S oluşturan, rafinozu fermente edebilen ancak salisini kullanamayan bir bakteridir. Yumurta sarısı ile zenginleştirilmiş tripton, sülfid ve sikloserin içeren ortamlarda iyi üreme gösterir. *Streptococcus agalactia* ile sinerjik etki göstererek kanlı agarda karakteristik hemoliz alanı oluşturur (Hansen ve Elliott, 1980, Wrigley, 1994).

1.4. *Clostridium perfringens*'in Gıdalarda Gelişimini Etkileyen Faktörler

1.4.1. Sıcaklık

C. perfringens'in optimum üreme sıcaklığı 43-45°C'dir ve etkenin 50°C'ye kadar gelişmesini sürdürebildiği bilinmektedir. Gelişme 15°C'nin altında yavaşlamakta, 6°C'de durmaktadır. *C. perfringens*'in vejetatif hücreleri yüksek sıcaklıklara veya soğutma ve dondurma gibi işlemlere dayanıklı değildir (Gibbs, 2002) .

C. perfringens'in en önemli özelliğinden biri de ılık olarak muhafaza edilen gıdalarda bölünme süresinin kısa olmasıdır. Bu değerin 43°C'de ette 10 dakikadan az olduğu bildirilmektedir (ICMSF, 1996).

Sprolanmanın şekillendiği sıcaklık aralığı, üremenin olduğu aralığa göre daha dardır, genellikle 35-40°C arasında değişmektedir. Yüksek veya düşük sıcaklık uygulamaları, etkenin spor formuna dönüşmesini hızlandırmaktadır (Labbe,1989).

Gıda zehirlenmelerine yol açan suşların vejetatif formlarının, diğer hastalıklardan izole edilenlere oranla sıcaklığa daha dirençli olduğu tespit edilmiştir. Buna ek olarak, enteroksin üreten geni kromozomal olarak taşıyan etkenler ile plazmidal olarak taşıyanlar arasında da sıcaklığa duyarlılıkta farklılık olduğu bilinmektedir. Kromozomal olarak geni taşıyan suşların vejetatif formlarının plazmidal olanlara göre sıcaklığa direncinin 2 kat fazla olduğu, spor formlarda ise 60 kat gibi ciddi bir farkın olduğu bildirilmiştir (Sarker ve ark., 2000)

1.4.2. Sodyum Klorür (NaCl) ve Kürleme Ajanları

C.perfringens'in % 6-8 tuz konsantrasyonunda gelişiminin inhibe olduğu bilinmektedir. Kürleme ajanlarının da benzer bir etki gösterdiği ve 10 000 ppm NaNO₃ veya 400 ppm NaNO₂ de etkenin gelişemediği ortaya konmuştur. Gıda kaynaklı *C. perfringens* olgularına bakıldığında kürlenmiş ürünlerin neden olduğu vaka sayısı çok azdır. Bu da göstermektedir ki tuz ve kürleme ajanlarının bir arada kullanıldığı durumlarda etkileri artmaktadır (McClane, 2007) .

1.4.3. Su Aktivitesi (a_w)

Minimum su aktivitesi değerleri kullanılan maddeye göre değişmekle birlikte 0,97 ile 0,93 arasındadır. Örneğin a_w'yi düşürmek için glikoz kullanıldığında, gelişim 0,96 da durmaktadır. % 5 tuz kullanılan ortamlarda 0,97 de canlı kalma oranı hızla düşerken, aynı etki gliserol seviyesi ancak % 18' e ulaştığında oluşmaktadır (Wrigley, 1994).

Sporlanmanın şekillendiği a_w değeri, gelişmenin olduğu aralığa göre daha yüksektir. Spor oluşabilecek en düşük a_w değerinin 0,98 olduğu bildirilmektedir. Etkenin a_w değerlerindeki değişimleri tolere etmesi pH ve sıcaklık gibi diğer faktörlere de bağlıdır (Labbe,1989).

1.4.4. pH

C. perfringens için optimal pH değeri 6-7'dir. Gelişme pH 5'in altında inhibe olmaktadır ancak oluşturduğu bazı proteinler sayesinde pH 4,5'da 20 dakika canlılığını koruduğu saptanmıştır (Cotter ve Hill, 2003).

Spor oluşumunun şekillendiği pH aralığı 6-8 arasındadır (Labbe, 1989). Sporların germinasyonu için gerekli pH aralığının ise 5,7 ile 7,5 arasında olduğu bildirilmektedir (Paredes-Sabja ve ark., 2008).

1.4.5. Gaz-Atmosfer (E_h)

C. perfringens anaerob olmasına karşın +350 mV ve -400 mV arasında canlılığını koruyabilmekte ve diğer *Clostridium* 'lardan farklı olarak E_h değişimlerini iyi tolere etmektedir. En iyi ürettiği E_h değerinin +200 mV olduğu bildirilmektedir (Garcia ve Heredia, 2009, ICMSF, 1996).

C. perfringens'in ferrodoksin gibi, indirgeyici moleküller üreterek ortamın E_h değerini modifiye ettiği ve gelişmesi için uygun koşullar oluşturduğu bilinmektedir (McClane, 2007).

1.4.6. Işınlama

C. perfringens 'in vejetatif formlarının ve sporlarının gama ışınlarına direnci 1,2-3,4 kGy arasında değişmektedir. Sıcaklık ve ışınlamanın bir arada kullandığı

durumlarda, ışınlama öncesi 93-103 °C' ye kadar uygulanan sıcaklıkların ışınlama seviyesine etkisinin olmadığı ancak sıcaklık uygulamasından önce uygulanan düşük doz (0-7 kGy) ışınlamanın, spor formlarını sıcaklığa duyarlı hale getirdiği ortaya konmuştur (Gomez ve ark.1980, Gombas ve Gomez, 1978, Clifford ve Anellis, 1975).

1.5. *Clostridium perfringens*'in Antibiyotik Dirençliliği

Antibiyotikler hayvan yetiştiriciliğinde, bakteriyel infeksiyonların tedavisinde, hastalıklar yönünden risk taşıyan hayvanlarda koruyucu olarak veya gelişimi ve verimi arttırmak amacıyla yem katkısı şeklinde kullanılmaktadır. Tüm dünyada hayvanlara verilen antibiyotiklerin sadece % 18'inin tedavide kullanıldığı, % 40 gibi büyük bir oranının koruyucu ve gelişmeyi arttırıcı amaçla verildiği bildirilmektedir. Elde edilen veriler Amerika Birleşik Devletleri'nde üretilen antibiyotiklerin % 55-60'ının hayvan yetiştiriciliğinde kullanıldığını ve bunlardan benzilpenisilin (penisilinG) ve tetrasiklinin sıklıkla yeme ilave edildiğini göstermektedir. Avrupa'da da antibiyotik kullanımının % 30'unun gelişmeyi arttırıcı amaçla olduğu bildirilmektedir. Antibiyotiklerin, bu şekilde kullanımı mikroorganizmalarda direnç şekillenmesine neden olmaktadır (Bogaard ve Stobberingh, 1999, Teuber, 1999, Bogaard ve Stobberingh, 2000).

Bu olumsuz etkisi göz önüne alınarak Avrupa Birliği ilk olarak 1997'de avoparsinin gelişmeyi arttırıcı amaçla kullanımını yasaklamıştır. 1999'da da insanlarda kullanılan antibiyotiklerle gösterdiği benzerlik nedeniyle basitrasin, spiramisin, tilyosin ve virginiamisinin hayvanlarda kullanımı yasaklanmıştır (Casewell ve ark., 2003).

Kanatlı yetiştiriciliğinde de antibiyotikler su ve yeme katılarak nekrotik enteritis gibi bir çok hastalıktan korunmak amacıyla kullanılmaktadır. Antibiyotik dirençliliğin daha çok kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde yoğun olarak kullanılan sülfisokzazol, amoksasilin/klavulanik asit, ampisilin, spektinomisin, tetrasiklin, kloramfenikol, florfenikol, streptomisin, kotrimokzazol, karbadoks ve trimetoprim

gibi antibiyotiklere karşı şekillendiği bildirilmiştir (Khachatourians,1998, Gaskins ve ark., 2002).

C. perfringens'in florokinolonlar gibi genellikle anaerob mikroorganizmalara karşı kullanılan antibiyotiklere duyarlı olduğu bilinmektedir (Ellie ve ark., 2011). Rood ve ark. 1978 yılında ilk kez etkenin çoklu antibiyotik direncinin olduğunu (tetrasiklin, eritromisin, linkomisin, klindamisin) domuz dışkılarından izole ettikleri örneklerde ortaya koymuştur. Ancak *C. perfringens* için bilinen en tipik direnç tetrasiklene karşı geliştirdiğidir (Teuber, 1999).

C. perfringens'in tetrasiklin direncinde etkili olan genetik determinantlar *tetP*, *tetM*, *tetK*, *tetL* olarak belirlenmiştir. Bunlar içerisinde *tetP*'nin kodladığı iki gen *tetA(P)* ve *tetB(P)* direnç mekanizmasında önemli rol oynamaktadır. *tetA*'nın ürettiği protein tetrasiklin atım pompası şeklinde görev yaparken, *tetB*'nin ürettiği protein ribozomal seviyede direnci sağlamaktadır (Martel ve ark., 2004, Lyras ve Rood, 1998).

C. perfringens'in metronidazole dirençli olduğunu gösteren az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bunun yanında *catQ* ve *catP* genlerini taşıyan izolatlarda, kloramfenikol asetiltransferaz üretimi ile kloramfenikole, *ermQ* ve *ermP* geni tespit edilenlerinde klindamisine karşı direnç olduğu bildirilmektedir. Eritromisine direnç, klindamisin ve linkomisin direnci ile beraber görülmektedir (Leclercqve Courvalin, 1991, Hecht ve ark, 1999, Rood ve Cole, 1991).

Anaerob mikroorganizmalarda en yaygın direncin aminoglikozidlere karşı olduğu bilinmektedir. Aminoglikozidler oksijen ve nitrojene bağlı elektron transport sistemi üzerinden etkilerini göstermektedir. Anaerobik mikroorganizmalarda bu transport sisteminin bulunmayışı antibiyotiği etkisiz kılmaktadır. Aminoglikozidler hedef bölgelerine ulaşamadıkları için *C. perfringens* üzerine etkili değildir, etken yapısal olarak direnç göstermektedir (Rasmussen ve ark., 1997).

1.6. *Clostridium perfringens*'in Başlıca Virülens Faktörleri

C. perfringens'in neden olduğu ve hafif seyirli gıda infeksiyonlarından, ölümcül nekrozlara kadar değişebilen hastalık tablolarının oluşumunda etkili 16 farklı virülens faktörü bulunmaktadır. Bunlardan 12 tanesi ürettiği toksinlerdir (α 'dan v'ye) diğer önemli virülens faktörleri arasında enterotoksin, hemolizin, nöraminidaz (sialidaz) ve etkenin dinamik metabolik aktivitesi yer almaktadır (Rodd ve Cole, 1991).

1.6.1. α - toksin

C. perfringens'in tüm tipleri tarafından üretilen α - toksin 43 kDA ağırlığında bir fosfolipazdır. Toksinin fosfolipaz C yapısında olduğu ilk kez MacFarlane ve Knight tarafından 1941'de ortaya konmuştur ve α - toksin, enzimatik aktivitesi olduğu tespit edilen ilk bakteriyel toksindir. α - toksin'i kodlayan gen *cpa*, kromozomal olarak yerleşmiştir ve replikasyonu kontrol eden bölgeye yakındır. Bulunduğu bölge kromozomun en stabil yerlerindendir (Canard ve Cole, 1989).

α - toksin, fosfolipidleri hidrolize etmekte ve hücre zarının yapısını bozarak etkisini göstermektedir. Fosfolipaz aktivitesi için Zn^{+2} ve Ca^{+2} iyonlarına ihtiyaç duymaktadır bu nedenle bu toksin çinko-metallofosfolipaz C olarak da bilinmektedir (Naylor ve ark, 1998).

C. perfringens'in ürettiği bu toksin insanlarda gazlı gangrene neden olmaktadır. Ayrıca α - toksin'in ani bebek ölümlerinde (SIDS, sudden infant death syndrome) de etkili olduğu bildirilmektedir. α - toksin'in neden olduğu bir diğer hastalıkta özellikle çinkodan zengin ve *C. perfringens* ile kontamine yem tüketimi sonucu tavuklarda görülen nekrotik enterittir (Titball ve ark. 1999, Murrell ve ark, 1993).

1.6.2. β -toksin

C. perfringens tip B ve C tarafından üretilen, letal ve nekrotik toksindir. 40 kDa ağırlığında, polipeptid yapıdaki ısıya dirençli bu toksinin en önemli özelliği tripsine karşı fazla duyarlı olmasıdır. Normal şartlarda ince bağırsaklarda salgılanan tripsin ile kolayca inhibe olan β -toksin, açlık durumlarında tripsinin azalması veya tripsin inhibitörü içeren tatlı patates gibi gıdaların tüketilmesi sonrasında etkisini göstermektedir. *C. perfringens* tip C insanlarda ve hayvanlarda enteritis nekrotikansa neden olmaktadır (Rood ve Cole, 1991, Petit ve ark., 1999).

β -toksin, 12 Å çapında, fosfotidilkolin ve kolesterolden oluşan iki katmanlı kanallar oluşturmaktadır. Bu kanallar Na^+ ve K^+ gibi katyonlara karşı selektiftir. Toksinin nöromusküler kavşaklara karşı affinitesi olduğu ve bu bölgelerde oluşturduğu katyon selektif kanallarla Na^+ ve K^+ dengesini bozarak, depolarizasyona neden olduğu bildirilmiştir (Shatursky ve ark, 2000).

β -toksin, *cpb* genini taşıyan bir virülens plazmidi tarafından kodlanmaktadır. *cpb* geninin regülasyonu hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (Uzal ve McClane, 2011).

1.6.3. ι -toksin

Iota-toksin, *C. perfringens* tip E tarafından üretilmektedir. İmmunolojik olarak birbirinden farklı Iota-a (Ia) ve Iota-b (Ib) olarak adlandırılmış iki proteinden oluşmaktadır. Ia 47 605 Da ağırlığında, bir ADP(adenozin difosfat)-riboziltransferazdır. Ib ise, 74 147 Da ağırlığındadır, non-enzimatik komponenttir, toksinin hücreye bağlanmasında ve içeri girmesinde görev alır. Ib, C-terminal ucu ile hücre yüzeyindeki karbonhidratlara, glikoproteinlere ya da yüzey proteinlerine bağlanarak oligomerize olur. Daha sonra bu kompleksin oluşturduğu kanallar ile toksin endozoma ulaşır ve enzimatik komponenti ile burada etkisini gösterir. Komponentlerin tek başına toksik etkisi olmadığı ortaya konmuştur, ancak birlikte çalıştıklarında letal, dermonekrotik ve sitotoksik etkilidirler(Stiles ve Wilkins, 1986, Perelle ve ark, 1993, Marvaud ve ark, 2002).

ı-toksin'i oluşturan Ia ve Ib, bir plazmidin tek operonunda lokalize olmuş, aralarında 243 nükleotid bulunan iki gen tarafından kodlanmaktadır (Sakurai ve ark, 2009).

1.6.4. ε-toksin

C. perfringens tip B ve D tarafından üretilen epsilon toksin, başta koyunlar olmak üzere diğer hayvan türlerinde de ekonomik kayıplara neden olan ölümcül enterotoksemiye neden olmaktadır. İnaktif haldeki 296 aminoasitten oluşan protoksin olarak sentezlenmekte, bağırsak lümenindeki proteazlar (tripsin, kemotripsin gibi) veya *C. perfringens*'in λ-proteazı ile yüksek aktiviteli proteine dönüşmektedir (Bhown ve Habeeb,1977).

Epsilon-toxin, letal ve dermonekrotiktir. Toksinin en önemli özelliğinden biri vasküler permeabiliteyi arttırmasıdır. Vasküler endotelyal hücrelere bağlanarak, beyin, böbrek, akciğer gibi organlarda ciddi hasara neden olmaktadır. Bu etkileri nedeniyle koyunlarda meydana getirdiği hastalık yumuşak böbrek olarak adlandırılmaktadır (Petit ve ark., 1997, Shortt ve ark., 2000).

Epsilon toksin, etkenin B ve D tipinin her iksinde de plazmidal *etx* geni tarafından kodlanmaktadır (Gibert ve ark., 1997).

1.6.5. θ-toksin

C. perfringens'in tüm tipleri tarafından üretilmekte ve perfringolizin O, θ-hemolizin olarak da adlandırılmaktadır. θ-toksin, streptolizin O, listeriolizin O, tetanolizin gibi tiol-aktif toksinler ile aynı grupta yer almaktadır. Bu toksinlerin ortak özelliği kolesterolü reseptör olarak kullanarak, hedef hücre membranlarında büyük porlar oluşturmalarıdır (Olofsson ve ark., 1993).

pfoA geni tarafından kodlanan bu toksin, gazlı gangrene doku nekrozuyla ilişkilidir ve etkilenen bölgelerde polimorf nükleer lökositleri yok etmektedir. Düşük

oranlardaki toksinin polimorf nükleer lökositlerin morfolojisini, metabolizmasını ve migrasyonunu bozduğu bildirilmektedir (Rood ve Cole, 1991).

1.6.6. Nöraminidaz

Bütün *C. perfringens* tipleri tarafından üretilebilen bu enzim sialidaz olarak da adlandırılmaktadır. Nöraminidaz, glikoproteinlerden, glikolipidlerden ve oligosakkaritlerden, asilnöraminik asiti ayırmakta böylece hücre yüzeyindeki reseptör molekülleri yok ederek veya bağ dokuyu bozarak etki göstermektedir (Fraser, 1978).

Nöraminidaz salınımı, *nanH* ve *nanI* genleri tarafından kodlanmaktadır. Her iki gen birbirinden farklı iki sialidaz üretmektedir. Bunlardan *nanH* tarafından üretilen formun, diğer mikroorganizmalar ve virüsler tarafından üretilen nöraminidaza benzerlik göstermediği bildirilmektedir (Newstead ve ark., 2008).

1.6.7. Enterotoksin

Clostridium perfringens'in, üzerinde en çok çalışılan ve hakkında en fazla bilgi bulunan virülens faktörü enterotoksindir (CPE) (Rood ve Cole, 1991). CPE, 319 aminoasitten oluşmuş, 35 kDa'luk, izoelektrik noktası pH 4,3 olan bir polipeptittir. Diğer Gram pozitif mikroorganizmaların toksinlerinden farklı olarak CPE sıcaklığa duyarlıdır. 56 °C de 5 dakikada biyolojik aktivitesini yitirmektedir. Aynı şekilde pH değişimlerine karşı da hassastır. pH < 5 ve > 10'da etkisini kaybetmektedir. Bazı proteazlar, toksini inaktive ederken tripsin ve kemotripsin biyolojik aktivitesini arttırmaktadır. İnce bağırsakta tripsin ve kemotripsin ile karşılaştığında N-terminal ucundan 25 veya 36 aminoasit kaybetmekte böylece aktif hale geçmektedir (McClane, 2000, Labbe ve Juneja, 2006).

Clostridium perfringens tip A kaynaklı gıda zehirlenmesinde başlıca virülens faktör enterotoksindir ve tipik gastrointestinal semptomların oluşmasına neden olmaktadır. Enterotoksin ince bağırsakta etkenin sporlanma aşamasında

üretilmektedir. CPE'nin salınımı sporulasyonun son aşamasında olmakta, sporangium hücrelerin lizisinden hemen önce pik seviyeye ulaşmaktadır (McClane, 1996, Jay ve ark., 2005, Meyer ve Tholozan, 1999).

CPE'nin sitotoksik etkisi, toksinin tight junction proteinlerinin 21 kDa'luk claudin reseptörlerine bağlanmasıyla başlamaktadır. Bu kompleks daha sonra 45 kDa'luk membran proteinlerine bağlanarak CPE kompleks ya da küçük kompleks diye adlandırılan 90 kDa'luk yapıyı oluşturur. CPE kompleks, 70 kDa'luk başka bir membran proteini ile etkileşime girerek daha büyük yapılı ve 155 kDa ağırlığındaki büyük kompleksi şekillendirmektedir. Oluşan bu son yapı, membran permeabilitesini bozmakta, hücre içi sıvısı ve iyon kaybına neden olmaktadır. CPE'nin etkisi ardından ince bağırsak villi uçlarında hasar, villilerde kısalma ve epitel hücrelerde deskuamasyon tespit edilen histopatolojik değişikliklerdir (McClane, 2000, Bhunia, 2008, Wieckowski ve ark., 1994, Katahira ve ark., 1997, Fujita ve ark., 2000).

