



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**YENİLEBİLİR PİLİÇ İÇ ORGANLARINDA *CLOSTRIDIUM
PERFRINGENS*'İN SAPTANMASI VE MOLEKÜLER
TİPLENDİRİLMESİ**

Alireza HANİFEHNEZHAD

**GIDA HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. İrfan EROL**

2012- ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmektedir.

Tez Savunma Tarihi: 09. 10. 2012

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	x
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Tarihçe	2
1.2. Klasifikasyon ve Genel Özellikler	2
1.2.1. <i>C. perfringens</i>'in Toksin Tipleri	4
1.2.1.1. Alfa- toksin (α)	4
1.2.1.2. Beta- toksin (β)	4
1.2.1.3. Epsilon- toksin (ϵ)	5
1.2.1.4. İota- toksin (ι)	5
1.2.1.5. Teta- toksin (θ)	5
1.2.1.6. Delta- toxin (δ)	5
1.2.1.7. Lambda- toxin (λ)	5
1.2.1.8. Mu - toksin (μ)	6
1.2.1.9. Enterotoksin (CPE)	6
1.2.1.10. Nöraminidaz	7
1.3. <i>C. perfringens</i>' in Gelişimini Etkileyen Faktörler	7
1.3.1. Sıcaklık	7
1.3.2. Oksidasyon Redüksiyon Potansiyeli (E_h)	7
1.3.3. Su Aktivitesi (a_w değeri)	8

1.3.4. pH	8
1.3.5. Tuz	8
1.3.6. <i>C. perfringens</i> 'in inhibitörleri	8
1.4. Gıda Kaynaklı <i>C. perfringens</i> İnfeksiyonları	9
1.4.1. Enteritis Nekroticans (Pig bel)	10
1.5. Gıda Kaynaklı <i>C. perfringens</i> İnfeksiyonlarının Epidemiyolojisi	10
1.6. <i>C. perfringens</i> 'in Bulaşma Kaynakları	11
1.6.1. Su ve Toprak	11
1.6.2. Dışkı	12
1.6.3. Gıdalar	12
1.6.3.1. Kanatlı Eti ve Ürünlerinde <i>C. perfringens</i> 'in Varlığı	12
1.6.3.2. Kırmızı Et ve Et Ürünlerinde <i>C. perfringens</i> 'in Varlığı	13
1.6.3.3. Diğer Gıdalarda <i>C. perfringens</i> 'in Varlığı	15
1.7. Korunma ve Kontrol	15
2. GEREÇ VE YÖNTEM	17
2.1. Gereç	17
2.1.1. Örnek	17
2.1.2. <i>C. perfringens</i> 'in İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri ve Test Ayıraçları	17
2.1.2.1. <i>Perfringens</i> Enrichment Medium	17
2.1.2.2. <i>Perfringens</i> (TSC) Selective Supplement	17
2.1.2.3. Tryptose Sulphite Cycloserin (TSC) Agar	18
2.1.2.4. Columbia Blood Agar Base	18
2.1.2.5. Lactose Gelatin Medium	18
2.1.2.6. Motility Nitrate Medium	19