Enterotoksin salınımını regüle eden *cpe* geni hem kromozomal hem de plazmidal olabilmektedir. Gıda zehirlenmelerine neden olan etkenlerde *cpe* geninin kromozomal olarak taşındığı, diğer hastalıklar ve hayvanlardan elde edilen suşlarda plazmidal olduğu ortaya konmuştur (Rood, 1998, Brynestad ve ark., 1997). *Cpe* genini kromozomal olarak taşıyan etkenlerin vejetatif formlarının, sporlarının ve ürettikleri enterotoksinlerin, plazmidal olanlara oranla sıcaklığı daha dirençli olduğu bildirilmektedir (McClane, 2007).

1.7. *Clostridium perfringens*'in Kontaminasyon Kaynakları

C. perfringens, toprakta, suda, insan ve hayvanların bağırsak kanalında bulunabilen, ubiquiter özellikte bir mikroorganizmadır. Bu özelliği bulaşmada büyük önem taşır. Gıdaların *C. perfringens* ile başlıca kontaminasyon kaynaklarını fekal kalıntılar, toz, toprak ve atık sular oluşturur (Jay ve ark., 2005, Garcia ve Heredia, 2009). Özellikle karkasın ve et ürünlerinin kesim ve işleme sırasında dışkı ve toprak ile temas etmesi sonucu *C. perfringens* kontaminasyonu şekillenmektedir. Etken spor formuna

dönüşebildiği ve çevresel şartlara dirençli olduğu için, uzun süre varlığını korumakta ve kontaminasyona neden olmaktadır (Linch ve ark, 2006).

Her ne kadar *C. perfringens* ubiquiter yayılım gösterse de gıda kaynaklı hastalıklara neden olan ve *cpe* genini taşıyan etken sayısı oldukça düşüktür. Toprak, su, dışkı ve hayvansal gıdalarda *cpe+* suşların oranının % 5'i geçmediği bildirilmektedir (McClane, 2007).

1.7.1. Toprak

C. perfringens toprak mikroflorasının bir parçasıdır. Etkenin topraktaki düzeyinin sadece toprağın fizikokimyasal yapısıyla ilişkili olmadığı, organik kirliliğe de bağlı olduğu ortaya konmuştur. Toprakta *C. perfringens*'in spor formları vejetatif formlarına göre daha yüksek oranda izole edilmektedir (Voidarou ve ark., 2011).

Li ve ark.'ın (2007) yapmış olduğu bir çalışmada farklı bölgelerden alınan toprak örneklerinde *C. perfringens*'in vejetatif ve spor formlarının varlığı ve *cpe* geni taşıma oranı araştırılmıştır. 502 toprak örneğinin % 68,3'ünde etkenin vejetatif formları, % 75,1'inde ise spor formları tespit edilmiştir. Vejetatif hücrelerin 11'inin, sporlarında 25 adet *cpe* geni taşıdığı ortaya konmuştur. Voidarou ve ark.'ın (2011) yapmış olduğu bir diğer çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiş, incelenen toprak örneklerinin % 45'inde *C. perfringens*'in sporları izole edilirken yalnızca % 11'inde vejetatif hücrelere rastlanmıştır.

Desmarais ve ark.'ın (2002) yapmış olduğu başka bir çalışmada da etkenin 50 cm toprak derinliğine kadar canlılığını koruduğu ve yumuşak toprakta (g'da) 10^4 oranına kadar yükseldiği bildirilmiştir.

1.7.2. Su

Etkenin bir diğer bulaşma yolu da su kaynakları ve atık sularıdır. Etkenin hem vejetatif hem de spor formlarının sıklıkla yüzeyden çok dip kısımlarda veya tabanda bulunduğu bildirilmektedir (Bezirtzoglou ve ark., 1997).

Payment ve Franco'nun (1993) yaptığı çalışmada, içme suyu elde edilen nehirden alınan örneklerde (400 ml'de) 10^5 düzeyinde vejetatif hücrenin ve aynı oranda spor formun tespit edildiği bildirilmiştir. Bezirtzoglou ve ark.'ın, 1996' da yaptıkları çalışmada bir nehirden alınan örneklerin % 72'sinin *C. perfringens* sporları taşıdığını, örneklerden % 5,5'nin de 10^2 düzeyinde vejetatif hücrelerle kontamine olduğunu tespit etmiştir.

Lisle ve ark'ın (2004) yapmış olduğu çalışmada arıtılmamış kanalizasyon sularında (100 ml'de) *C. perfringens* düzeyinin 10^4 olduğu ortaya konmuştur. Hill ve ark.'nın (1996) yaptığı çalışmada da kanalizasyon sedimentlerinden alınan örneklerde (cm²'de) 10^3 düzeyine kadar *C. perfringens* izole edilmiştir.

1.7.3. Dışkı

C. perfringens bir çok evcil hayvan ve insan dışkısından farklı seviyelerde izole edilmektedir. İnsanlarda diğer anaerobik mikroorganizmalarla karşılaştırıldığında düşük düzeylerde olduğu bildirilmiştir. Sağlıklı bireylerde dışkıda varlığı 10^3 - 10^4 /g arasında değişmektedir (Labbe, 1989).

Heikinheimo ve ark.'ın (2006) yapmış olduğu çalışmada, Finlandiya'daki gıda işletmelerinde çalışan ve herhangi bir gastrointestinal semptom göstermeyen 136 personelden toplanan dışkı örneklerinin 25'inde *cpe+* *C. perfringens*'e rastlandığı bildirilmiştir.

Mohamed ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada 40'ı diyaretik, 20'si semptom göstermeyen bireylerden alınan toplam 60 dışkı örneğinde *C. perfringens* varlığını ve toksin genlerini araştırmışlardır. Diyaretik bireylerin % 37,5'inde *C. perfringens* tespit etmiş ancak içlerinden yalnızca 2 tanesinin *cpe+* olduğunu bildirmişlerdir.

Gastrointestinal semptom göstermeyen bireylerden alınan örneklerden ise sadece 3 tanesinde *C.perfringens* saptamış ve hiçbirinin *cpe* geni taşımadığını ortaya koymuşlardır.

Carman ve ark.'ın (2008) yapmış olduğu başka bir araştırmada da 43 sağlıklı bireyden alınan dışkı örneğinin 27'sinde (% 63) *C. perfringens*'in vejetatif veya spor formlarının tespit edildiği bildirilmiştir. Dışkı örneklerinde *C. perfringens* düzeylerinin 10^3 - 10^7 /g arasında değiştiği de ortaya konmuştur.

Gurjar ve ark.'ın (2008) yapmış olduğu çalışmada 307 sığır dışkısı örneği incelenmiş bunlardan 241 tanesinin *C. perfringens* ile kontamine olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen örneklerin % 93' ünün Tip A olduğu ve sadece 11 tanesinin (% 4,6) *cpe* geni taşıdığı bildirilmiştir.

Garmory ve ark. (2000) farklı hayvan türlerinin dışkılarından izole ettikleri *C. perfringens*'leri toksin tiplerine göre sınıflandırmıştır. Koyun dışkılarından izole edilen 39 izolattan 34 tanesinin tip A (*cpa*+) ve 5 tanesinin Tip D (*cpa* ve *etx*), domuz dışkı örneklerinden izole edilen 40 örnekten de 36'sının Tip A (*cpa*+) ve 4 tanesinin Tip C (*cpa* ve *cpb*+) olduğu tespit edilmiştir. Sığır dışkılarından elde edilen 20 izolattan sadece bir tanesinin Tip E olduğunu (*cpa* ve *iA*+) geri kalanlarının Tip A olarak sınıflandırıldığını bildirmişlerdir. Çalışmada incelenen bütün örneklerin sadece % 4'ünde *cpe* geni bulduklarını da kaydetmişlerdir.

C. perfringens'in, tavukların bağırsak kanalında yüksek oranda bulunduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda tavukların bağırsak kanalında *C. perfringens* varlığı % 75-95 gibi yüksek oranlarda bulunmaktadır. Bunun en önemli nedenleri arasında, etkenin tavuklarda erken yaşta kolonize olmaya başlaması ve kuluçkadan itibaren yetiştiriciliğin bir çok noktasında kontamine olabilmesi yer almaktadır (Immerseel ve ark., 2004).

Heikinheimo ve Korkeala (2005) yapmış oldukları çalışmada broyler dışkılarından izole ettikleri 118 *C. perfringens*'in taşıdığı toksin genlerini araştırmışlardır. 118 örneğin hepsi *cpa* pozitif bulunurken hiçbirinde *cpb*, *etx*, *iA* veya *cpe* genine rastlanmadığı bildirilmiştir.

1.8. *Clostridium perfringens*'in Gıdalarda Varlığı

C. perfringens, gelişmek ve çoğalmak için ihtiyacı olan 13-14 aminoasit ile 5-6 vitamin ve mineral maddeyi (biotin, pantotenik asit, pridoksal, adenin gibi) kendi sentezleyemediği için dışarıdan almak zorundadır. Bu nedenlesıklıkla bu maddeleri yeterli oranda içeren, et veya et ürünlerinde bulunur (Novak ve Juneja, 2002).

1.8.1. Kırmızı et ve ürünleri

Stagnitta ve ark.'ın (1999) yapmış olduğu çalışmada marketlerden toplanan 301 et ürünü (kıyma, hamburger köftesi ve taze sosis) incelenmiş ve 92 tanesinin (% 30,56) *C. perfringens* ile kontamine olduğu tespit edilmiştir.

Miki ve ark. (2008) yapmış oldukları çalışmada farklı et ve et ürünlerinde *C. perfringens* varlığını araştırmış, sığır etlerinde % 54,3, sığır kıymalarında % 86,4 ve koyun etlerinde % 33,3 oranında kontaminasyon tespit etmişlerdir. Sığır etlerinden izole edilen suşların sadece bir tanesinin *cpe* geni taşıdığını da ortaya koymuşlardır.

Wen ve McClane'in (2004) yapmış olduğu araştırmada bir çok farklı gıda örneği *C. perfringens* yönünden analiz edilmiş ve elde edilen izolatların toksin tiplendirmesi yapılmıştır. İncelenen 144 domuz eti örneğinin 56'sında (% 27) etken izole edilmiş ve 3 tanesinin *cpe* geni, 5 tanesinin de $\beta 2$ toksin geni taşıdığı bulunmuştur. Domuz kıymalarından alınan örneklerde *C. perfringens* düzeyi % 61 olarak, daha yüksek oranda bulunmuştur. Bu izolatlardan da 7 tanesinin $\beta 2$ toksin geni taşıdığı, sadece 1 tanesinde *cpe* geni olduğu bildirilmiştir.

Aynı çalışmada incelenen 83 sığır eti ve 108 sığır kıymasında, sırasıyla % 21 ve % 23 oranında *C. perfringens* saptanmıştır. Elde edilen izolatların hiçbirisinin *cpe* geni taşımadığı ortaya konmuştur. Benzer şekilde, koyun etinden alınan 24 örneğin % 38'inin kontamine olduğu ancak hiçbir izolatın *cpe* geni taşımadığı bildirilmiştir.

Çalışmanın devamında et ürünü olarak domuz jambonu ve sosisler incelenmiş, 12 domuz jambonu örneğinde *C. perfringens*'e rastlanmamıştır. 59 sosis

örneğinin ise 14'ü (% 24) kontamine bulunmuştur. Sosis örneklerinden elde edilen izolatların 1 tanesinin $\beta 2$ toksin geni taşıdığı da belirlenmiştir.

Lin ve Labbe'nin (2003) yapmış olduğu çalışmada analiz edilen 66 et ve et ürünü örneğinin 24'ünde (% 36) *C. perfringens* tespit edilmiş, ancak izolatların hiçbirinde *cpe* genine rastlanmamıştır. *C. perfringens* bulunan ürünler koyun eti, sığır kıyması, sığır burger, domuz patesi, tavuk boynu, domuz kıyması, sığır ciğeri, tavuk eti, sosis ve hindi bacağı olarak bildirilmiştir.

Miwa ve ark. (1998), inceledikleri 50 sığır ve 50 domuz eti örneğinden sırasıyla % 16 ve % 10 oranında *C. perfringens* tespit etmiş, domuz etlerinde enterotoksijenik suşa rastlamadıklarını, sığır etlerinden elde ettikleri izolatlardan ise 1 tanesinin enterotoksijenik olduğunu kaydetmişlerdir.

1.8.2. Kanatlı eti ve ürünleri

C.perfringens oranı kanatlı eti ve ürünlerinde de, kanatlıların bağırsak kanalında olduğu gibi yüksektir. İncelenen kanatlı eti örneklerinde % 84' e kadar çıktığını bildiren çalışmalar mevcuttur (Bean ve ark.,1996).

Nowell ve ark. (2010) yapmış oldukları çalışmada 64 taze tavuk etinden 42'sinde (% 66), 24 donmuş ürünün de (tavuk but ve kanat) 16'sında (% 67) *C. perfringens* tespit etmiştir.

Miki ve ark. (2008) yapmış oldukları çalışmada tavuk eti, tavuk kıyması ve ördek etinde *C. perfringens* varlığını araştırmış, sırasıyla kontaminasyon düzeylerini % 97, % 100 ve % 100 olarak tespit etmişlerdir. Tavuk eti ve tavuk kıyması örneklerinden izole ettikleri etkenlerin 2'ser tanesinin *cpe* geni taşıdığını da ortaya koymuşlardır.

Wen ve McClane, 2004' de yaptıkları çalışmada 11 farklı ürün grubundan 887 örneği *C. perfringens* yönünden incelemiştir. Bunlar içerisinde yer alan 68 hindi örneğinin 19'unun (% 28) etkenle kontamine olduğunu ve izolatlardan 6 tanesinin $\beta 2$ geni, 2 tanesinin de *cpe* geni taşıdığını bildirmiştir. Araştırma kapsamında analiz

edilen 147 tavuk eti örneğinde ise kontaminasyon düzeyinin % 38 olduğu, bunlardan 27 örnekte $\beta 2$ geninin ve 1 örnekte de *cpe* geninin varlığı ortaya konmuştur.

Lin ve Labbe (2003) farklı ürünler üzerinde yaptıkları çalışmada, marketlerden aldıkları 19 kanatlı etinin 5'inde *C. perfringens* tespit ettiklerini ancak bunlardan hiçbirinde *cpe* genine rastalamadıklarını bildirmişlerdir.

Çakmak ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada inceledikleri 40 tavuk kıyması örneğinin 28'inden (% 70,0), 40 tavuk burger örneğinin de yalnızca 1'inden (% 2,5) *C. perfringens* izole ettiklerini bildirmiştir.

Miwa ve ark (1998) yapmış oldukları çalışmada, marketlerden toplanan 50 tavuk eti örneğinin 42'sinde (% 84) *C. perfringens* izole etmiş, ancak bunlardan sadece 6 tanesinin (% 12) enterotoksijenik özelliğe sahip olduğunu ortaya koymuşlardır.

Erol ve ark.'ın (2008) yaptıkları araştırmada 180 hindi eti örneğinden 22 adet *C. perfringens* elde edilmiş, izolatların taşıdığı toksin genleri araştırılmıştır. Elde edilen izolatların hiçbirinde *cpb*, *etx*, *iA*, *cpe* ve *cpb2* genlerinin bulunmadığı bildirilmiştir.

1.8.3. Su ürünleri

Rahmati ve Labbe'nin (2008) yapmış olduğu çalışmada, incelenen 347 çiğ ve işlenmiş deniz ürünüde *C. botulinum*, *C. perfringens* ve *B. cereus* varlığına bakılmıştır. Örneklerden 17 tanesinin *C. perfringens* ile kontamine olduğu ve bunlardan bir tanesinin de enterotoksin geni taşıdığı ortaya konmuştur.

Edwards ve ark. (1998) kanalizasyonun boşaldığı bölge civarındaki deniz canlıları ve balıkların bağırsak içeriklerinde *C. perfringens* varlığını araştırmıştır. Yapılan analizlerde balıkların bağırsak kanalında *C. perfringens* tespit edilememiştir, ancak tunikatalarda % 100, deniz kestanelerinde % 83, deniz yıldızlarında % 32, midye ve istidirdyelerde % 90 oranında etkene rastladıklarını bildirmişlerdir.

Wen ve McClane'in (2004) yaptığı çalışmada incelenen 113 balık eti örneğinde % 30 oranında *C. perfringens*'e rastlanmıştır. Elde edilen izolatların 3 tanesinde *cpe* geni saptandığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada analiz edilen 30 karides numunesinden 5'inin (% 17) *C. perfringens* ile kontamine olduğu ancak, bu izolatların hiçbirinin *cpe* geni taşımadığı ortaya konmuştur.

Lin ve Labbe (2003) yaptıkları çalışmada 18 deniz ürünü örneğinden (mezgit, istiridye, somon, midye gibi) % 28 oranında *C. perfringens* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Elde edilen izolatlar *cpe* geni yönünden değerlendirilmiş ve hiçbirisinin enterotoksijenik olmadığı belirlenmiştir.

1.8.4. Diğer gıdalar

Baharatların elde edilişi ve üretim şekilleri göz önünde bulundurulduğunda, topraktan gelen mikroorganizmalar yönünden kontaminasyon riski taşıdıkları bilinmektedir. *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp. ve *C. perfringens* baharatlarda bulunabilecek önemli gıda patojenleridir. Yapılan çalışmalar baharatlarda *C. perfringens* oranının % 0,6'dan % 58'e kadar değiştiğini göstermektedir. Kontaminasyon düzeyinin 10^4 'e kadar bulunduğu çalışmalar mevcuttur. *C. perfringens* tarçın, hindistan cevizi, kırmızıbiber, karabiber, beyazbiber, kekik ve zencefil gibi baharatlardan sıklıkla izole edilmektedir (Heikinheimo ve ark., 2000, Ridell ve ark.,1998, Aguilera ve ark, 2005, Grouch ve Golden, 2005).

Tham ve ark.'ın (1990) yapmış olduğu çalışmada da 198 keçi peyniri örneğinden 7 tanesinin 10^2 kob/g düzeyinde *C. perfringens* ile kontamine olduğu bildirilmiştir.

1.9. *Clostridium perfringens*'in Neden Olduğu Hastalıklar

Clostridium perfringens, ürettiği çeşitli toksinler ile insanlarda gazlı gangrene ve birbirinden farklı iki tip gıda enfeksiyonuna neden olurken, bir çok hayvan türünde

enterotoksemi, nekrotik enteritis gibi değişik hastalıklar meydana getirmektedir (Andersson ve ark., 1995).

1.9.1 *Clostridium perfringens* Tip A Kaynaklı Gıda İnfeksiyonu

Gıda infeksiyonu, *cpe* geni taşıyan *Clostridium perfringens* Tip A ile kontamine gıdaların tüketilmesi sonucu oluşmaktadır. Semptomlar, kontamine gıdanın tüketilmesinden 8-24 saat sonra başlamakta ve hafif seyreden infeksiyon genelde 48 saat içerisinde sonlanmaktadır. En tipik semptomlar, karın krampları ve diyare iken, nadiren ateş ve kusma görülür (Hobbs ve Roberts, 1993, Brown, 2000, Hayes, 1995). *C. perfringens* kaynaklı gıda infeksiyonlarında mortalite oldukça düşüktür. Ölüm çok genç, çok yaşlı ya da hasta bireylerde görülmektedir (Ray, 2003).

Clostridium perfringens kaynaklı gıda infeksiyonlarının patogeneğinde gıdalara uygulanan yanlış ısıtma ve soğutma işlemleri önemli rol oynamaktadır. Gıdaların büyük porsiyonlar halinde pişirilmesi, yavaş soğutulması, uzun süre düşük sıcaklıklarda bekletilmesi ve yetersiz ısı işlemi uygulanarak yeniden servis edilmesi, etkenin vejetatif forma dönüşmesine ve çoğalmasına uygun ortam sağlamaktadır (Ray ve Bhunia, 2008).

Gıdalarla alınan *C. perfringens*'in vejetatif formları, mide asidinin etkisiyle yok olmaktadır, ancak gıdadaki mikroorganizma sayısının $> 10^6$ olması durumunda bazı hücreler mide pasajından canlı kurtularak ince bağırsağına geçip, burada infeksiyona neden olacak enterotoksin üretmeye başlamaktadır (McClane, 2007). İnce bağırsakta enterotoksin açığa çıktığında, epitel hücrelere bağlanmakta, oluşturduğu doku hasarını takiben, sıvı ve iyon kaybı görülmektedir. Bu durum klinik olarak karın krampları ve diyare şeklinde yansımaktadır (McClane ve Chakrabarti, 2004). Enterotoksinler 60 °C de 5 dakikada inaktif olduğundan, gıdalarda önceden oluşan toksinlerin infeksiyona neden olmadığı bilinmektedir (Novak ve Juneja, 2002).