2.1.2.7. Griess-Ilosvay Solüsyonu (A)	19
2.1.2.8. Griess-Ilosvay Solüsyonu (B)	19
2.1.2.9. Asit Fosfataz Testi	20
2.1.2.9.1. Fosfataz Ayırıcının Bileşimi	20
2.1.2.9.2. Sodyum Sitrat Buffer Hazırlanışı	20
2.2.10. Katalaz Testi	20
2.2.11. Anaero <i>Gen</i> Gaz Kitleri	21
2.2.12. Test Suşu	21
2.1.3. PCR İçin Kullanılan Maddeler	21
2.1.3.1. DNA Marker	21
2.1.3.2. Test Suşlar	21
2.1.3.3. Primer Çiftleri	22
2.1.3.4. TBE Solüsyonu	22
2.1.3.5. Ethidium Bromide	23
2.1.3.6. Agaroz Jel	23
2.2. Yöntem	23
2.2.1. <i>C. perfringens</i> 'in İzolasyon	24
2.2.2. <i>C. perfringens</i> 'in İdentifikasyonu	24
2.2.2.1. Gram Boyama ile Mikroskopik Bakı	25
2.2.2.2. Katalaz Testi	26
2.2.2.3. Nitrat Motilite Testi	26
2.2.2.4. Laktoz jelatin Testi	26
2.2.2.5. Reverse – CAMP Testi	26
2.2.2.6. Asit Fosfataz Testi	27
2.2.3. <i>C. perfringens</i> İzolatlarının Muhafazası	27
2.2.4. <i>C. perfringens</i> İzolatlarının Multipleks PCR ile Moleküler Tiplendirmesi	27
2.2.4.1. DNA Ekstraksiyonu	28
2.2.4.2. <i>C. perfringens</i> 'in <i>cpa</i> Geni Tespiti	28

2.2.4.2.1. PCR Protokolü ve Amplifikasyonu	28
2.2.4.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi	29
2.2.4.3. Multipleks PCR ile Toksin Genlerinin Tespiti	29
2.2.4.3.1. Multipleks PCR Protokolü	29
2.2.4.3.2. Agaroz Jel Elektroforez	30
3. BULGULAR	31
4. TARTIŞMA	37
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	41
ÖZET	42
SUMMARY	43
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	52

ÖNSÖZ

İnsanlar yaşamak, fiziksel ve mental gelişimlerini sağlamak için gıda güvenliğine uygun olarak üretilmiş gıdaları yeterli miktarda tüketmelidir. Kanatlı hayvan eti, gerek ekonomik olması, gerek düşük kolesterol içeriği nedeni ile dünya genelinde yaygın olarak tüketilmektedir. Tavuk eti, protein, vitamin, mineral ve bazı büyüme faktörleri yönünden insan beslenmesinde büyük bir öneme sahipken, mikroorganizmaların gelişimi için de uygun bir ortam oluşturmaktadır. Özellikle bazı patojen mikroorganizmalar hayvanların mikroflorası ve çevresel kaynaklı olarak kesim işlemi sırasında çiğ etin kontaminasyonuna neden olduğu gibi, etlerin parçalama, işleme, paketlenme, muhafaza ve taşıma aşamalarında oluşan çapraz kontaminasyonlarla son ürünü kontamine ederek insan sağlığını tehdit etmektedirler.

Tavuk eti ve ürünlerinde varlığı tespit edilen *Clostridium perfringens* dünyada önemli halk sağlığı sorunlarına neden olmaktadır. Özellikle *C. perfringens* ile kontamine tavuk etlerinden hazırlanan yemeklerin, uygun olmayan koşullarda uzun süre muhafaza edilmesi, tekrarlanan ısı işlemi uygulamalarının yetersiz olması gibi nedenlere bağlı olarak gıda enfeksiyonu riski taşımaktadır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda *C. perfringens*'ten ileri gelen gıda enfeksiyonlarında etkenin asıl virulens faktörünün *cpe* geni etkisiyle sentezlenen enterotoksini (CPE) olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan literatür taramalarında yenilebilir piliç iç organlarında *C. perfringens*'in moleküler tiplendirilmesinin yapıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yenilebilir piliç iç organlarında, *C. perfringens*'in varlığı araştırılarak, saptanan izolatların *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA*, *cpe* ve *cpb2* genleri yönünden multipleks PCR yöntemiyle moleküler karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada ve yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve desteklerini benden esirgemeyen, yardımlarını her zaman üzerimde hissettiğim meslek hayatımda daima örnek alacağım danışman hocam, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürü Sayın Prof. Dr. İrfan EROL'a, Anabilim Dalındaki değerli hocalarıma, tez kontrolünde yardımcı olan Doç. Dr. Muammer GÖNCÜOĞLU' na,