1.9.2. Enteritis Nekrotikans

C. perfringens tip C tarafından üretilen β -toksinin neden olduğu enteritis nekrotikans, tip A kaynaklı gıda infeksiyonuna oranla daha az görülen ancak daha ciddi seyirli bir hastalıktır. Hastalık ilk kez II. Dünya Savaşı sonrasında Almanya’da ortaya çıkmış ve “Darmbrand” olarak adlandırılmıştır. 1960’lı yıllarda Papua Yeni Gine’nin yüksek bölgelerinde yaşayan ve proteinden fakir diyetle beslenen insanlarda Pig bel olarak bilinen, endemik enteritis nekrotikans olguları görülmüştür (Severin ve ark, 1984).

En son 1987 yılında Tayland Kamboçya sınırında şiddetli enteritis nekrotikans olguları şekillenmiş, bundan sonra Malezya, Endonezya, Hindistan, Bangladeş, Uganda, Gana, Nijerya gibi az gelişmiş ülkelerde sporadik vakalar bildirilmiştir (Sakurai ve Nagahama, 2006).

β -toksinin tripsin ile kolayca inaktive olması, enteritis nekrotikansın gelişmiş ülkelerde daha az görülmesinin en önemli sebeplerinden birisidir. Proteince zengin diyetlerle beslenen bireylerde, bağırsaktan salınan tripsin enzimi, toksinin etkisini ortadan kaldırmaya yeterli olmaktadır. Hastalığın patogenezinde önemli rol oynayan bir diğer faktörde, tripsin inhibitörleridir. Tatlı patates gibi yüksek oranda tripsin inhibitörü içeren diyetlerle beraber *C.perfringens* ile kontamine gıdaların tüketilmesi hastalığın oluşmasına neden olmaktadır (Vidal ve ark., 2008).

Enteritis nekrotikans, *C. perfringens* ile kontamine gıdanın tüketilmesinin ardından 1-5 gün içerisinde görülen ciddi abdominal kramplar, kanlı diyare, kusma gibi semptomlarla karakterizedir. Bağırsakta şekillenen nekrotik yangının, ilerleyen aşamalarda bağırsak obstrüksiyonları ve sistemik toksemi sonucu ölümlere neden olduğu bilinmektedir. Hastalığın mortalitesi % 15-25 arasında değişmektedir (Brynsted ve Granum, 2002).

1.9.3. Gazlı Gangren

Gazlı gangren, ateş, belirgin ağrı, lokal ödem, miyonekroz ve infeksiyon bölgesinde gaz oluşumuyla karakterize, hayati tehlike oluşturan, akut bir hastalıktır. Hastalığın oluşumuna neden olan önemli etkenlerden biri de *C.perfringens* Tip A'dır. Etkenin özellikle kasları etkilemesinden dolayı hastalığın bir diğer adı da "Clostridial Miyonekroz"dur (Urschel, 1999).

Gazlı gangren, I. Dünya Savaşı sırasında savaş alanındaki yaralı askerlerin büyük bir kısmında görülmüştür. Yine II. Dünya Savaşı gibi bir çok savaş alanında da bu hastalıktan kaynaklanan ölümlere rastlanmıştır. Savaş alanları dışında hastalık, travmatik yaralanmalar veya cerrahi müdahalelerden sonra oluşmaktadır. Diyabetli hastalarda, periferik vasküler hastalığı olan bireylerde ve gastrointestinal tümör olgularında, travma veya cerrahi müdahale olmadan da şekillendiği bildirilmiştir (Titball, 2005, Brook ve Fraizer, 1998).

Hastalığın patogenezinde iki önemli durum söz konusudur. Bunlardan ilki, etkenin toprak veya diğer çevresel kotaminantlardan travma veya cerrahi müdahale sonucu oluşan yaradaki yumuşak dokuya ulaşması, diğeri ise yaralanan bölgelerde kan akımının bozulmasına bağlı oluşan oksijenden fakir alanların etkenin üremesi için ideal ortam oluşturmalarıdır. *C. perfringens* Tip A'nın, ürettiği α -toksin yanında perfringolizin O gibi toksinlerinin de gazlı gangren oluşumunda önemli rol oynadığı bilinmektedir (Flores-Di'aza ve Alape-Giro'n, 2003, Hart ve Strauss, 1990, Stevens ve Bryant, 2002).

1.9.4. Diğer Hastalıklar

C. perfringens tip A'nın insanlarda gıda kaynaklı infeksiyonlar yanında antibiyotik ilişkili diyare ve sporadik diyareye neden olduğu bilinmektedir. İlk kez 1984'de *C. difficile* toksinlerinin bulunmadığı antibiyotik ilişkili diyare vakalarından *C. perfringens*'in enterotoksijenik suşları izole edilmiştir. Yaşlılarda görülen sporadik diyare vakalarından da etkenin tespit edilmesiyle, gıda kaynaklı olmayan diyarel

hastalıkların % 20'sinden *C. perfringens*'in sorumlu olduğu ortaya konmuştur (Modi ve Wilcox, 2001, Asha ve Wilcox, 2002).

Gıda kaynaklı olmayan diyarel hastalıklarda görülen semptomlar, gıda kaynaklı olanlara benzerlik göstermektedir ancak semptomların daha uzun süreli ve ciddi seyirli olduğu bildirilmektedir. Semptomlar, gıda infeksiyonunda olduğu gibi tipik değildir, abdominal ağrı ve diyare (bazen kanlı ve mukuslu) ile karakterizedir. Gıda kaynaklı olmayan diyare vakalarından izole edilen suşların plazmidal *cpe* geni taşıdığı da tespit edilmiştir (Sparks ve ark., 2001, Collie ve McClane, 1998).

C. perfringens'in farklı tipleri, insanlar dışında bir çok hayvan türünde de değişik hastalıklar meydana getirmektedir. Hayvanlarda gözlenen hastalıklar ve bunları meydana getiren toksinler Çizelge 1.7'de verilmiştir (Songer, 1996, Hatheway, 1990, Songer, 2010).

Çizelge 1.7. *C.perfringens* toksinleri ve hayvanlarda oluşturduğu hastalıklar (Songer, 1996, Hatheway, 1990, Songer, 2010)

Tip	Toksinler	Hastalık
A	α	Kümes hayvanlarında-Nekrotik enteritis Sığır ve koyunlarda-Enterotoksemi Domuzlarda- Nekrotik enterokolitis Atlarda- Kolitis Köpeklerde-Hemorajik gastroenteritis
B	α, β, ϵ	Yeni doğan kuzularda-Dizanteri Kuzularda- Kronik enterit Buzağı ve taylarda-Hemorajik enteritis Koyunlarda-Hemorajik enterotoksemi
C	$\alpha, \beta,$	Taylarda-Nekrotik enteritis Yeni doğanlarda-Hemorajik ve nekrotik enterotoksemi Koyunlarda- Akut enterotoksemi (struck)
D	α, ϵ	Koyunlarda-Yumuşak böbrek hastalığı Keçi ve oğlaklarda- Enterokolitis Sığırlarda-Enterotoksemi
E	α, ι	Tavşanlarda-enteritis

1.10. Gıda Kaynaklı *C.perfringens* İnfeksiyonlarının Epidemiyolojisi

Gıda kaynaklı *C. perfringens* infeksiyonlarının kısa sürmesi ve hafif şiddette seyretmesi nedeniyle rapor edilmeyen ve tanımlanmayan vaka sayısının yüksek düzeyde olduğu bilinmektedir. Çoğunlukla rapor edilen olgular toplu halde yemek tüketilen okul, hastane, restoran, otel, kantin ve yemekhane gibi yerlerde şekillenmektedir. Ancak çok sayıda insanın etkilendiği vakalarda araştırma ve raporlama yapılmaktadır. Buna rağmen *C. perfringens* bir çok ülkede gıda kaynaklı salgınlara neden olan ilk beş etken arasında yer almaktadır (McClane, 2007, Hayes, 1995, Gibbs, 2002).

CDC (Center for Disease Control and Prevention) raporlarına göre, ABD’de 2011 yılında, *C. perfringens* kaynaklı salgınlardan etkilenen insan sayısı 956 958 olarak bildirilmiştir. Yaklaşık 8 milyon insanın etkilendiği tüm gıda kaynaklı infeksiyon vakaları içerisinde *C. perfringens* 3. sırada yer almıştır (Anon., 2012e).

Avrupa’da *Clostridium*’lardan ileri gelen salgın sayısı 141 olarak bildirilmiştir. Bunlardan 129’unun *C. perfringens* kaynaklı olduğu saptanmış ve 3 235 kişinin etkilendiği rapor edilmiştir. İnfeksiyona neden olan gıdalar arasında % 27.1 ile ilk sırada açık büfe yemeklerin geldiği, bunu % 13.6 ile domuz eti ve ürünlerinin takip ettiği bildirilmiştir (Anon., 2011).

Avustralya’da 2010 yılında gerçekleşen 154 salgından 10 tanesinin nedeni *C. perfringens* olarak belirlenmiştir. 134 kişinin etkilendiği *C. perfringens* kaynaklı salgınlar, tüm vakalar içerisinde ikinci sırada yer almıştır. Salgınların büyük çoğunluğunun yaşlı bakımevlerinde şekillendiği de rapor edilmiştir (Anon., 2010a).

C. perfringens kaynaklı ilk büyük salgın 1943 yılında İngiltere’de meydana gelmiştir. Leicester da bulunan bir okulda *C. perfringens* ile kontamine tavuk eti ile hazırlanan yemeği tüketen 250 öğrencide gastrointestinal semptomlar görülmüştür (Hobbs, 1974). 1943 yılından sonra günümüze kadar görülen çeşitli *C. perfringens* vakaları Çizelge 1.8 de verilmiştir.

Çizelge 1.8. Çeşitli ülkelerde rapor edilen *C. perfringens* salgınları

Ülke	Yıl	Gıda	Vaka Sayısı	Kaynak
İngiltere	1943	Et suyu	250	Hobbs, 1974
ABD	1945	Tavuk	Bilinmiyor	McCLung, 1945
İngiltere	1966	Hindi eti	27 (1 ölüm)	Sutton ve Hobbs, 1967
Almanya	1969	Çikolata sosu	40	Erol, 2007
ABD	1984	Biftek	112	Gross ve ark., 1989
ABD	1985	Et suyu	599	Petersen ve ark., 1988
ABD	1987	Hindi eti	86	Erol, 2007
İskoçya	1989	Kıyma	58	Pollock ve Whitty, 1991
ABD	1990	Etli ve sebzeli çorba	42	Roach ve Sienko, 1992
ABD	1993	Sığır konservesi	86	Anon., 1994
ABD	1995	Hindi eti	100	Parikh ve ark., 1997
İngiltere	1995	Domuz eti	17	Regan ve ark., 1995
İtalya	1997	Ragu	25	Arcieri ve ark., 1999
Avustralya	1997	Püre	25	Tallis ve ark., 1999
Japonya	1998	Ispanak	30	Miwa ve ark., 1999
Almanya	1998	Kıyma	21 (2 ölüm)	Schalch ve ark., 2003
ABD	1999	Tavuk eti	20	Anon., 1999
İsviçre	2002	Sığır eti	55	Anon., 2012f
Japonya	2002	Sebzeli et yemeği	73	Ochiai ve ark., 2005
İsviçre	2003	Tavuk eti	10	Anon., 2012f
Fransa	2004	Bamya	29	Lederman ve ark., 2004
Avustralya	2006	Et yemeği	25	Young ve ark., 2008
Singapur	2006	Körili et yemeği	24	Loh ve ark., 2008
Fransa	2006	Tavuk eti	500	Anon., 2007
Avustralya	2008	Açık büfe	21	Gullan ve ark., 2009
İngiltere	2009	Tavuk ve koyun eti	134	Eriksen ve ark., 2010
Avustralya	2009	Domuz eti	52	Moffatt ve ark., 2011
ABD	2010	Tavuk eti	42	Anon., 2012g
Yeni Zelanda	2010	Kıyma	84	Anon., 2010b
Kanada	2011	Hindi eti	34	Anon., 2011
ABD	2012	Tahıl ve peynir	250	Anon., 2012h

1.11. Korunma ve Kontrol

Gıda kaynaklı *C. perfringens* infeksiyonlarının önlenmesinde çiftlikten sofraya gıda güvenliğinin temel prensipleri esas alınmalıdır. Etkenin ubiquiter özellik göstermesi, spor oluşturmaya ve çevresel şartlara direnç göstermesi, gıdaların kontaminasyon riskini arttırmakta, korunma ve kontrolü zorlaştırmaktadır (Mbata, 2005).

Bu kapsamda öncelikle, tavuk etleri sağlıklı hayvanlardan elde edilmelidir. Kesim işleminin hijyenik ve teknolojik koşullarda yapılması, alet-ekipmanlarla çapraz kontaminasyonun engellenmesi ve personel hijyenine özen gösterilmesi

gerekmektedir. Temizlik ve dezenfeksiyon uygulamaları düzenli olarak yapılmalıdır (Mulder, 1999, McSwane ve ark., 2003).

C. perfringens'in kontrolü için dikkat edilmesi gerekli en önemli nokta gıdalara uygulanan ısıtma ve soğutma işlemleridir. Gıdaların iyi pişirilmesi, pişirmeden hemen sonra tüketilmeyecekse 7 °C'nin altında soğutulması gerekmektedir. Gıdaların oda sıcaklığında bekletilmesi önlenmeli ve gıdalar servis öncesi 60 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda tutulmalıdır. Yeniden ısıtma işlemleri sırasında, gıdaların iç ısılarının en az 75 °C ye ulaşması sağlanmalıdır. Pişirme ve soğutma işlemleri küçük porsiyonlar halinde yapılmalı, donmuş gıdalar oda sıcaklığında çözündürülmemelidir (Genigeorgis, 1975, McCabe-Sellers ve Beattie, 2004, Feiner, 2006, Lawley ve ark., 2008).

Gıda güvenliğinin sağlanmasında tüketicilerin de üreticiler kadar önemli bir role sahip olduğu unutulmamalıdır. Bu nedenle tüketicilerin gıda infeksiyonları, gıda muhafazası, gıdaların hazırlanması ve mutfak hijyeni gibi konularda bilinçlendirilmeleri gerekmektedir (Medeiros ve ark., 2001).

GMP (İyi Üretim Uygulamaları), GHP (İyi Hijyen Uygulamaları) ve HACCP (Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları) gibi risk analizine dayalı sistemlerin üretimden, tüketime her aşamada uygulanması ile gıda infeksiyon ve intoksikasyonlarına neden olan etkenler kontrol altına alınabilmekte ve böylece gıda güvenliğinin sağlanmasıyla birlikte halk sağlığının korunması da gerçekleştirilebilmektedir (Gorris, 2005).

C. perfringens'in gıdalarda güvenilir metotlarla tespiti, identifikasyon ve antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi halk sağlığının korunması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada, piliç boyun derilerinde *C. perfringens*'in varlığı, mevsimsel dağılımının incelenmesi, elde edilen izolatların PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile doğrulanması, taşıdıkları toksin genlerinin tespiti ve izolatların antibiyotik direnç profillerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Bu çalışmada, üç farklı kanatlı kesimhanesinden (A, B, C) alınan piliç boyun derisi örnekleri materyal olarak kullanıldı. Çalışma kapsamında mevsimsel etki de dikkate alınarak Aralık, Ocak, Şubat ve Haziran, Temmuz, Ağustos aylarında, her ay 30 örnek olmak üzere, A kesimhanesinden 60, B kesimhanesinden 60 ve C kesimhanesinden 60 örnek alınarak toplam 180 boyun derisi incelendi.

Kesim sırasında aseptik koşullarda alınan örnekler soğuk muhafazada laboratuvar getirildikten sonra *C. perfringens* yönünden analiz edildi.

2.1.1.C. perfringens'in İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri ve Diğer Kimyasallar

Perfringens Enrichment Medium

Thioglycollate Medium (PEM) (Oxoid CM 0173)

Perfringens Selective Supplement (Oxoid SR0088E)

Hazırlanışı

Hazır besi yerinden 29,5 gr tartılarak 1 litre distile suda çözdürüldü. Besi yerinin pH değeri ($7,1 \pm 0,2$, 25°C'de) uygun olacak şekilde ayarlandı. Homojen olarak çözüldürülmüş besi yeri, 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 50 °C'ye soğutulduktan sonra üzerine 2 ml steril distile su ile süspanse edilmiş 2 vial *Perfringens* selective supplement ilave edilerek karıştırıldı.

Tryptose Sulphite Cycloserine Agar

Tryptose Sulphite Cycloserine (TSC) Agar (Oxoid CM587)

Perfringens Selective Supplement (Oxoid SR0088E)

Hazırlanışı

Hazır TSC agardan 23g tartılarak 500 ml distile su içerisinde çözdürülerek pH değeri ($7,6 \pm 0,2$) ayarlandı. Su banyosunda kaynatılarak eritildi ve 121°C 'de 10 dakika otoklavda sterilize edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 50°C 'ye soğutulduktan sonra üzerine 1 vial, 2 ml steril distile su ile süspanse edilmiş *Perfringens*(TSC) selective supplement ilave edilerek karıştırıldı. Steril petrilere yaklaşık 12-13 ml döküldü. Agar oda sıcaklığında donana kadar bekletildikten sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

Kanlı Agar

Columbia Blood Agar Base (Oxoid CM0331)

Hazırlanışı

Hazır besiyerinden 39 g tartılarak 1 lt distile suda çözündürüldü ve pH değeri $7,3 \pm 0,2$ 'ye ayarlandı. Su banyosunda kaynatılarak eritildi ve 121°C 'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 50°C 'ye soğutulduktan sonra üzerine 70 ml defibrine koyun kanı eklenerek % 7'lik olacak şekilde hazırlandı. Besi yeriler steril petrilere dökülerek 4°C 'de muhafaza edildi.

Lactose Gelatine Medium

Bileşim	Gram/Litre (g/l)
Pepton casein (Tryptone)	15
Yeast extract	10
Lactose	10
Na ₂ HPO ₄ 5	
Gelatine	120
Phenol red (%1'lik çözeltisi)	5 ml
Distile su	1000ml
pH	7.5± 0.2

Hazırlanışı

Jelatin hariç diğer bileşenler 1litre distile suda çözdürülerek, pH değeri kontrol edildi (7,5± 0,2). Daha sonra jelatin ilave edilerek su banyosunda eritildi. Hazırlanan besi yeri 16×150 mm tüplere 10'ar ml konularak otoklavda 121°C'de 15 dakikada steril edildikten sonra 4°C'de muhafaza edildi.

Motility Nitrate Medium (Fluka 14305)

Hazırlanışı

Hazır besi yerinden 23,5g tartılarak 1 litre distile suda çözdürülerek 5 ml gliserin ilave edildi. pH değeri (7,3 ± 0.1) ayarlandıktan sonra sıcak su banyosunda eritildi. Hazırlanan besiyeri 16×150mm tüplere 11 ml paylaştırılarak otoklavda 121°C'de 15 dakikadasteriledildikten sonra 4°C'de muhafaza edildi.

Griess-IlosvayAyıraçları

Griess-Ilosvay Solüsyonu (A)

Sulfanilic acid 0,8g/l

Acetic acid 5 N 100ml

Griess-Ilosvay Solüsyonu (B) α -naphthylamine 0,5g/l

Acetic acid 5N100ml

Hazırlanışı

Sülfanilik asitten 0,8g tartılarak 5N'lik 100 ml asetik asitte çözündürülerek Griess Ilosvay Solusyonu (A) hazırlandı. α -naftilaminden 0,5 g tartılarak 5N'lik 100 mlasetik asitte çözündürülerek Griess Ilosvay Solusyonu (B) hazırlandı.

Asit Fosfataz Testi

1Naphtyl phosphate sodium salt (Merck;8.22291.0100)

0,2g /l

Fast blue saltB (Merck;1.03191.0025)

4g/l

Hazırlanışı

Yukarıdaki maddeler 10 ml, 0,2 M sodyum sitrat buffer içerisinde çözündürülerek pH değeri 4,5'e ayarlandı. 1 saat 4 °C'de bekletildi.Solusyonlar 0,20 μ m'lik milipor filtrelerden (Sartorius Minisart, Goettingen, Germany) geçirilereksteril edildi ve buzdolabında 3 haftaya kadar muhafaza edildi.

Sodyum Sitrat Buffer Hazırlanışı

9,882g trinatium citrate x 2H₂O 20ml NaoH'de (1 mol/ l) çözündürüldükten sonra distile suyla 100 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 2:1 oranında 1 M HCl ile karıştırıldı.

Katalaz TestHidrojen peroksit (H₂O₂) Merck 1.08597.1000**Hazırlanışı**

Hazır %30'luk hidrojen peroksitten 3 ml alındı ve 27 ml distile suda karıştırılarak katalaz testinde kullanmak üzere %3'lük H₂O₂ solüsyonu hazırlandı.

AnaeroGen Gaz Kitleri (Oxoid, AN0025 A)

Anaerob ortam sağlamak amacıyla AnaeroGen(Oxoid AN 025A- AN 035A) ticari gaz kitleri kullanıldı.

2.1.2. *C. perfringens* İzolatlarının PCR Analizinde Kullanılan Kimyasallar

Taq DNA Polymerase Seti (Dr. Zeydanlı, Ankara, Türkiye)

Taq DNA polymerase	500 U (5 U/μl)
PCR Buffer	10 x
MgCl ₂	25 mM

dNTP Seti (Promega, Madison, ABD)

dATP	100 mM
dCTP	100 mM
dGTP	100 mM
dTTP	100 mM

Gene Ruler Seti

LadderDNA Marker 100bp (Dr. Zeydanlı, Ankara, Türkiye)

Bromphenol Blue Loading Dye (AppliChem-BioChemica, Darmstad, Almanya)

Primerler

Meer ve Songer (1997) tarafından bildirilen primerler HPLC saflıkta Alpha DNA (Quebec, Kanada) firmasına sentezletildi ve liyofilize olarak temin edilen primerler üretici firmanın önerdiği miktarlarda sterilbidistile su ile sulandırıldı.

Çizelge 2.1. Primerler

Gen	Büyüklik	Primerler	Primer dizisi (3'-5')
<i>cpa</i>	324	CPA F CPA R	GCTAATGTTACTGCCGTTGA CCTCTGATACATCGTGTAAG
<i>cpb</i>	196	CPB F CPB R	GCGAATATGCTGAATCATCTA GCAGGAACATTAGTATATCTTC
<i>cpb2</i>	567	CPB2 F CPB2 R	AGATTTTAAATATGATCCTAACC CAATACCCTTCACCAAATACTC
<i>cpe</i>	233	CPE F CPE R	GGAGATGGTTGGATATTAGG GGACCAGCAGTTGTAGATA
<i>etx</i>	655	ETX F ETX R	GCGGTGATATCCATCTATTC CCACTTACTTGTCTACTAAC
<i>ia</i>	446	IA F IA R	ACTACTCTCAGACAAGACAG CTTTCCTTCTATTACTATACG

TBE Solüsyonu (Tris-Borik Asit-EDTA)

10 X TBE Solüsyonu(DZ. TBE 10- 1, Lot No: 0803S7)

Tris	0,89 M
Borik asit	0,89 M
EDTA	0,02M

Hazırlanışı

Stok solüsyondan 100 ml alınarak distile su ile 1 litreye tamamlanıp 1 x TBE solüsyonu elde edildi.

Ethidium Bromide (% 0.1'lik)

Ethidium Bromide 10 mg/ml (AppliChem-GmbH, Darmstadt, Almanya)

Hazırlanışı

Stok solüsyonundan 1:9 oranında sulandırarak 1µg/ ml konsantrasyonda kullanıldı.

Agaroz Jel (Cambrex SeaKem LE Agarose, Rockland, ABD)

Agaroz jel (% 1,5'lık) hazırlamak için, agarozdan 0,9 g tartılarak 60 ml 1x TBE içerisinde 95°C su banyosunda homojen hale gelecek şekilde çözdürüldü ve yaklaşık 50°C'ye soğutuldu. İçerisine 60 µl ethidium bromide eklendi ve elektroforez küvetine (MINICELL EC 370 M) dökülerek kullanıma hazır hale getirildi.

2.1.3. *C. perfringens* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Testinde Kullanılan Besiyerleri ve Antibiyotik Diskleri

Mueller Hinton Agar (Oxoid CM 337)

Hazırlanışı

Hazır besiyerinden 38 g alınıp 1 litre distile suda çözündürülerek pH değeri 7,3 $\pm$ 0,2'ye ayarlandıktan sonra sıcak su banyosunda tamamen eritildi. 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra 50°C'ye kadar soğutuldu ve besi yeri steril petrilere yaklaşık 4 mm kalınlıkta dökülerek hazırlandı.

Antibiyotik Diskleri

Ampicillin (Oxoid CT0003B) 10 µg
 Chloramphenicol (Oxoid CT0013B) 30 µg
 Ciprofloxacin (Oxoid CT0425B) 5 µg
 Gentamicin (Oxoid CT0794B) 120 µg
 Nalidixic Acid (CT0031B) 30µg
 Penicillin G (Oxoid CT0043B) 10 U
 Tetracycline (Oxoid CT0054B) 30 µg
 Trimethoprim (Oxoid CT0076B) 5µg
 Vancomycin (Oxoid CT0058B) 30 µg

2.1.4. Test Suşları

Bu çalışmada, *C.perfringens*'in izolasyon, identifikasyon ve PCR analizlerinde *Streptococcus agalactiae* (Ref.No.: 55118 Inst. Pasteur), *C.perfringens* ATCC 13124 (*cpa* geni için), *C.perfringens* NCTC 8239 (*cpa,cpe* genleri için), *C.perfringens* ATCC 3626 (*etx, cpb* genleri için) ve *C.perfringens* CCUG 44727 (*iA* geni için) pozitif kontrol olarak kullanıldı.

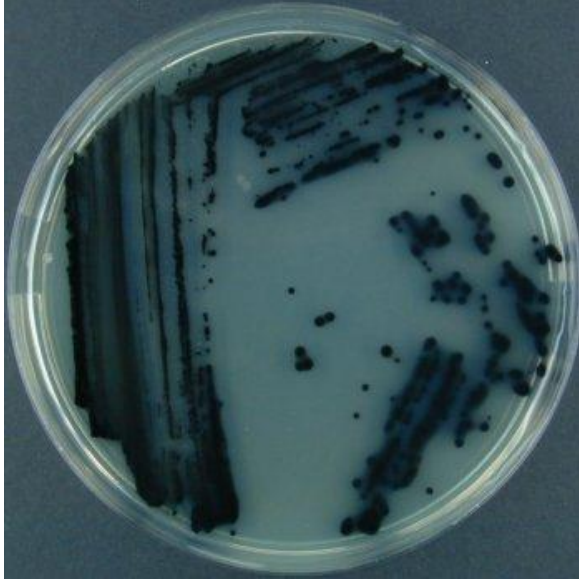
2.2. Yöntem

Bu çalışmada, kanatlı kesimhanelerinden kesim sırasında aseptik koşullarda alındıktan sonra soğuk zincir altında laboratuvara getirilen piliç boyun derisi örnekleri *C.perfringens* yönünden analiz edildi. Çalışma dört aşamada gerçekleştirildi. İlk aşamada numunelerden *C.perfringens* izolasyonu ve identifikasyonu, ikinci aşamada izolatların PCR ile doğrulanması, üçüncü aşamada toksin genlerinin belirlenmesi ve dördüncü aşamada da doğrulanmış *C.perfringens* izolatlarının antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi gerçekleştirildi. *C. perfringens* izolasyon ve identifikasyonunda, Schalch ve ark., (1996) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. İzolatların PCR analiziyle *cpa* geni baz alınarak doğrulanması ve toksin genlerinin tespit edilmesinde Meer ve Songer (1997) tarafından bildirilen primer çiftleri ve PCR protokolü kullanıldı. İzolatların antibiyotik direnç profilleri NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards - Klinik Laboratuvar Standartları Ulusal Komitesi) tarafından bildirilen disk difüzyon testine göre belirlendi (Anon., 2003).

2.2.1. *C. perfringens*'in İzolasyonu

Her bir piliç boyun derisi örneğinden aseptik koşullarda steril plastik poşetlere 10 gram tartılarak 90 ml *Perfringens* Enrichment Medium (PEM) ilave edildi. Stomacherde (AES Laboratoire easyMIX, Combourg, Fransa) 2 dakika homojenize edildikten sonra 46 °C'de 20 saat süre ile anaerob

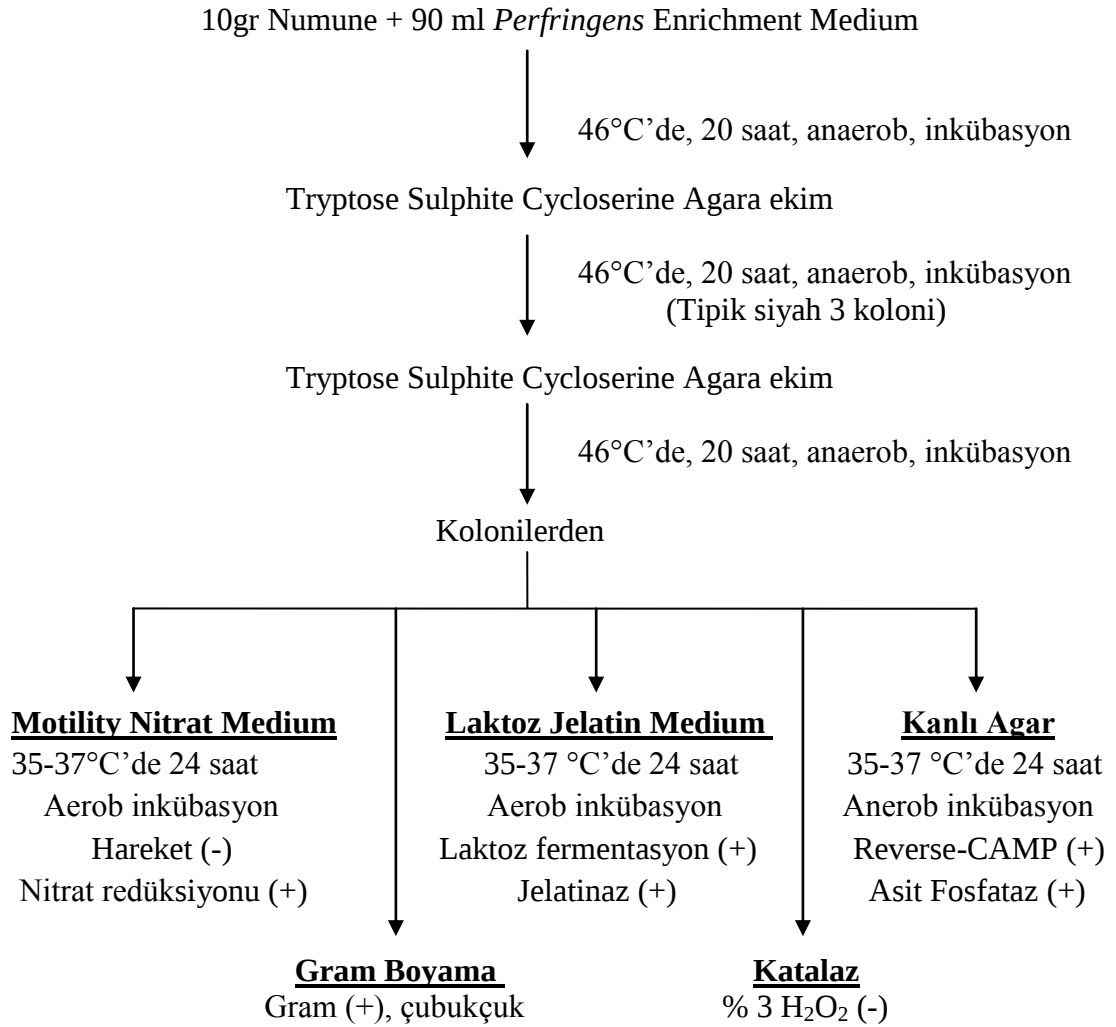
koşullarda(AnaeroGen[™]GazKitleri, OXOIDAN0025A) inkübasyona bırakıldı. Zenginleştirme sonrası PEM'den öze dolusu alınarak Tryptose Cycloserine Agar(TSC) (OXOID CM 587) yüzeyine ekim yapıldı ve plaklar anaerob koşullarda 46 °C'de 20 saat inkübe edildi.



Şekil 2.1. TSC agarda *C. perfringens* şüpheli kolonilerin görünümü.

2.2.2. *C. perfringens*'in İdentifikasyonu

İnkübasyon sonunda üreyen siyah renkli *C.perfringens* şüpheli kolonilerden 3-5'i seçilerek identifikasyon için TSC agara geçildi ve plaklar 46 °C'de 20 saat anaerob koşullarda inkübe edildi. Bu işlem sonunda Şekil 2.2'deki biyokimyasal testler yapılarak; Gram pozitif, katalaz negatif, Reverse - CAMP pozitif, laktozu fermente edebilen, jelatinaz aktivitesi bulunan, hareketsiz ve nitratı indirgeyebilen koloniler *C.perfringens* olarak değerlendirildi.



Şekil 2.2. *C. perfringens*'in izolasyon ve identifikasyon şeması

2.2.2.1. Gram Boyama

Şüpheli koloniler lam üzerinde preparatları hazırlanarak alevde tespit edildi. Preparatlar kristal viyole ile 1-2 dakika boyandıktan sonra saf su ile yıkandı. Birdakika lugol çözeltisi uygulamasını takiben önce % 96'lık alkol ile daha sonra saf su ile yıkandı. Yıkanan preparatlar sulu karbon fuksin çözeltisi ile 10-20 saniye boyandıktan sonra tekrar saf su ile yıkayıp kurutuldu.

Bu şekilde Gram boyaması yapılan preparatlar mikroskopun (Nikon Alphaphot-2, Japonya) immersiyon objektifinde incelendi ve mavi - mor renk

almış, çubukcuk formundaki vejetatif mikroorganizmalar *C. perfringens* olarak kabul edildi.

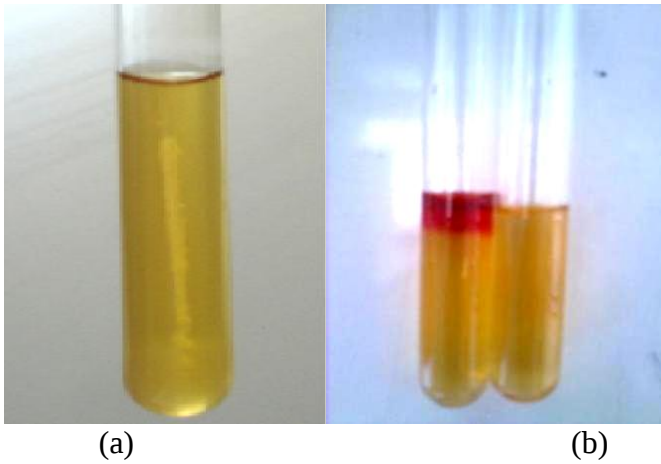
2.2.2.2. Katalaz Testi

Bir lam üzerinde, %3'lük H_2O_2 solüsyonu ile katı besiyerinden alınan şüpheli *C. perfringens* kolonisi karıştırıldı. 2-3 saniye içerisinde köpürme şeklindeki gaz oluşumunun görülmemesi katalaz negatif olarak değerlendirildi.

2.2.2.3. Nitrat Motilite Testi

TSC agardan alınan şüpheli koloniler iğne uçlu öze ile, içerisinde 11'er ml Motility Nitrat Medium bulunan tüplere dik olarak inokule edilerek 35-37°C'de 24 saat aerob koşulda inkübe edildi. Yalnızca inokule edilen hatta meydana gelen üreme hareket negatif olarak değerlendirildi.

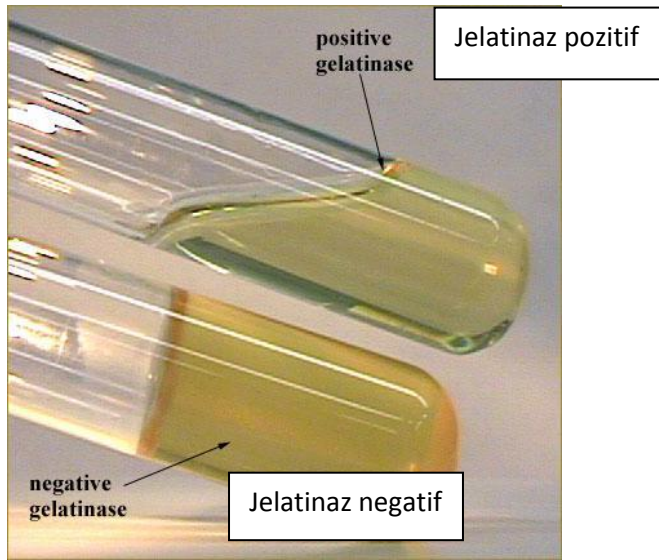
Aynı besi yeri üzerine 0,2'şer ml Griess Ilosvay A ve B reaktifleri damlatıldı. Reaktifin besiyeriyle temas ettiğikısımda kırmızı renk oluşumu nitratın nitrite indirgendiğini gösterdiğinden renk değişimi nitrat redüksiyon pozitif, her hangi bir renk oluşmaması ise nitrat redüksiyon negatif olarak değerlendirildi (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Hareket testi (a) ve nitrat redüksiyon testi (b)

2.2.2.4. Laktoz Jelatin Testi

Şüpheli koloniler içerisinde 10'ar ml laktoz jelatin medium bulunan tüplere inokule edilerek 35-37°C'de 24 saat aerob koşulda inkübe edildi. Gaz kabarcıklarının meydana gelmesi ve kırmızıdan sarıya renk değişikliğinin oluşması laktoz pozitif olarak değerlendirildi. Tüpler +4°C'de 1 saat soğutuldu ve jelatinin kıvamı kontrol edildi, sıvı halde ise pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 2.4).



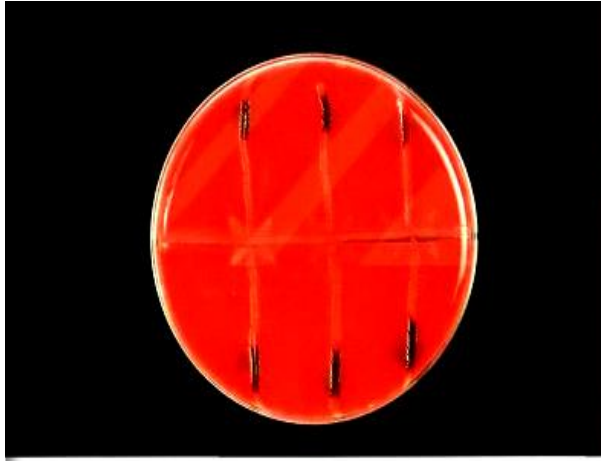
Şekil 2.4. Jelatinaz testi

2.2.2.5. Reverse –CAMP (Christie Atkins Munch Peterson) Testi

Bu test, defibrine koyun kanı ile hazırlanmış % 7'lik kanlı agarda *C. perfringens*'in referans suş *Streptococcus agalactiae* ile sinerjiktaki göstererek tipik hemoliz oluşturup oluşturmadığını tespit etmek için yapıldı. Bu amaçla iğne uçlu öze ile Columbia Blood Agar (Oxoid, CM 0331) ortasına, plağı ikiye bölecek şekilde *Streptococcus agalactiae* suşu çizildi. *C. perfringens* şüpheli izolatlar, referans suşun ekim hattına dikolarak fakat suşlara temas etmeden, birbirine paralel 2 cm aralıkla ekilerek 37°C'de 24 saat anaerob ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda referans suşa yakın yerde yarım ay şeklinde β-hemoliz zonu oluşturan izolatlar pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 2.5).

2.2.2.6. Asit fosfataz Testi

Reverse-CAMP testinin yapıldığı kanlı agardaki *C. perfringens* şüpheli koloniler üzerine fosfataz ayıracından birkaç damla damlatıldı. Kolonilerin 3 dakika içerisinde kahverengi-mor renge dönüşmesi pozitif olarak değerlendirildi(Şekil2.5).



Şekil 2. 5. Reverse-CAMP ve asit fosfataz test

2.2.3. PCR Tekniği

İzolatların PCR ile analizinde DNA ekstraksiyonu ve PCR koşulları optimize edildi. PCR tekniği kullanılarak ilk aşamada izolatlardaki *cpa* geni varlığı araştırıldı. İkinci aşamada ise multipleks PCR kullanılarak Meer ve Songer (1997) tarafından önerilen *cpa*, *cpb*, *etx*, *ia*, *cpe* ve *cpb2* gen sekansları esas alınarak toksin genleri yönünden moleküler karakterizasyon yapıldı.

2.2.3.1. DNA Ekstraksiyonu

Pozitif olarak değerlendirilen ve Cooked Meat Medium içerisinde muhafaza edilen izolatlar yine Cooked Meat Medium kullanılarak 37 °C’de, 24 saat anaerob ortamda zenginleştirildi. Kültürlerden 1’er ml eppendorf tüplere alınarak 10 °C’de 12 000 g’de 3 dakika santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5417R,Hamburg, Almanya) edildi. Üstte kalan süpernatantsıvı atılarak tüpte kalan tortu üzerine 200 µl steril ultra saf su

ilave edildi ve vortekslendi (Ika, MI 1Minishaker, Wilmington, NC, ABD). Daha sonra örnekler su banyosunda (Memmert WB/OB 7-45, WBU45, Schwabagh, Almanya) 95°C’de 20 dakika bekletildi. Su banyosundan çıkartılan örnekler 12 000 g’de 3 dakika daha santrifüj edilerek DNA ekstraksiyonu tamamlandı. Elde edilen ekstraktlar PCR işlemi yapılana kadar -20°C’de muhafaza edildi.

2.2.3.2. *Cpa* geni için PCR amplifikasyonu

PCR karışımı 0,8 ml thermowell tüplerde (Corning 3749, Thermowell Gold PCR Tubes, USA) $MgCl_2$ içermeyen 10x PCR buffer (Dr. Zeydanlı, D2SB-15), 1,5 mmol l^{-1} $MgCl_2$ (Dr. Zeydanlı, D2MG-15), 0,12 mmol l^{-1} dNTP karışımı (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Promega U1515), 5 Unit *Taq* DNA polimeraz (Dr. Zeydanlı, D2TQ-5), 0,5 μ mol l^{-1} her bir *cpa* primerden ve 5 μ l örnek DNA olmak üzere toplam 25 μ l hacimde hazırlandı ve üstleri mineral yağ (Sigma M5904) ile kapatıldı.

Amplifikasyon, Thermal Cycler’da (Biometra Personal Cycler, Goettingen, Almanya) 94°C’de 1 dakika denatürasyon, 65°C’de 1 dakika primer bağlanması ve 72°C’de 1 dakika primer uzaması aşamalarından oluşan 35 siklus olarak gerçekleştirildi. Bu işlemler sonunda ampikonlar bir sonraki aşamaya kadar 4°C’de bekletildi.

2.2.3.3. Elektroforez

Amplifiye edilen DNA’ların saptanması amacıyla, her bir örneğe ait 10 μ l PCR ürünü 2 μ l boya (AppliChem-BioChemica) ile boyandı. Ethidium bromide (AppliChem GmbH) ile 1 μ l/ml oranında boyanmış olan % 1,5’lik agaroz jel (Cambrex SeaKem LE Agarose, Rockland, ABD) hazırlanarak, üzerine yine 1 μ l/ml oranında ethidium bromide ile boyanmış TBE solüsyonu konularak jel tamamen kaplandı. Daha sonra DNA marker (Dr. Zeydanlı, MD0312), 10’ar μ l hacimde ve 2 μ l Loading Dye ile boyanan pozitif kontrol (*C. perfringens* ATCC 13124), steril distile su ile hazırlanan negatif kontrol ve örnekler jeldeki kuyucuklara yüklenip elektroforezde (Biometra

Agagel-Maxi-System B15359) 100 voltta (Biometra Power Pack P25) 1 saat süreyle yürütüldü. Bu işlem sonunda, pozitif kontrol ve DNA Marker yardımıyla elde edilen spesifik DNA bantları UV-transilluminatörde (Biometra TII UV 9511011)tespit edildikten sonra örneklerle ilişkin jelin görüntülenmesi ve dokümantasyonu jelgörüntüleme sisteminde (Syngene Ingenius, Cambridge, İngiltere) yapıldı.

2.2.3.4 Multipleks PCR ile Toksin Genlerinin Tespiti

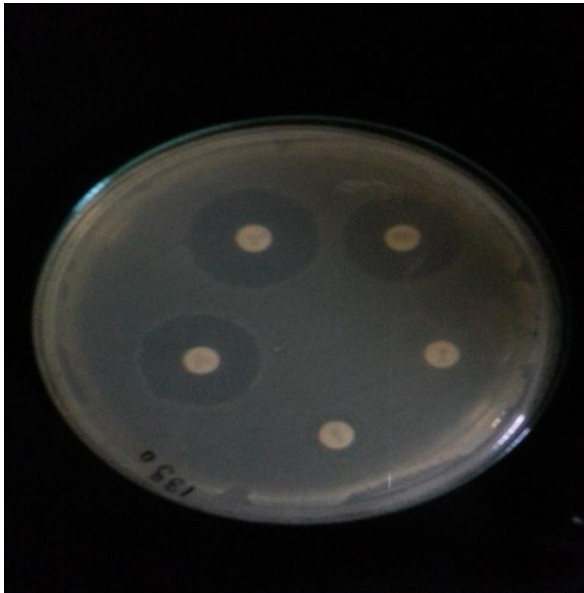
Multiplex PCR için, $MgCl_2$ içermeyen 10x PCR buffer (Dr. Zeydanlı, D2SB-15), $1,5 \text{ mmol l}^{-1}MgCl_2$ (Dr. Zeydanlı, D2MG-15), $0,12 \text{ mmol l}^{-1}$ dNTP karışımı (dATP,dCTP, dGTP, dTTP) (Promega U1515), 5 Unit *Taq* DNA polimeraz (Dr. Zeydanlı, D2TQ-5), $0,34 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ her bir *cpe* primerden, $0,36 \mu\text{mol l}^{-1}$ her bir *cpb* primerden, $0,36 \mu\text{mol l}^{-1}$ her bir *cpb2* primerden, $0,44 \mu\text{mol l}^{-1}$ her bir *etx* primerden, $0,5 \mu\text{mol l}^{-1}$ her bir *cpa* primerden, $0,52 \mu\text{mol l}^{-1}$ her bir *iA* primerden içerecek şekilde $50 \mu\text{l}$ hacimde master mix hazırlandı. Üzerine $10 \mu\text{l}$ örnek DNA eklenerek üzeri steril mineral yağ(Sigma M5904) ile kapatıldı. Thermal Cycler’da (Biometra Personal Cycler) 94°C ’de 1 dakika denatürasyon, 55°C ’de 1 dakika primer bağlanması ve 72°C ’de 1 dakika primer uzaması aşamalarını kapsayan 35 siklus’da ampilifikasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra ampikonlar 4°C ’de jel elektroforez işlemine kadar muhafaza edildi.

2.2.3.5. Elektroforez

Daha önce bahsedilen şekilde hazırlanan jel kuyucuklarına multipleks PCR da farklı olarak *C. perfringens* ATCC 13124 (*cpa* geni için), *C. perfringens* NCTC 8239 (*cpa,cpe* genleri için), *C. perfringens* ATCC 3626 (*etx, cpb* genleri için) ve *C. perfringens* CCUG 44727 (*iA*geni için) suşları pozitif kontrol olarak yüklendi. Aynı şekilde yürütülerek, görüntülendi.

2.2.4. Antibiyotik Direnç Testi

İzolatların antimikrobiyel duyarlılık profilleri disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. İzolatların antibiyotik dirençliliklerini tespit etmek amacıyla izolatlar Cooked Meat Medium'dan alınan taze kültürden 5 ml'lik Tryptone Soya Broth'da (TSB, Oxoid CM0129) 37°C'de, 0.5 McFarland (2×10^8 kob/ml) türbidite oluşana kadar, inkübe edildi. Türbidite kontrolü NanoDrop spektrofotometrede (NanoDrop ND-100, Delaware, ABD) 625 nm dalga boyunda absorbansları 0,08-0,10 olacak şekilde yapıldı. Zenginleştirilen suşlar steril svapyardımları ile 90 mm'lik petrilere 4 mm kalınlığında dökülen Mueller Hinton agar (Oxoid CM 337) yayıldı. Svap ile ekimin ardından 3-5 dakika petrilere yüzeyindeki fazla sıvıyı çekmesi beklendikten sonra her petriye merkezden merkeze uzaklıkları 24 mm olacak şekilde antibiyotik diskleri yerleştirildi. Petriler 37°C'de anaerob ortamda 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda antibiyotik disklerinin etrafındaki inhibisyon zonlarının çapları ölçüldü. Elde edilen zon çapları, NCCLS'deki standartlar ile karşılaştırılarak suşlar antibiyotiklere karşı duyarlı, orta dirençli veya dirençli olarak sınıflandırıldı (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. *C. perfringens*'in Mueller Hinton agarda disk difüzyon testi görünümü

2.2.5. *C. perfringens* İzolatlarının Muhafazası

Bu çalışmada pozitif olarak değerlendirilen ve *cpa* geni tespit edilen izolatların dondurularak uzun süre muhafazası için izolatlar Cooked Meat Medium (Oxoid CM0081) içerisine alınarak anaerob ortamda 24 saat 37°C’de inkübe edildi. Üreme olan Cooked Meat besiyerinden 1ml eppendorf tüplere alındı. Eppendorf tüp içerisine 1ml steril gliserin eklenerek vorteks ile homojen dağılması sağlandı. Daha sonra -85°C’lik dondurucu içerisine alınarak donduruldu.

2.2.6. İstatistiksel Analizler

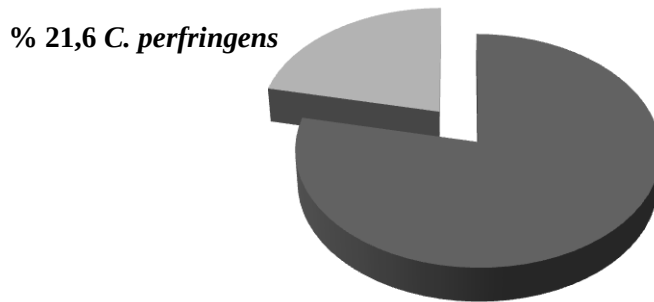
Mevsimsel farklılıkların piliç boyun derisi örneklerindeki *C.perfringens*prevalansı üzerine etkisiistatistiksel olarak “ki kare” testi ile belirlendi (SPSS version 14.1, Ref. No:4028472).

3. BULGULAR

Bu çalışmada 2009 yılının Haziran, Temmuz, Ağustos ve Aralık, 2010 yılının Ocak, ve Şubat aylarında üç farklı kesimhaneden alınan 180 piliç boyun derisi örneğinde *C. perfringens* varlığı araştırıldı. İzolatlar *cpa* geni esas alınarak PCR ile doğrulandı ve multipleks PCR yöntemi kullanılarak toksin genleri tespit edildi. PCR ile doğrulanan izolatların antibiyotik direnç profilleri belirlendi ve mevsimsel dağılım saptandı.

3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon

Çalışmada analiz edilen 180 piliç boyun derisi örneğinin 39'unun (% 21,6) *C. perfringens* ile kontamine olduğu tespit edildi.



Şekil 3.1. Tavuk boyun derisi örneklerinde klasik kültür tekniği ile *C. perfringens* izolasyon oranı

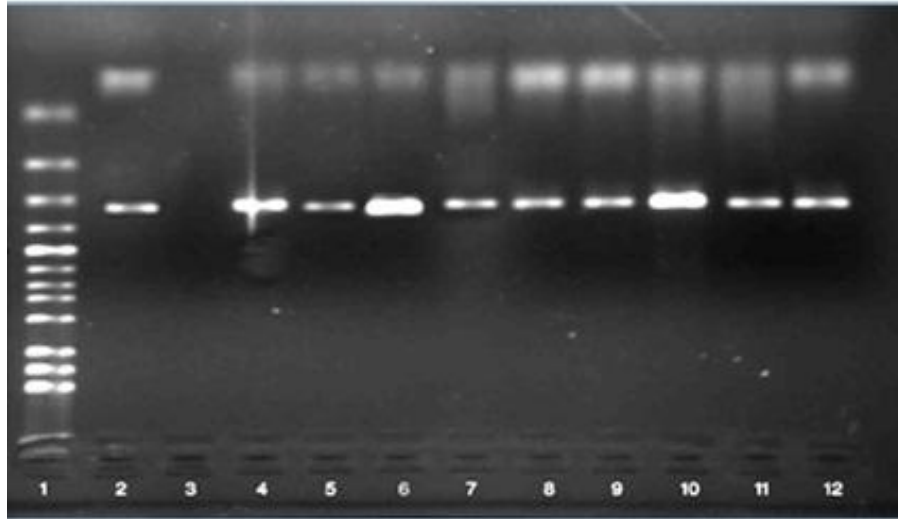
Tavuk boyun derisi örnekleri 3 farklı mezbahadan (A, B, C) alındı ve 3 ay yaz 3 ay kış olmak üzere 6 ay boyunca A mezbahasından 60 (% 33,3), B mezbahasından 60 (% 33,3) ve C mezbahasından da 60 (% 33,3) örnek incelendi. Sırasıyla A, B, C mezbahalarından alınan tavuk boyun derisi örneklerinin % 20,0 (12/60), % 25 (15/60) ve % 13,3 (8/60) oranında *C. perfringens* ile kontamine olduğu tespit edildi (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Mezbahalara göre tavuk boyun derisi örneklerinde *C. perfringens* izolasyonu

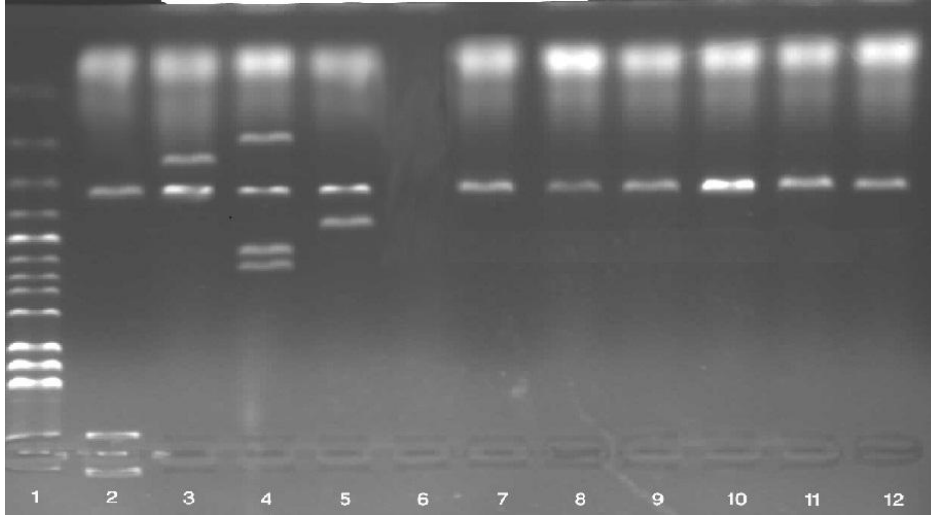
Mezbaha	Örnek Sayısı	Pozitif Örnek Sayısı (%)
A	60	12 (20)
B	60	15 (25)
C	60	8 (13,3)

3.2. PCR Sonuçları

Klasik kültür tekniği ile izole edilen *C. perfringens*'lerin doğrulanması amacıyla *cpa* gen sekansı esas alınarak yapılan PCR analizinde 39 suşun 35'inin (% 89,7) *cpa* genine sahip olduğu belirlendi (Şekil 3.2). İzolatların hiçbirinin *cpb*, *cpb2*, *etx*, *iAvecpe* genlerini taşımadığı tespit edildi.



Şekil 3.2. PCR ile *cpa* geni tespit edilmiş *C.perfringens* izolatlarının elektroforez görüntüsü (1: DNA marker, 2: Pozitif kontrol, 3: Negatif kontrol, 4-12: *cpa* pozitif izolatlar)

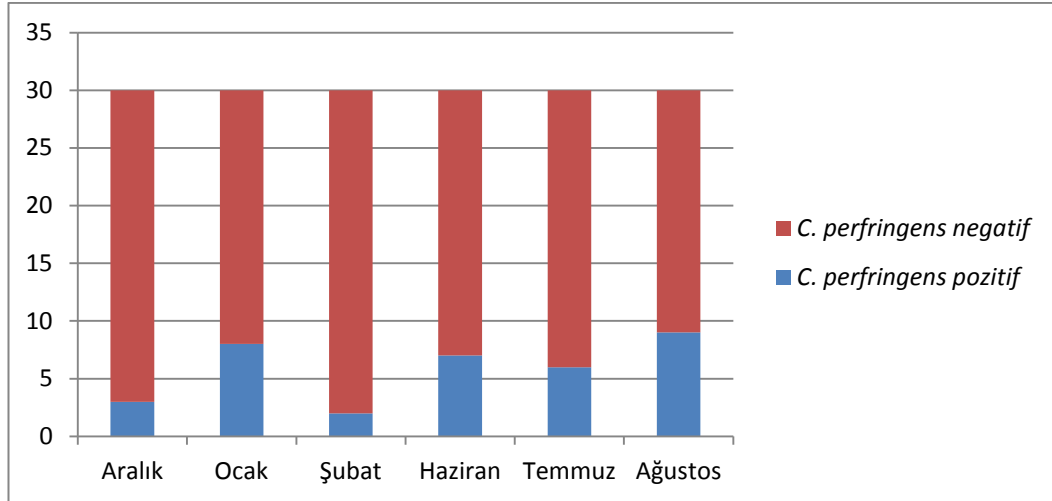


Şekil 3.3: Multipleks PCR ile *cpa* (324bp), *cpb* (196 bp), *etx* (655bp), *ia* (446bp), *cpb2* (567bp), *cpe* (233bp) genlerinin elektroforez görüntüsü. (1: 100 bp DNA marker, 2-5: Pozitif kontrol grubu: 2; *C. perfringens* ATCC 13124 (*cpa* geni), 3; *C. perfringens* NCTC 8239 (*cpa*, *cpe* genleri), 4; *C. perfringens* ATCC 3626 (*etx*, *cpb* genleri), 5; *C. perfringens* CCUG 44727 (*ia* geni), 6; Negatif kontrol, 7-12; *C. perfringens* izolatları

3.3. Mevsimsel Dağılım

Aylara göre numunelerin *C. perfringens* ile kontaminasyon düzeyi incelendiğinde, Aralık, Ocak ve Şubat aylarını kapsayan kış döneminde 13, Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarını kapsayan yaz döneminde de 22 numunenin kontamine olduğu tespit edildi.

Örneklerin aylara göre dağılımına bakıldığında, Aralık ayında incelenen 3, Ocak ayında incelenen 8 ve Şubat ayında incelenen 2 numunenin *C. perfringens* ile kontamine olduğu bulundu. Yaz ayları içerisinde ise Haziran'da 7, Temmuz'da 6 ve Ağustos'da 9 örneğin kontamine olduğu tespit edildi (Şekil 3.3). Ki kare testiyle yapılan istatistiksel analize göre piliç boyun derisi örneklerinin *C. perfringens* ile kontaminasyon düzeyinde herhangi bir mevsimsel farksaptanmadı ($p > 0,05$) (SPSS version 14.1 Ref. No: 4028472)



Şekil 3.3. Aylara göre tavuk boyun derisi örneklerinde *C. perfringens* kontaminasyonu dağılımı

3.4. Antibiyotik Dirençlilik Sonuçları

Çalışmada PCR ile doğrulanan 35 *C. perfringens* izolatının 9 farklı antibiyotiğe karşı direnç profilleri disk diffüzyon metodu ile araştırıldı. İzolatların 35'inin de (%100) en az bir antibiyotiğe dirençli olduğu tespit edildi. Ayrıca 31 (% 88,5) *C. perfringens* izolatının 1'den fazla antibiyotiğe direnç gösterdiği belirlendi.

İzolatların tamamının (% 100) dirençli olduğu antibiyotik trimetoprim olarak tespit edildi. Bu antibiyotik yanında, % 65,7 ile tetrasiklin, % 62,8 oranında gentamisin direncin yüksek oranda tespit edildiği diğer antibiyotikler olarak belirlendi. Elde edilen veriler izolatların hepsinin vankomsine duyarlı olduğunu da ortaya koydu (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. *C. perfringens* izolatlarının antibiyotik direnç profilleri

Antibiyotik	n (%)		
	Dirençli	Orta Dirençli	Duyarlı
Nalidiksik Asit	6 (17.1)	13 (37.1)	13 (37.1)
Penisilin	1 (2.8)	0	34 (97.1)
Gentamisin	22 (62.8)	4 (11.4)	9 (25.7)
Vankomisin	0	0	35 (100)
Kloramfenikol	0	4 (11.4)	31 (88.5)
Trimetoprim	35 (100)	0	0
Tetrasiklin	23 (65.7)	1 (2.8)	11 (31.4)
Ciprofloksasin	11 (31.4)	17 (48.5)	7 (20)
Ampisilin	1 (2.8)	0	34 (97.1)

n: izolat sayısı

4. TARTIŞMA

Üç farklı mezbahadan, kesim sırasında alınan piliç boyun derisi örneklerinde *C. perfringens* varlığının araştırıldığı bu çalışmada, 6 aylık periyot içerisinde toplanan örneklerin % 19,4'ünden (35/180) *C. perfringens* izole edilmiştir. Mezbahalar etkenin, ete bulaşmasında en önemli kaynaklardan birini oluşturmaktadır. Özellikle yetersiz kesim hijyenine bağlı olarak karkaslar dışkı ve bağırsak içeriği ile kontamine olabilmektedir.

Craven (2001)'in yapmış olduğu çalışmada mezbahadan kesim sırasında alınan piliç karkaslarında % 19 oranında *C. perfringens*'e rastlandığı bildirilmiştir. Çalışmada önsoğutma ve soğutma tankından da numuneler alınmış ve *C. perfringens* yönünden incelenmiştir. Önsoğutma ve soğutma suyunda % 13 oranında kontaminasyon olduğu tespit edilmiştir. 2003'de Craven ve ark.'ın yapmış olduğu başka bir çalışmada da kesimhaneden alınan 100 karkas örneğinin 16'sının (% 16) *C. perfringens* ile kontamine olduğu saptanmıştır. Kesim öncesi aynı piliçlerden alınan örneklerde ise kontaminasyon düzeyi en yüksek % 4 olarak bulunmuş, kontaminasyonun kesim işlemi sırasında yükseldiği ortaya konmuştur.

Yapılan çalışmalar et ve et ürünlerinin önemli bölümünün *C. perfringens* ile farklı düzeylerde kontamine olduğunu göstermektedir. Tavuk etinde bazı çalışmalarda % 100'e kadar tespit edilirken, ortalama % 30 oranında bulunduğu bildirilmektedir (Craven ve ark. 2001, Miki ve ark. 2008, Nowell ve ark., 2010).

Lin ve Labbe (2003)'nin yapmış olduğu çalışmada incelenen 132 farklı gıda örneğinden (et ürünleri, balık, sebze, hazır çorba ve baharat) 39'u (% 30) *C. perfringens* ile kontamine bulunmuştur. Analiz edilen gıdalar arasında kontaminasyon düzeyi en yüksek olan grup kırmızı et ürünleri (% 24) olarak tespit edilmiş bunu % 5 oranıyla kanatlı eti ve balık eti izlemiştir. Çalışmada incelenen 19 kanatlı eti örneği içerisinde *C. perfringens* tespit edilen ürünler arasında tavuk boyun derisi, hindi bacağı, tavuk karkas ve tavuk bagecin yer aldığı bildirilmiştir. Yang ve ark. (2010)'ın yaptığı benzer bir çalışmada da incelenen çeşitli et örneğinin 16'sından, 36'sının (% 31) *C. perfringens* ile kontamine olduğu ortaya konmuş, kontaminasyon düzeyi en yüksek % 73 (19/30) ile tavuk etinde saptanmıştır.

Miwa ve ark. (1998) Japonya’da satışa sunulan sığır, tavuk ve domuz etlerinde *C. perfringens* varlığını araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada her bir et türünden 50 örnek incelemiş, en yüksek kontaminasyonun % 84 ile tavuk etinde olduğunu bildirmişlerdir. Singh ve ark. (2005) bufalo, keçi ve tavuk etlerinde *C. perfringens* varlığını araştırmış, inceledikleri 211 örneğin 160’ında (% 75.8) etkeni tespit etmişlerdir. Tavuk etlerinin % 70.4 kontaminasyon oranı ile ikinci sırada yer aldığını bildirmişlerdir.

Saito (1990), yapmış olduğu çalışmada 68 tavuk eti örneğinin 16’sından (%24) *C. perfringens* izole ve identifiye etmiştir. Nowell ve ark. (2010)’ın çalışmasında incelen taze ve donmuş tavuk eti örneklerinde *C. perfringens* kontaminasyon oranı sırasıyla % 66 ve % 64 olarak bulunmuştur. Çakmak ve ark. (2006)’ın tavuk kıyma ve tavuk burgerlerde *C. perfringens* varlığını araştırdıkları çalışmalarında, kontaminasyon düzeyini tavuk kıymalarında % 70, tavuk burgerlerde ise % 2.5 olarak bildirilmiştir. Wen ve McClane (2004) inceledikleri 146 tavuk eti örneğinin 56’sının (% 38) *C. perfringens* ile kontamine olduğunu bildirmiştir.

Gıdalarda *C. perfringens* varlığını saptamak amacıyla kullanılan yöntemlerin başında kültür tekniği gelmektedir. Farklı ülkelerde bir çok standartta izolasyon ve identifikasyon amacıyla bu teknik yer almaktadır. Ancak yapılan bazı çalışmalar kültür tekniğinde etkenin saptama oranının her zaman % 100 olmadığını bildirmektedir. (Eisgruber ve Reuter, 1995, Bredius ve Ree, 2003, Yang ve ark., 2010). Örneğin Eisgruber ve ark. (2000)’ın yapmış olduğu çalışmada identifikasyon amacıyla kullanılan kimyasal testler karşılaştırılmış, nitrat motilite ve laktoz jelatin testleri kullanılarak % 88.8 oranında saptama yapılabileceğini ortaya konmuştur. En yüksek saptama oranının elde edildiği CAMP ve asit fosfataz testinde bile saptama düzeyi % 94.2 olarak bildirilmiştir. PCR, gıda kaynaklı infeksiyon etkenlerinin tespitinde kullanımı yaygın bir diğer yöntemdir. Yüksek duyarlılık ve spesifite özelliği olan ve kısa sürede doğru sonuçların elde edildiği PCR, çalışmalarda kültür yönteminin doğrulanması amacıyla tercih edilmektedir (Fach ve Popoff, 1997, Schalch ve ark., 1999). Bu çalışmada da kültür tekniği ile izole edilen *C. perfringens*’lerin doğrulanması amacıyla *cpa* gen sekansı esas alınarak yapılan PCR analizinde 39 suşun 35’inin (% 89.7) *cpa* genine sahip olduğu belirlenmiştir.

C. perfringens'in farklı tiplerinin gıda infeksiyonlarından, ölümcül nekrozlara kadar değişebilen hastalık tablolarına yol açtığı bilinmektedir. Bu nedenle elde edilen *C. perfringens* suşlarının oluşturduğu toksin tiplerine göre klasifikasyonu önemlidir. Bu amaçla son yıllarda seronötralizasyon testleri ile hayvan deneylerinin yerini moleküler teknikler almıştır. Zaman kaybına neden olması, fazla miktarda antiseruma ihtiyaç duyulduğundan yüksek maliyeti, çeşitli etik problemlerle karşılaşılması serolojik testlerin dezavantajları arasında yer almaktadır. *C. perfringens*'in en önemli toksinleri olan alpha, beta, epsilon, iota, entero ve b2-toksinlerini sentezleyen, *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA*, *cpe* ve *cpb2* genlerinin araştırıldığı multipleks PCR, sıklıkla tercih edilen moleküler yöntemler arasındadır (Meer ve Songer, 1997, Yoo ve ark., 1997, Baums ve ark., 2004, Kalender ve Ertaş, 2005).

Bu çalışmada da, izole edilen *C. perfringens* suşlarının toksin genleri multipleks PCR ile araştırılmış, 39 izolatın 35'inin (% 89.7) *cpa* genini taşıdığı ve Tip A olduğu ortaya konmuştur. İzolatların hiçbirinin *cpb*, *cpb2*, *etx*, *iA* ve *cpe* genlerini taşımadığı tespit edilmiştir.

C. perfringens kaynaklı gıda infeksiyonları, *cpe* geni taşıyan Tip A ile kontamine gıdaların tüketilmesi sonucu oluşmaktadır. Ancak *C. perfringens*'lerde bu genin bulunma oranı % 0-5 arasında değişmektedir (Erol ve ark., 2008).

Bu çalışmayla benzer şekilde Heikinheimo ve Korkeala (2005) yapmış oldukları araştırmada broyler tavuk etlerinden elde ettikleri 118 *C. perfringens*'in hiçbirinde *cpb*, *cpb2*, *etx*, *iA* ve *cpe* geni bulunmadığını, hepsinin *cpa* geni taşıyan Tip A olduğunu bildirmiştir. Aynı şekilde Cooper ve ark. (2013) inceledikleri tavuk karaciğer örneklerinde % 69,6 oranında *C. perfringens* tespit ettiklerini, fakat bunların hiçbirinin toksin geni taşımadığını ortaya koymuştur.

Nowell ve ark. (2010) taze ve donmuş tavuk etlerinden izole ettikleri 58 *C. perfringens*'in hiçbirinde *cpe* genine rastlamadıklarını, yalnızca 4 tanesinde *cpb2* geninin bulunduğunu bildirmişlerdir. Guran ve Oksuztepe (2013)'nin yapmış olduğu çalışmada ise, tavuk parça etlerinden izole edilen 588 *C. perfringens*'in sadece 1 tanesinde *cpe* geni (% 0,5) tespit edilmiştir. Wen ve McClane (2004)'in çalışmasında da tavuk etlerinden elde edilmiş 56 *C. perfringens* izolatına multipleks PCR ile toksin tiplendirmesi yapılmıştır. İzolatlardan sadece 1 (% 1,7) tanesinde *cpe* geni

bulunduğu, 29 tanesinin de *cpb2* (% 51,7) geni taşıdığı, diğerk toksin genlerinin hiçbir izolatta bulunmadığı bildirilmiştir.

Miwa ve ark. (1998) bu çalışma ve diğerk bir çok çalışmanın aksine yüksek oranda *cpe* geni tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Çalışmada elde ettikleri 42 *C. perfringens* izolatının % 12 oranında *cpe* geni taşıdığını, bu durumun PCR aşamasında kullandıkları zenginleştirme yönteminden kaynaklanabileceğini ortaya koymuşlardır.

Kanatlı yetiştiriciliğinde antibakteriyel ilaçlar, hastalıkların tedavisi dışında koruyucu olarak ve verimi artırmak amacıyla da kullanılmaktadır. Bu amaçla düşük dozda, kısa süre uygulanan antibiyotikler, önemli bir halk sağlığı problemi olan antibiyotik direncine yol açmaktadır. Dirençli suşların hem kanatlılardan hem gıdalardan hem de insanlardan izole edildiğı bildirilmektedir (McEwen ve Fedorka-Cray, 2002). *C. perfringens*'in de tetrasiklin başta olmak üzere kanatlı yetiştiriciliğinde kullanılan çeşitli antibiyotiklere karşı direnç gösterdiği bilinmektedir (Mathew ve ark., 2007). Bu çalışmada elde edilen izolatların antibiyotik direnç profilleri belirlenmiş, izolatların tamamının (% 100) dirençli olduğı antibiyotik trimetoprim olarak tespit edilmiştir. Bu antibiyotik yanında, % 65,7 ile tetrasiklin, % 62,8 oranı ile gentamisin direncin yüksek oranda tespit edildiğı diğerk antibiyotikler arasında yer almıştır. Seçilen antibiyotikler arasından en duyarlı olan ise vankomisin olarak tespit edilmiştir.

Silva ve ark. (2009) yapmış oldukları çalışmada, kesimhanelerden alınan broyler bağırsaklarından izole edilmiş 55 *C. perfringens* izolatının antibiyotik direnç profilini belirlemiştir. İzolatların % 47.3'ü basitrasine, % 41.8'i tetrasikline dirençli bulunmuştur. Araştırılan antibiyotikler arasında en etkili olanlar ise penisilin, narsin ve monensin olarak saptanmıştır. Basitrasin antikoksidial etkisinden dolayı, kanatlı yetiştiriciliğinde kullanımı yaygınlaşan bir antibiyotiktir. Bu nedenle direncin bu antibiyotikte yüksek olduğı düşünülmektedir.

Watkins ve ark. (1997)'in araştırmasında da broyler kümeslerinden elde edilen *C. perfringens* izolatları antibiyotik direnç yönünden değerlendirilmiştir. Benzer şekilde en yüksek direncin basitrasin ve linkomisinde tespit edildiğı bildirilmiştir. Linkomisinin, kanatlılarda nekrotik enteritise bağılı ölümleri engellemek için koruyucu amaçla kullanıldığı bilinmektedir.

Johansson ve ark. (2004) Danimarka, Norveç ve İsveç’de tavuklardan izole edilen 102 *C.perfringens* izolatının, yetiştiricilikte kullanılan 8 farklı antibakteriyel ve antikoksidale karşı direncini araştırmıştır. Bu çalışmayla benzer olarak izolatların duyarlı olduğu antibiyotikler arasında eritromisin ve vankomisin yer almıştır. Antikoksidial ve anticlostridial etkilerinden dolayı bu ülkelerde sıklıkla kullanılan narasine karşı henüz bir direnç tespit etmediklerini bildirmişlerdir. Tetrasiklin direnci ise İsveç’de % 76, Danimarka’da % 10 ve Norveç ‘de % 29 oranında tespit edilmiştir. Belçika’da Martel ve ark. (2004)’ın yapmış olduğu benzer bir çalışmada da, 31 farklı çiftlikteki broylerlerden elde edilen izolatların, monensin ve narasin gibi antikoksidiallere duyarlı olduğu, oksitetrasiklin ve klortetrasikline karşı % 66 oranında direnç gösterdiği bildirilmiştir.

Singh ve ark. (2005)’nın çalışmasında bufalo, keçi ve tavuk etlerinden izole edilmiş *C. perfringens* suşlarının 16 farklı antibiyotiğe direnci araştırılmıştır. Diğer çalışmalardan farklı olarak bu izolatların en duyarlı olduğu antibiyotikler siprofloksasin (% 96.9) ve ofloksasin (% 87.8) olarak belirlenmiş ve bunları % 71 ile tetrasiklin izlemiştir. İncelenen bütün suşların streptomisin ve seftazidim’e karşı dirençli olduğu da ortaya konmuştur. Çalışmada antibiyotik dirençlilik hayvan türleri arasında ayrılmadan belirtilmiştir, direnç profillinin farklılığının bundan ve ülkeler arası antibiyotik seçiminden ileri geldiği düşünülmektedir.

Tansuphasiri ve ark. (2005) çalışmalarında insanlardan, hayvanlardan ve gıdalardan izole ettikleri *C. perfringens* suşlarının direnç profillerini karşılaştırmıştır. İnsanlardan izole edilen suşlarda en yüksek direnç % 44.9 ile tetrasiklinde görülmüştür. Buna paralel bir şekilde gıda örneklerindeki izolatlar içerisinde en yüksek direnç % 28 ile tetrasikline karşı tespit edilmiştir.

Bu çalışmada incelenen piliç boyun derisi örneklerinin aylara göre *C. perfringens* ile kontaminasyon düzeyi incelendiğinde, Aralık, Ocak ve Şubat aylarını kapsayan kış döneminde 13, Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarını kapsayan yaz döneminde de 22 numunenin kontamine olduğu tespit edilmiştir. Ki kare testiyle yapılan istatistiksel analize göre piliç boyun derisi örneklerinin *C. Perfringens* ile kontaminasyon düzeyinde herhangi bir mevsimsel etki saptanmamıştır. Bunun en önemli nedeninin, bakterinin spor oluşturma yeteneğinden ileri geldiği düşünülmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada üç farklı mezbahadan, kesim sırasında alınan piliç boyun derisi örneklerinde *C. perfringens* varlığı araştırılmış, 6 aylık periyot içerisinde toplanan örneklerin % 19,4'ünün (35/180) *C. perfringens* ile kontamine olduğu belirlenmiştir. Etkenin, sporlu olduğu göz önüne alındığında, kontaminasyonun halk sağlığını etkileyebilecek düzeylere ulaşma riskinin yüksek olduğu dikkat çekmektedir.

Bunun yanında yapılan analizler ile izolatlardan hiçbirinin gıda zehirlenmesine neden olan *cpe* genini taşımadığı tespit edilmiştir. *C. perfringens*'in gıda kaynaklı infeksiyonlara neden olabilmesi için özellikle *cpe* geni taşıması gerektiği göz önünde bulundurulduğunda, elde edilen izolatların insan sağlığı açısından risk oluşturmadığı sonucuna varılmıştır.

Çalışmada elde edilen izolatların, antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesiyle, büyük bir kısmının bir veya birden fazla antibiyotiğe direnç gösterdiği saptanmıştır. Bu durum, antibiyotik kullanımı sonucu mikroorganizmalarda gelişen direncin takip edilmesi ve dirençli suşların gelişmesinin önlenmesi amacıyla gıda üretiminde hayvanlarda profilaktik vebüyütme faktörü olarak antibiyotik kullanımına ilişkin yasal düzenlemelere bağlı kalınmasının ve resmi otorite tarafından ulusal kalıntıizleme programının etkin olarak yürütülmesinin ne kadar önemli olduğunu ortaya koymuştur.

ÖZET

Kesimhanelerden Alınan Piliç Boyun Derisi Örneklerinde *Clostridium Perfringens* Varlığı, Moleküler Karakterizasyonu ve Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada 2009 yılının Haziran, Temmuz, Ağustos ve Aralık, 2010 yılının Ocak, ve Şubat aylarında üç farklı kesimhaneden alınan 180 piliç boyun derisi örneğinde *C. perfringens* varlığı araştırıldı. Piliç boyun derilerinden *C. perfringens* izolasyonu ve identifikasyonu klasik kültür tekniği ile yapıldı, elde edilen izolatlar *cpa* geni baz alınarak PCR ile doğrulandı, multipleks PCR yöntemi kullanılarak toksin genleri tespit edildi. Ayrıca doğrulanan izolatların antibiyotik direnç profilleri belirlendi ve mevsimsel dağılım saptandı.

Çalışmada analiz edilen 180 piliç boyun derisi örneğinin 39'unun (% 21,6) klasik kültür tekniği ile *C. perfringens* ile kontamine olduğu tespit edildi. Klasik kültür tekniği ile izole edilen *C. perfringens*'lerin doğrulanması amacıyla yapılan PCR analizinde 39 suşun 35'inin (% 89,7) *cpa* genine sahip olduğu belirlendi. İzolatların hiçbirinin *cpb*, *cpb2*, *etx*, *iA* ve *cpe* genlerini taşımadığı tespit edildi. Aylara göre numunelerin *C. perfringens* ile kontaminasyon düzeyi incelendiğinde, Aralık, Ocak ve Şubat aylarını kapsayan kış döneminde 13, Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarını kapsayan yaz döneminde de 22 numunenin kontamine olduğu tespit edildi. Ki kare testiyle yapılan istatistiksel analize göre piliç boyun derisi örneklerinin *C. perfringens* ile kontaminasyon düzeyinde herhangi bir mevsimsel etki saptanmadı. Çalışmada PCR ile doğrulanan 35 *C. perfringens* izolatının 9 farklı antibiyotiğe karşı direnç profilleri disk diffüzyon metodu ile araştırıldı. İzolatların 35'inin de (% 100) en az bir antibiyotiğe dirençli olduğu tespit edildi. İzolatların tamamının (% 100) dirençli olduğu antibiyotik trimetoprim olarak tespit edildi. Bu antibiyotik yanında, % 65,7 ile tetrasiklin, % 62,8 oranında gentamisin direncin yüksek oranda tespit edildiği diğer antibiyotikler olarak belirlendi.

C. perfringens'in gıda kaynaklı infeksiyonlara neden olabilmesi için özellikle *cpe* geni taşıması gerektiği göz önünde bulundurulduğunda, elde edilen izolatların insan sağlığı açısından risk oluşturmadığı sonucuna varılmıştır. Ancak çalışmada elde edilen izolatların, büyük bir kısmının bir veya birden fazla antibiyotiğe direnç gösterdiğinin saptanması antibiyotik kullanımı sonucu mikroorganizmalarda gelişen direncin takip edilmesi ve dirençli suşların gelişmesinin önlenmesi amacıyla dikkat edilmesi gereken konuların önemini ortaya koymuştur.

Anahtar Sözcükler: Antibiyotik direnç, *cpa* geni, *C. perfringens*, multipleks PCR, tavuk eti

SUMMARY

Detection, molecular characterization and antibiotic resistance profiles of *Clostridium perfringens* isolated from chicken neck samples at slaughterhouse level

The objectives of this study were, to determine the incidence of *C. perfringens* in 180 chicken neck samples, obtained from 3 different slaughterhouses between June, July, August, December 2009 and January, February 2010, to detect *cpa* gene by PCR for the verification of the isolates and to identify toxin genes by multiplex PCR, to evaluate the seasonal distribution of *C. perfringens* prevalence, and to find out the antibiotic susceptibility profiles of the isolates.

C. perfringens was isolated from 39 (21.6 %) of the 180 chicken meat samples by cultivation method. For the confirmation of isolates, PCR assay was performed. From 39 isolates *cpa* gene were determined in 35 (89.7 %) of them. None of the isolates possessed the toxin genes *cpb*, *cpb2*, *etx*, *iA* and *cpe*. During the winter (December, January, February) 13 and during the summer (June, July, August) 22 samples were found to be contaminated with *C. perfringens* so for the incidence of *C. perfringens* seasonal difference was not significant for chi square test. According to the disc diffusion test all of the isolates were found to be resistant at least one of the 9 antibiotics. 35 isolates were resistant to trimetoprim (100 %). In addition, high level of resistance was also determined against tetracycline (65,7 %) and gentamycin (62,8 %).

According to the results our isolates are at low health risk because none of the isolates possessed the toxin gene *cpe*, which cause the foodborne illness. Also our isolates were found to be resistant at least one or two antibiotics, this shows that antibiotic resistance should be trace and the use of antimicrobials as prophylactic or growth promoter agent should be under control.

Key Words: Antibiotic susceptibility, *cpa* gene, chicken meat, *C. perfringens*, multiplex PCR

KAYNAKLAR

- ADAMS, M. R., MOSS, M. O. (2008). Food Microbiology. 3rd Ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry Publishing. p.: 209-214.
- AGUILERA, M. O., STAGNITTA, P. V., MICALIZZI, B., STEFANINI DE GUZMAN, S. (2005) Prevalence and characterization of *Clostridium perfringens* from spices in Argentina. *Anaerobe* **11(6)**: 327-334.
- ANDERSSON, A., RONNER, 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.
- ANGELOTTI, R., HALL, H. E., FOTER, M. J., LEWIS, K. H. (1962). Quantitation of *Clostridium perfringens* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **10(3)**: 193-199.
- ANON. (1994). Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Clostridium perfringens* gastroenteritis associated with corned beef served at St. Patrick's Day meals -- Ohio and Virginia, 1993. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **43(08)**: 137-138, 143-144.
- ANON. (1999). Minnesota department of health 1999 gastroenteritis outbreak summary. Erişim: <http://www.health.state.mn.us/divs/idepc/dtopics/foodborne/outbreak/outbreaks1999.pdf>. Erişim tarihi: 08.12.12.
- ANON. (2003). NCCLS, (National Committee for Clinical Laboratory Standards) Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria, Volume 24 Number 2 ISSN 0273-3099 Approved Standard-Sixth Edition. M11-A6 Pennsylvania. USA.
- ANON. (2007). European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Report Of EFSA And ECDC. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2006. *EFSA Journal*. **130**: 1-352.
- ANON. (2010a). OzFoodNet. Monitoring the Incidence and Causes Of Diseases Potentially Transmitted by Food In Australia: Annual Report Of The OzFoodNet Network, 2010. *CDI* **36(3)**: E213-E241.
- ANON. (2010b). Institute of Environmental Science and Research (ESR). Annual Report Concerning Foodborne Disease In New Zealand 2010. Prepared for Ministry of Agriculture and Forestry Under Project MRP/10/02.
- ANON. (2011). European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Report Of EFSA And ECDC. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *EFSA Journal* **2011.9(3)**: 2090.
- ANON. (2012a). United States Department of Agriculture (USDA). Foreign Agricultural Service. Livestock and poultry: world markets and trade. October, 2012.
- ANON. (2012b). Beyaz Et Sanayicileri ve Damızlıkçıları Birliği (BESD-BİR). Piliç eti sektör raporu 2012.
- ANON. (2012c). FABRI-ISU 2011, World Agricultural Outlook.

- ANON. (2012d). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK). Kütür hayvanları ürünleri. Erişim:(http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?alt_id=46). Erişim Tarihi: 9.12.2012.
- ANON. (2012e). Centers for Disease Control and Prevention (CDC). CDC Estimates of foodborne illness in the United States. Erişim: www.cdc.gov/foodborneburden. Erişim tarihi: 08.12.2012.
- ANON. (2012f). The Federal Office of Public Health (FOPH). Foodborne outbreaks in Switzerland. Current Statistics, Future Developments, Practical Guidelines for the Investigation of Outbreaks and a Historical Review. p.: 51-63.
- ANON. (2012g). Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Rep* Fatal foodborne *Clostridium perfringens* illness at a state psychiatric hospital - Louisiana, 2010. *MMWR Morb. Mortal. Wkly.* **61(32)**: 605-608.
- ANON. (2012h). Kent County Jail Rice and Cheese 2012. Erişim: <http://www.outbreakdatabase.com/search/?outbreak=Clostridium+perfringens>. Erişim Tarihi: 08.12. 2012.
- ANON. (2011). CanadaSlovakLegion Turkey 2010. Erişim: <http://www.outbreakdatabase.com/search/?outbreak=Clostridium+perfringens>. Erişim Tarihi: 08.12.2012.
- ARCIERI, R., DIONISI, A. M., CAPRIOLI, A., LOPALCO, P., PRATO, R., GERMINARIO, C., RIZZO, C., LAROCCA, A. V. M., BARBUTI, S., GRECO, D., LUZZI, I. (1999). Direct detection of *Clostridium perfringens* enterotoxin in patients' stools during an outbreak of food poisoning. *Immun. Med. Microbiol.* **23**:45-48.
- ASHA, N. J., WILCOX, M. H. (2002) Laboratory diagnosis of *Clostridium perfringens* antibiotic-associated diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* **51**:891-894.
- BAUMS, C. G., SCHOTTE, U., AMTSBERG, G., GOETHE, R. (2004). Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Vet. Microbiol.* **100**:11-16.
- BEAN, N. A., GOULDING, J. S., LAO, C., ANGULO, F. J. (1996). Surveillance for foodborne-disease outbreaks-United States. *Morbidity Mortality Weekly Report.* **45**: 1-54.
- BEZIRTZOGLU, E., DIMITRIOU, D., PANAGIOU, A. (1996). Occurrence of *Clostridium perfringens* in river water by using a new procedure. *Anaerobe.* **2(3)**: 169-173.
- BEZIRTZOGLU, E., MAIPA, V., VOIDAROU, C., TSIOTSIAS, A., PAPAPETROPOULOU, M. (2000). Foodborne intestinal bacterial pathogens. *Microb. Ecol. Health Dis.* **2**:96-104.
- BEZIRTZOGLU, E., PANAGIOU, A., SAVVAIDIS, I., MAIPA, V. (1997). Distribution of *Clostridium perfringens* in polluted lake environments. *Anaerobe.* **3**:169-172.
- BHOWN, A. S., HABEEB, A. F. S. A. (1977). Structural studies on ϵ -prototoxin of *Clostridium perfringens* type D. Localization of the site of tryptic scission necessary for activation to ϵ -toxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **78**:889-896.

- BHUNIA, A. K. (2008). Foodborne Microbial Pathogens. Mechanisms and Pathogenesis. New York: Springer. p.: 158-162.
- BOGAARD, A. E., STOBBERINGH, E. E. (1999). Antibiotic usage in animals impact on bacterial resistance and public health. *Drugs*. **58(4)**: 589-607.
- BOGAARD, A. E., STOBBERINGH, E. E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. *Int. J. Antimicrob. Ag.* **14**: 327-335.
- BREDIUS, M.W.J., REE, E.M. (2003). Media for the detection and enumeration of clostridia in foods. *Prog. Ind. Microbiol.* **37**: 49-60.
- BROOK, I., FRAZIER, E. H. (1998). Aerobic and anaerobic microbiology of infection after trauma. *Am. J. Emerg. Med.* **16(6)**: 585-591.
- BROWN, K. L. (2000). Control of bacterial spores. *Brit. Med. Bull.* **56(1)**: 158-171.
- BRYAN, F. L., DOYLE, M. P. (1995). Health risk and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. *J. Food Protect.* **58**: 326-344.
- BRYNESTAD, S., GRANUM, P. E. (2002). *Clostridium perfringens* and foodborne infections. *Int. J. Food Microbiol.* **74**: 195-202.
- BRYNESTAD, S., SYNSTAD, B., GRANUM, P. E. (1997). The *Clostridium perfringens* enterotoxigenesis on a transposable element in type a human food poisoning strains. *Microbiology*. **143**: 2109-2115.
- CANARD, B., COLE, S. T. (1989). Genome organization of the anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **86**: 6676-6680.
- CARMAN, R. J., SAYEED, S., LI, J., GENHEIMER, C. W., HILTONSMITH, M. F., WILKINS, T. D., MCCLANE, B. A. (2008). *Clostridium perfringens* toxin genotypes in the feces of healthy North Americans. *Anaerobe*. **14(2)**: 102-108.
- CASEWELL, M., FRIIS, C., MARCO, E., McMULLIN, P., PHILLIPS, I. (2003). The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**: 159-161.
- CLIFFORD, W. J., ANELLIS, A. (1975). Radiation resistance of spores of some *Clostridium perfringens* strains. *Appl. Microbiol.* **29(6)**: 861-863.
- 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(1)**: 30-36.
- COOPER, K. K., BUESCHEL, D. M., SONGER, J. G. (2013). Presence of *Clostridium perfringens* in retail chicken livers. *Anaerobe*. **21**: 67-68.
- COTTER, P. D., HILL, C. (2003). Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67(3)**: 429-453.
- CRAVEN, S.E. (2001). Occurrence of *Clostridium perfringens* in the broiler chicken processing plant as determined by recovery in iron milk medium. *J. Food Protect.* **64(12)**: 1956-1960.

- CRAVEN, S. E., COX, N. A., BAILEY, J. S., COSBY, D. E. (2003). Incidence and tracking of *Clostridium perfringens* through an integrated broiler chicken operation. *Avian Dis.***47**:707-711.
- ÇAKMAK, Ö., BİLİR ORMANCI, F. S., TAYFUR, M., EROL, İ. (2006). Presence and contamination level of *Clostridium perfringens* in raw frozen ground poultry and poultry burgers. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* **30**: 101-105.
- DESMARAIS, T. R., SOLO-GABRIELE, H. M., PALMER, C. J. (2002). Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment, *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(3): 1165-1172.
- DEVITT, P. G., STAMP, G. W. (1983). Acute clostridial enteritis-or pig-bel?. *Gut*.**24**: 678-679.
- EDWARDS, D. D., MCFETERS, G. A., VENKATESAN, M. I. (1998). Distribution of *Clostridium perfringens* and fecal sterols in a benthic coastal marine environment influenced by the sewage outfall from McMurdo Station, Antarctica. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(7): 2596-2600.
- EISGRUBER, H., REUTER, G. (1995). A selective medium for the detection and enumeration of mesophilic sulphite-reducing clostridia in food monitoring programs. *Food Res. Int.***28**(3): 219-226.
- EISGRUBER, H., SCHALCH, B., SPERNER, B., STOLLE, A. (2000). Comparison of four routine methods for the confirmation of *Clostridium perfringens* in food. *Int. J. Food Microbiol.***57**: 135-140.
- ELLIE, J. C., GOLDSTEIN, M. D., DIANE, M. (2011). Resistance trends in antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria, part 1. *Clin. Microbiol. Newsl.* **33**(1): 1-8.
- ERIKSEN, J., ZENNER, D., ANDERSON, S. R., GRANT, K., KUMAR, D. (2010). *Clostridium perfringens* in London, July 2009: two weddings and an outbreak. *Euro Surveill.***15**(25):1-6.
- EROL, İ., GONCUOĞLU, M., AYAZ, N. D., BİLİR ORMANCI, F. S., HILDEBRANDT, G. (2008). Molecular typing of *Clostridium perfringens* isolated from turkey meat by multiplex PCR. *Letters Appl. Microbiol.* **47**: 31-34.
- EROL, İ., GONCUOĞLU, M., AYAZ, N. D., BİLİR ORMANCI, F. S., HILDEBRANDT, G. (2008). Molecular typing of *Clostridium perfringens* isolated from turkey meat by multiplex PCR. *Letters Appl. Microbiol.* **47**: 31-34.
- EROL, İ. (2007). Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Ankara: Pozitif Matbaacılık.
- FACH, P., POPOFF, M. R. (1997). Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in food and fecal samples with a duplex PCR and the slide latex agglutination test. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(11): 4232-4236.
- FEINER, G. (2006). Meat Products Handbook. Practical Sciences and Technology. Cambridge: WoodHead Publishing. p.: 605-607.
- FLORES-DÍAZ, F., ALAPE-GIROÑ, A. (2003). Role of *Clostridium perfringens* phospholipase C in the pathogenesis of gas gangrene. *Toxicon.* **42**: 979-986.

- FRASER, A. G. (1978). Neuraminidase production by clostridia. *J. Med. Microbiol.* **11**: 269-280.
- FUJITA, K., KATAHIRA, J., HORIGUCHI, Y., SONODA, N., FURUSE, M., TSUKITA, S. (2000) *FEBS Letters*. **476**: 258-261.
- GARCIA, S., HEREDIA, N. (2009). *Clostridium perfringens*: a dynamic foodborne pathogen. *Food Bioprocess Technol.* **4**(4): 624-630.
- GARMORY, H. S., CHANTER, N., FRENCH, N. P., BUESCHEL, D., SONGER, J. G., TITBALL, R. W. (2000). Occurrence of *Clostridium perfringens* β 2toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiol. Infect.* **124**(1):61-67.
- GASKINS, H. R., COLLIER, C. T., ANDERSON, D. B. (2002). Antibiotics as growth promotants: mode of action *Anim. Biotechnol.* **13**(1):29-42.
- GENIGEORGIS, C. (1975). Public health importance of *Clostridium perfringens*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **167**(9):821-827.
- GIBBS, P. (2002). Characteristics of spore forming bacteria. In: *Foodborne pathogens. Hazards, Risks Analysis and Control*. Ed.: Blackburn, C. W., McClure, P. J. Cambridge: Woodhead Publishing. p.: 417-435.
- GIBERT, M., JOLIVET-RENAUD, C., POPOFF, M. R. (1997). Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene*. **203**: 65-73.
- GOMBAS, D. E., GOMEZ, R. F. (1978). Sensitization of *Clostridium perfringens* spores to heat by gamma radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**(3): 403-407.
- GOMEZ, R. F., GOMBAS, D. E., HERRERO, A. (1980). Reversal of radiation-dependent heat sensitization of *Clostridium perfringens* Spores. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**(3):525-529.
- GORRIS, L. G. M. (2005). Food safety objective: an integral part of food chain management. *Food Control*. **16**: 801-806.
- 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.
- GROUCH, E., GOLDEN, N. J. (2005). A risk assessment for *Clostridium perfringens* in ready-to-eat and partially cooked meat and poultry products. *Public Rev.* p.: 1-304.
- GULLAN, L. N., ROWE, S. L., GREGORY, J. E. (2009). Suspected *Clostridium perfringens* outbreak associated with a buffet-style lunch in a Victorian restaurant. *Victorian Infect. Dis. Bull.* **12**(3):70-76.
- GURAN, H. S., OKSUZTEPE, G. Detection and typing of *Clostridium perfringens* from retail chicken meat parts. *Letters Appl. Microbiol.* **57**:77-82.
- GURJAR, A. A., HEGDE, N. V., LOVE, B. C., JAYARAO B. M. (2008). Real-time multiplex PCR assay for rapid detection and toxin typing of *Clostridium perfringens* toxin producing strains in feces of dairy cattle. *Mol. Cell. Probes*. **22**: 90-95.

- HANSEN, M. V., ELLIOTT, L. P. (1980). New presumptive identification test for *Clostridium perfringens*: reverse CAMP test. *J. Clin. Microbiol.* **12**(4): 617-619.
- HART, G. B., STRAUSS, M. B. (1990). Gas gangrene-clostridial myonecrosis: a review. *J. Hyper. Med.* **5**(2): 125-144.
- HATHEWAY, C. L. (1990). Toxigenic clostridia. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**(1): 66-98.
- HAYES, P. R. (1995). Food Microbiology and Hygiene. 2nd Ed. London: Chapman & Hall. p.: 40-44.
- HECHT, D. W., VEDANTAM, G., OSMOLSKI, J. R. (1999). Antibiotic resistance among anaerobes: what does it mean? *Anaerobe.* **5**: 421-429.
- HEIKINHEIMO, A., KORKEALA, H. (2005). Multiplex PCR assay for toxinotyping *Clostridium perfringens* isolates obtained from Finnish broiler chickens. *Letters Appl. Microbiol.* **40**: 407-411.
- HEIKINHEIMO, A., KORKEALA, H. (2005). Multiplex PCR assay for toxinotyping *Clostridium perfringens* isolates obtained from Finnish broiler chickens. *Letters Appl. Microbiol.* **40**: 407-411.
- HEIKINHEIMO, A., LINDSTROM, M., GRANUM, P. E., KORKEALA, H. (2006). Humans as reservoir for enterotoxin gene-carrying *Clostridium perfringens* type A. *Emerg. Infect. Dis.* **12**: 1724-1729.
- HEIKINHEIMO, A., TUUPANEN, T., JALAVA, K., KORKEALA, H. (2000). Cpe-positive *Clostridium perfringens* strains in species. In: *Food Safety Assurance and Veterinary Public Health: Safety Assurance During Food Processing*. Ed.: Smulders, F. J. M., Collins, J. D. Netherlands: Wageningen Academic Publishing. p.: 401-402.
- HILL, R. T., STRAUBE, W. L., PALMISANO, A. C., GIBSON, S. L., COLWELL, R. R. (1996). Distribution of sewage indicated by *Clostridium perfringens* at a deep-water disposal site after cessation of sewage disposal. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(5): 1741-1746.
- HOBBS, B. C. (1974). *Clostridium welchii* and *Bacillus cereus* infection and intoxication. *Postgrad. Med. J.* **50**: 597-602.
- HOBBS, B. C., ROBERTS, D. (1993). Food Poisoning and Food Hygiene, 6th Ed. London: Edward Arnold. p.: 29-30.
- HOLT, J. G., KRIEG, N. R., SNEATH, P. H. A., STALEY, J. T., WILLIAMS, S. T. (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
- ICMSF. (1996). Microorganisms in Foods 5. Characteristics of Microbial Pathogens. London: Blackie Academic & Professional. p.: 112-125.
- IMMERSEEL, F. V., DEBUCK, J., PASMANS, F., HUYGHEBAERT, G., HAESBROUCK, F., DUCATILLE, R. (2004). *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian Pathol.* **33**: 537-549.
- JAY, J. M., LOESSNER, M. J., GOLDEN, D. A. (2005). Modern Food Microbiology. 7th Ed. New York: Springer. p.: 567-572.

- JOHANSSON, A. GREKO, C., ENGSTRÖM, 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.
- KALENDER, H., ERTAŞ, H. B. (2005). Isolation of *Clostridium perfringens* from chickens and detection of the alpha toxin gene by polymerase chain reaction (PCR). *Turk J. Vet. Anim. Sci.* **29**: 847-851.
- 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**(6):1239-1247.
- KHACHATOURIAN, G. G. (1998). Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *CMAJ.* **159**(9): 1129-1136.
- LABBE, R. G. (1989). *Clostridium perfringens*. In: Foodborne bacterial pathogens. Ed.: Doyle, M. P. New York: Marcel Dekker Inc. p.: 192-234.
- LABBE, R. G., JUNEJA, V. K. (2006). *Clostridium perfringens* gastroenteritis. In: *Foodborne Infections and Intoxications 3rd. Ed.* Ed.: Riemann H. P., Cliver, D. O. London: Academic Press. p.: 137-164.
- LAWLEY, R., CURTIS, L., DAVIS, J. (2008). The Food Safety Hazard Guidebook. London: RSC Publishing. p.: 32-37.
- LECLERCQ, R., COURVALIN, P. (1991). Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob. Agents Ch.* **35**(7): 1267-1272.
- LEDERMAN, E. R., CRUM, N. F., WALLACE, M. R. (2004). Outbreak of *Clostridium perfringens* food-borne illness associated with a Mardi Gras celebration. *Infect. Dis. Clin. Prac.* **12**(3): 154-157.
- LI, J., SAYEED, S., MCCLANE, B. A. (2007). Prevalence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolates in Pittsburgh (Pennsylvania) area soils and home kitchens. *73*(22):7218-7224.
- LIN, Y., LABBE, R. (2003). Enterotoxigenicity and genetic relatedness of *Clostridium perfringens* isolates from retail foods in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(3): 1642-1646.
- LINCH, M., PAINTER, J., WOODRUFF, R., BRADEN, C. (2006). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks-United States, 1998-2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* **55**:1-34.
- LISLE, J. T., SMITH, J. J., EDWARDS, D. D., MCFETERS, G. A. (2004). Occurrence of microbial indicators and *Clostridium perfringens* in wastewater, water column samples, sediments, drinking water, and Weddell seal feces collected at McMurdo Station, Antarctica. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(12): 7269-7276.
- LOH, J. P. Y., LIU, C., CHEW, S.W., ONG, E. S., FAM, J.M., NG, Y.Y., TAYLOR, M. B., OOI, E. E. (2008). The rapid identification of *Clostridium perfringens* as the possible aetiology of a diarrhoeal outbreak using PCR. *Epidemiol. Infect.* **136**: 1142-1146.

- LUCEY, B. P., HUTCHINS, G. M. (2004). William H. Welch, MD, and the discovery of *Bacillus welchii*. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **128**: 1193-1195.
- LYRAS, D., ROOD, J. I. (1996). Genetic organization and distribution of tetracycline resistance determinants in *Clostridium perfringens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40(11)**: 2500-2504.
- MACFARLANE, M. G., KNIGHT, B. C. J. G. (1941). The biochemistry of bacterial toxins. The lecithinase activity of *Cl. welchii* toxins. *Biochem J.* **35(8-9)**: 884-902.
- MAGDELAINE, P., SPIESS, M. P., VALCESCHINI, E. (2008). Poultry meat consumption trends in Europe. *World Poultry Sci. J.*, **64**: 53-64.
- MARTEL, A., DEVRIESE, L. A., CAUWERTS, K., DE GUSSEM, K., DECOSTERE, A., HAESEBROUCK, F. (2004). Susceptibility of *Clostridium perfringens* strains from broiler chickens to antibiotics and anticoccidials. *Avian Pathol.* **33(1)**: 3-7.
- MARTEL, A., DEVRIESE, L. A., CAUWERTS, K., DE GUSSEM, K., DECOSTERE, A., HAESEBROUCK, F. (2004). Susceptibility of *Clostridium perfringens* strains from broiler chickens to antibiotics and anticoccidials. *Avian Pathol.* **33(1)**: 3-7.
- MARVAUD, J. C., STILES, B. G., CHENAL, A., GILLET, D., GIBERT, M., SMITH, L. A., POPOFF, M. R. (2002). *Clostridium perfringens* iota toxin. *J. Biol. Chem.* **277(46)**: 43659-43666.
- MATHEW, A. G., CISSELL, R., LIAMTHONG, S. (2007). Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. *Foodborne Pathog. Dis.* **4(2)**: 115-133.
- MBATA, T. I. (2005). Poultry meat pathogens and its control. *Int. J. Food Safety.* **(7)**: 20-28.
- MCCABE-SELLERS, B. J., BEATTIE, S. E. (2004). Food safety: emerging trends in foodborne illness surveillance and prevention. *J Am Diet Assoc.* **104**: 1708-1717.
- MCCLANE, B. A. (1996). An overview of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Toxicon.* **34(12)**: 1335-1343.
- MCCLANE, B. A. (2000). The action, genetics, and synthesis of *Clostridium perfringens* enterotoxin. In: *Microbial Foodborne Diseases. Mechanism of Pathogenesis and Toxin Synthesis*. Ed.: Cary, J. W., Linz, J. E., Bhatnagar, D. Pennsylvania: Technomic Publishing, p.: 247-271.
- MCCLANE, B. A. (2007). *Clostridium perfringens*. In: *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers, 3rd Ed.* Ed.: Doyle, M. P., Beuchat, L. R. Washington DC: ASM Press. p.: 423-455.
- MCCLANE, B. A., CHAKRABARTI, G. (2004). New insights into the cytotoxic mechanisms of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Anaerobe.* **10**: 107-114.
- MCCLUNG, L. S. (1945). Human food poisoning due to growth of *Clostridium perfringens* (*Cl. welchii*) in freshly cooked chicken: preliminary note. *J. Bact.* **50**: 229.
- MCEWEN, S. A., FEDORKA-CRAY, P. J. (2002). Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin. Infect. Dis.* **34(3)**: 93-106.

- MCSWANE, D., RUE, N., LINTON, R. (2003). Essentials of Food Safety and Sanitation. 3rd Ed: New Jersey: Prentice Hall. p: 1-22.
- MEDEIROS, L. C., HILLERS, V. N., KENDALL, P. A., MASON, A. (2001). Food safety education: what should we be teaching to consumers? *J. Nutr. Educ.* **33**(2): 108-113.
- MEER, R. R., SONGER, J.G. (1997). Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *Am J Vet Res.* **58**: 702-705.
- MEYER, M., THOLOZAN, J. L. (1999). A new growth and in vitro sporulation medium for *Clostridium perfringens*. *Letters Appl. Microbiol.* **28**(2): 98-102.
- MIKI, Y., MIYAMOTO, K., KANEKO-HIRANO, I., FUJIUCHI, K., AKIMOTO, S. (2008). Prevalence and characterization of enterotoxin gene carrying *Clostridium perfringens* isolates from retail meat products in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 5366-5372.
- MIWA, N., MASUDA, T., TERA, K., KAWAMURA, A., OTANI, K., MIYAMOTO, H. (1999). Bacteriological investigation of an outbreak of *Clostridium perfringens* food poisoning caused by Japanese food without animal protein. *Int. J. Food Microbiol.* **49**: 103-106.
- MIWA, N., NISHINA, T., KUBO, S., ATSUMI, M., HONDA, H. (1998). Amount of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meat detected by nested PCR. *Int. J. Food Microbiol.* **42**: 195-200.
- MODI, N., WILCOX, M. H. (2001). Evidence for antibiotic induced *Clostridium perfringens* diarrhoea. *J. Clin. Pathol.* **54**: 748-751.
- MOFFATT, C. R., HOWARD, P. J., BURNS, T. (2011). A mild outbreak of gastroenteritis in long-term care facility residents due to *Clostridium perfringens*, Australia 2009. *Foodborne Pathog. Dis.* **8**(7): 791-796.
- MOHAMED, M. E., SUELAM, I. I., SALEH, M. A. (2010). The presence of toxin genes of *Clostridium perfringens* isolated from camels and humans in Egypt. *Vet. Arhiv.* **80**: 383-392.
- MULDER, R. W. A. W. (1999). Hygiene during transport, slaughter and processing. *Poultry Meat Science*. Ed: Richardson, R. I., Mead, G. C. Oxfordshire: CABI publishing. p.: 277-283.
- MURRELL, T. G. C., ROTH, L. (1966). Pig-bel: enteritis necroticans. *Lancet.* **1**: 217-22.
- MURRELL, W. G., STEWART, B. J., O'NEILL, C., SIARAKAS, S., KARIKS, S. (1993). Enterotoxigenic bacteria in the sudden infant death syndrome. *J. Med. Microbiol.* **39**: 114-127.
- NAYLOR, C. E., EATON, J. T., HOWELLS, A., JUSTIN, N., MOSS, D. S., TITBALL R. W., BASAK, A. K. (1998). Structure of the key toxin in gas gangrene. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **5**(8): 738-746.
- NEWSTEAD, S. L., POTTER, J. A., WILSON, J. C., XU, G., CHIEN, C., WATTS, A. G., WITHERS, S. G., TAYLOR, G. L. (2008). The structure of *Clostridium perfringens* NanL sialidase and its catalytic intermediates. *J. Biol. Chem.* **283**(14): 9080-9088.
- NIILO, L. (1988). *Clostridium perfringens* type C enterotoxemia. *Can. Vet. J.* **29**: 658-664.

- NOVAK, J. S., JUNEJA, V. K. (2002). *Clostridium perfringens*: hazards in new generation foods. *Innov. Food Sci. Emerg.* **3(2)**: 127-132.
- NOWELL, V. J., POPPE, C., PARREIRA, V. R., JIANG, Y., REID-SMITH, R., PRESCOTT, J. F. (2010). *Clostridium perfringens* in retail chicken. *Aerobe*. **16**: 314-315.
- OCHIAI, H., OHTSU, T., TSUDA, T., KAGAWA, H., KAWASHITA, T., TAKAO, S., TSUTSUMI, A., KAWAKAMI, N. (2005). *Clostridium perfringens* foodborne outbreak due to braised chop suey supplied by chafing dish. *Acta Med Okayama*. **59(1)**: 27-32.
- OLOFSSON, A., HEBERT, H., THELESTAM, M. (1993). The projection structure of perfringolysin-O (*Clostridium perfringens* θ -toxin). *FEBS Letters*. **319(1-2)**: 125-127.
- PARADES-SABJA, D., TORRES, J. A., SETLOW, P., SARKER, M. R. (2008). *Clostridium perfringens* spore germination: characterization of germinants and their receptors. *J. Bacteriol.* **190(4)**: 1190-1201.
- PARIKH, A. L., JAY, M. T., KASSAM, D., KOCIEMBA, T., DWORKIS, B., BRADLEY, P. D. (1997). *Clostridium perfringens* outbreak at a juvenile detention facility linked to a Thanksgiving holiday meal. *West J Med* **166**: 417-419.
- 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(8)**: 2418-2424.
- PERELLE, S., GIBERT, M., BOQUET, P., POPOFF, M. R. (1993). Characterization of *Clostridium perfringens* θ -toxin genes and expression in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **61(12)**: 5147-5156.
- PETERSEN, L. R., MSHAR, R., COOPER JR., G. H., BRUCE, A. R., HADLER, J. L. (1988). A large *Clostridium perfringens* foodborne outbreak with an unusual attack rate pattern. *Am. J. Epidemiol.* **127(3)**: 605-611.
- PETIT, L., GIBERT, M., GILLET, D., LAURENT-WINTER, C., BOQUET, P., POPOFF, M. R. (1997). *Clostridium perfringens* epsilon-toxin acts on mdck cells by forming a large membrane complex. *J. Bacteriol.* **179(20)**: 6480-6387.
- PETIT, L., GIBERT, M., POPOFF, M. R. (1999). *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol.* **7(3)**: 104-110.
- POLLOCK, A. M., WHITTY, P. M. (1991). Outbreak of *Clostridium perfringens* food poisoning. *J. Hosp. Infect.* **17**: 179-186.
- RAHMATI, T., LABBE, R. (2008). Levels and toxigenicity of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* from retail seafood. *J. Food Protect.* **71(6)**: 1178-1185.
- RASMUSSEN, B. A., BUSH, K., TALLY, F. P. (1997). Antimicrobial resistance in anaerobes. *Clin. Infect. Dis.* **24(1)**: 110-120.
- RAY, B. (2003). *Fundamental Food Microbiology*. 3rd Ed. London: CRC Press. p.: 392-395.
- RAY, B., BHUNIA, A. (2008). *Fundamental Food Microbiology*. 4th Ed. Florida: CRC Press. p.: 315-318.

- REGAN, C. M., SYED, Q., TUNSTALL, P. J. (1995). A hospital outbreak of *Clostridium perfringens* food poisoning-implications for food hygiene review in hospitals. *J. Hospit. Infect.* **29**(1): 69-73.
- RIDELL, J., BJORKVOTH, 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 Prot.* **61**:240-243.
- ROACH, R. L., SIENKO, D. G. (1992). *Clostridium perfringens* outbreak associated with minestrone soup. *Am. J. Epidemiol.* **136** (10): 1288-1291.
- ROOD, J. I. (1998). Virulence genes of *Clostridium perfringens*. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**:333-360.
- ROOD, J. I., MAHER, E. A., SOMERS, E. B., CAMPOS, E., DUNCAN, C. L. (1978). Isolation and characterization of multiply antibiotic-resistant *Clostridium perfringens* strains from porcine feces. *Antimicrob. Agents Chemother.* **13**(5): 871-880.
- ROOD, J. I., COLE, S. T. (1991). Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Rev.* **55**: 621-648.
- SAITO, M. (1990). Production of enterotoxin by *Clostridium perfringens* derived from humans, animals, foods, and the natural environment in Japan. *J. Food Protect.* **53**(2): 115-118.
- SAKURAI, J., NAGAHAMA, M. (2006). *Clostridium perfringens* beta-toxin: characterization and action. *Toxin Rev.* **25**:89-108.
- SAKURAI, J., NAGAHAMA, M., ODA, M., TSUGE, H., KOBAYASHI, K. (2009). *Clostridium perfringens* iota-toxin: structure and function. *Toxins*. **1**: 208-228.
- SARKER, M. R., SHIVERS, R. P., SPARKS, S. G., 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 genes versus chromosomal enterotoxin genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:3234-3240.
- SCALLAN, E., HOEKSTRA, R. M., ANGULO, F. J., TAUXE, R. V., WIDDOWSON, M. A., ROY, S. L., JONES, J. L., GRIFFIN, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 1-21.
- SCHALCH, B., BADER, L., SCHAU, H., BERGMANN, R., ROMETSCH, A., MAYDL, G., KEßLER, S. (2003). Molecular typing of *Clostridium perfringens* from a food-borne disease outbreak in a nursing home: ribotyping versus pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **41**(2):892-895.
- SCHALCH, B., SPERNER, B., EISGRUBER, H., STOLLE, A. (1999). Molecular methods for the analysis of *Clostridium perfringens* relevant to food hygiene. *Immun. Med. Microbiol.* **24**:281-286.
- SEVERIN, W. P. J., FUENTE, A. A., STRINGER, M. F. J. (1984). *Clostridium perfringens* type C causing necrotizing enteritis. *Clin. Pathol.* **37**:942-944.

- SHATURSKY, O., BAYLES, R., ROGERS, M., JOST, B. H., SONGER, J. G., TWETEN, R. K. (2000). *Clostridium perfringens* beta-toxin forms potential-dependent, cation-selective channels in lipid bilayers. *Infect. Immun.* **68**(10): 5546-5551.
- SHORTT, S. J., TITBALL, R. W., LINDSAY, C. D. (2000). An assessment of the in vitro toxicology of *Clostridium perfringens* type D ϵ -toxin in human and animal cells. *Hum. Exp. Toxicol.* **19**: 108-116.
- SILVA, R. O. S., SALVARANI, F.M., ASSIS, R.A., MARTINS, N.R.S., PIRES, P.S., LOBATO, F.C.F. (2009). Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* strains isolated from broiler chickens. *Braz. J. Microbiol.* **40**(2): 262-264.
- SINGH, R.V., BHILEGAONKAR, K.N., AGARWAL, R.K. (2005) Studies on occurrence and characterization of *Clostridium perfringens* from select meats. *J. Food Safet* **25**: 146-156.
- SONGER, J. G. (1996). Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**(2): 216-234.
- SONGER, J. G. (2010). Clostridia as agents of zoonotic disease. *Vet. Microbiol.* **140**(3-4): 399-404.
- 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 poisoning in North America. *J. Clin. Microbiol.* **39**(3): 883-888.
- SPSS. (2013). Statistical Analysis Package Program. Version 14.1. Ref. No: 4028472.
- STAGNITTA, P., MICALIZZI, B., STEFANINI DE GUZMA, A. M. (1999). *Clostridium perfringens* in meat products consumed in San Luis, Argentina. *Anaerobe.* **5**: 413-415.
- STEVENS, D. L., BRYANT, A. E. (2002). The role of clostridial toxins in the pathogenesis of gas gangrene. *Clin. Infect. Dis.* **35**(1): 93-100.
- STILES, B. G., WILKINS, T. D. (1986). Purification and characterization of *Clostridium perfringens* iota toxin: dependence on two nonlinked proteins for biological activity. *Infect. Immun.* **54**(3): 683-688.
- SUTTON, R. G. A., HOBBS, B. C. (1967). Food poisoning caused by heat-sensitive *Clostridium welchii*. A report of five recent outbreaks. *J. Hyg. Camb.* **66**: 135-146.
- TALLIS, G., NG, S., FERREIRA, C., TAN, A., GRIFFITH, J. (1999). A nursing home outbreak of *Clostridium perfringens* associated with pureed food. **23**(4): 421-423.
- TANSUPHASIRI, U., MATRA, W., SANGSUK, L. (2005). Antimicrobial resistance among *Clostridium perfringens* isolated from various sources in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* **36**(4): 954-961.
- TEUBER, M. (1999). Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. *Cell. Mol. Life Sci.* **56**: 755-763.
- THAM, W. A., HAJDU, L. J., DANIELSSON-THAM, M. L. V. (1990). Bacteriological quality of on-farm manufactured goat cheese. *Epidemiol. Infect.* **104**: 87-100.

- TITBALL, R. W. (2005). Gas gangrene: an open and closed case. *Microbiology*. **151**: 2821-2828.
- TITBALL, R. W., NAYLOR, C. E., BASAK, A. K. (1999). The *Clostridium perfringens* toxin. *Anaerobe*. **5**: 51-64.
- URSCHEL, J. D. (1999). Necrotizing soft tissue infections. *Postgrad. Med. J.* **75**: 645-649.
- UZAL, F. A., MCCLANE, B. A. (2011). Recent progress in understanding the pathogenesis of *Clostridium perfringens* type C infections. *Vet. Microbiol.* **153**(1-2): 37-43.
- VIDAL, J. E., MCCLANE, B. A., SAPUTO, J., PARKER, J., UZAL, F. A. (2008). Effects of *Clostridium perfringens* beta-toxin on the rabbit small intestine and colon. *Infect Immun.* **76**(10): 4396-4404.
- VOIDAROU, C., BEZIRTZOGLU, E., ALEXOPOULOS, A., PLESSAS, A., STEFANIS, C., PAPADOPOULOS, I., VAVIAS, S., STAVROPOULOU, E., FOTOUA, K., TZORA, A., SKOUFOS, I. (2011). Occurrence of *Clostridium perfringens* from different cultivated soils. *Anaerobe*. **17**: 320-324.
- VOS, P., GARRITY, G., JONES, D., KRIEG, N. R., LUDWIG, W., RAINEY, F. A., SCHLEIFER, K., WHITMAN, W. B. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. London: Springer Press. p.: 799-800.
- WATKINS, K. L., SHRYOCK T. R., DEARTH, R. N., SAIF, Y. M. (1997). In-vitro antimicrobial susceptibility 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.
- WIECKOWSKI, E. U., WNEK, A. P., MCCLANE, B. A. (1994). Evidence that an 50-kDa mammalian plasma membrane protein with receptor-like properties mediates the amphiphilicity of specifically bound *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J. Biol. Chem.* **269**: 10838-10848.
- WRIGLEY, D. M. (1994). *Clostridium perfringens*. In: *Foodborne Disease Handbook. Diseases Caused by Bacteria*. Ed.: Hui, Y. H., Gorham, J. R., Murrell, K. D., Cliver, D. O. New York: Marcel Dekker Inc. p.: 133-166.
- YANG, Z., SHIM, W., KIM, K., CHUNG, D. (2010). Rapid detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meat samples using immunomagnetic separation polymerase chain reaction (IMS-PCR). *J. Agric. Food Chem.* **58**: 7135-7140.
- YOO, H. S., LEE, S., 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.
- YOUNG, M. K., SMITH, P., HOLLOWAY, J., DAVISON, R. P. (2008). An outbreak of *Clostridium perfringens* and the enforcement of food safety standards. *Commun. Dis. Intell.* **32**: 462-465.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Güzin
 Soyadı : İPLİKÇİOĞLU ÇİL
 Doğum yeri ve tarihi : Ankara, 22. 05. 1984
 Uyruğu : T.C.
 Medeni durumu : Evli
 İletişim adresi : Alacaatlı Mah. 3360. Sok. 2/20 Çayyolu-ANKARA
 Telefon : 0 533 026 20 76

II- Eğitim Durumu

İlkokul : 1991-1996 TED Ankara Koleji
 Ortaokul : 1996-1999 TED Ankara Koleji
 Lise : 1999-2001 TED Ankara Koleji
 Üniversite : 2001-2006 Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
 Doktora : 2006- Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
 Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi ABD
 Yabancı Dili : İngilizce

III- Ünvanları

: 2006 Veteriner Hekim
 : 2007 Araştırma Görevlisi
 (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi)

IV- Bilimsel İlgi Alanları

Ulusal Makaleler:

1. Erol, İ., İplikçioğlu, G. 2007. Su hijyeni. Gıda hattı, 9, 54-59.

2. **Çil İplikçioğlu G.** 2012. Proteomiks ve gıda endüstrisinde kullanım alanları. *Journal of Food*. 37(5): 303-308.
3. Şireli U. T., **Çil İplikçioğlu G.**, Saner S. (2012). Gıda kaynaklı *Salmonella* infeksiyonlarında son durum. *Gıda Güvenliği*, Ekim-Aralık, 54-57.
4. **Çil İplikçioğlu G.** (2013). Antraks(Şarbon). *Köy-KoopHaber*. 19(2): 16.
5. **Çil İplikçioğlu G.** (2013). Hayvansal gıdalarda hileler ve halk sağlığı açısından önemi. *Veteriner Hekimler Derneği Bülteni*. 6: 12-15.
6. **Çil İplikçioğlu G.**, Demirel N. Y., Şireli U. T. (2013). Inactivation of *Salmonella* Typhimurium on poultry meat by electrolyzed water. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*. 83(2): 48-53.

Ulusal Bildiri:

1. Erol İ, **İplikçioğlu G.** 2007. Hayvansal gıdalarda antibiyotik kalıntılarının halk sağlığı yönünden önemi. 10-11 Eylül, Antibiyotik Kullanım Strateji ve Kalıntıları Sempozyumu, Bornova Vet. Kont. Arş. Ens., Bornova, İzmir.
2. Keyvan E., Çınar Kıl B., Bilgen N., **Çil İplikçioğlu G.**, Şireli U. T. (2013). Farklı tip et ürünlerinde PCR yöntemi ile tür tayini. 5. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, 3-6 Nisan, Antalya, 2013.

Uluslararası Bildiri:

1. **Çil İplikçioğlu G.**, Demirel Y. N. , Şireli U. T. 2012. Inactivation of *Salmonella* Typhimurium on poultry meat by electrolyzed water. Days of Veterinary Medicine. 3rd International Scientific Meeting. 2-4 Eylül. Ohrid, Makedonya.

Kitap Bölümü:

1. Sarımeahmetoğlu B, Çelik T. H., **İplikçioğlu G.** 2010. Hayvansal Gıdalardaki Hormon Kalıntılarının Üreme ve Cinsel Sağlık Üzerine Etkileri. Ed: Çayan S., Ayyıldız A. Çevrenin Erkek Cinsel Sağlığına Etkisi ve Korunma Yolları. Ayrıntı Basımevi. 2010.

V. Bilimsel Etkinlikleri

Seminerleri:

1. Fonksiyonel gıdalar (2002)
2. Proteomiks (2003)