bu çalışmada her zaman bana gönülden destek olan, Sayın Vet. Hekim Meriç pelin TUNALI'ya, Arş. Gör. Güzin İPLİKÇİOĞLU' na, PCR çalışmasında yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Murat ULUDAĞ'a, tez çalışma süresinde her zaman yardımcı olan meslek arkadaşım Alireza DAFE'ye, bu günlere gelmemde hayatlarını ortaya koyan çok değerli aileme, özellikle manevi desteklerini esirgemeyen saygı değer kız kardeşim Dr. Saeideh HANİFEHNEZHAD'a sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	: Alfa
β	: Beta
ϵ	: Epsilon
θ	: Teta
ι	: İota
κ	: Kappa
λ	: Lambda
μm	: Mikrometre
a_w	: Activity of water – Su aktivitesi
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention – Amerika Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi
Kob/g	: Koloni oluşturan birim
CPE	: <i>Clostridium perfringens</i> Enterotoksini
cpe	: <i>Clostridium perfringens</i> enterotoksin geni
DNA	: Deoxyribonucleic acid - Deoksiribonükleik asit
FAO	: Food and Agriculture Organization - Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	: Food and Drug Administration – Amerika Gıda İlaç Dairesi
HACCP	: Hazard Analysis and Critical Control Points - Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları
IMS	: Immunomagnetic Separation- İmmunomanyetik Separasyon
kDA	: Kilo Dalton
MID	: Minimum Infective Dose - Minimal Enfeksiyon Dozu
MPN	: Most Probable Number -En Muhtemel Sayı
PCR	: Polymerase Chain Reaction – Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEM	: Perfringens Enrichment Medium
TSC	: Tryptose Sulphite Cycloserine
WHO	: World Health Organization - Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

- Şekil 2.1.** Tryptose Cycloserine (TSC) agarda *C. perfringens* şüpheli kolonilerin görünümü 25
- Şekil 2.2.** Gram boyamada *C. perfringens*’ in mikroskopik görünümü 25
- Şekil 3.1.** Piliç iç organlarında kültür tekniği ile saptanan *Clostridium* spp. ve *C. perfringens* pozitif örneklerin dağılımı 32
- Şekil 3.2.** Kültür tekniği ile saptanan *Clostridium* spp. kolonilerinin dağılımı 32
- Şekil 3.3.** Kültür tekniği ile saptanan *Clostridium* spp. kolonilerinin piliç iç organları örneklerine göre dağılımı 33
- Şekil 3.4.** Standart PCR ile *cpa* geni (324 bp) içeren *C. perfringens* izolatlarının görünümü. 34
- Şekil 3.5.** PCR tekniği ile *C. perfringens* olarak doğrulanan örnek tipine göre dağılım 35
- Şekil 3.6.** Multipleks PCR ile *cpa* (324bp), *cpb* (196 bp), *etx* (655bp), *ia* (446bp), *cpb2* (567bp), *cpe* (233bp) genlerinin görünümü 36
- Şekil 3.7.** Multipleks PCR ile *C. perfringens*’in *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA*, *cpe* ve *cpb2* gen sekansları esas alınarak moleküler karakterizasyonu ve örnek tipine göre dağılımı 36

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. <i>C. perfringens</i> 'in sentezlediği toksinleri	4
Çizelge 1.2. Pişirmeye hazır et ürünlerinde <i>C. perfringens</i> 'in insidensi	14
Çizelge 1.3. Tüketime hazır et ürünlerinde <i>C. perfringens</i> insidensi	14
Çizelge 2.1. <i>C. perfringens</i> 'in identifikasyonu için kullanılan biyokimyasal testler	25
Çizelge 3.1. Piliç iç organlarında kültür tekniği ile saptanan <i>C. perfringens</i> pozitif örneklerin dağılımı	31
Çizelge 3.2. Kültür tekniği ile saptanan <i>Clostridium</i> kolonilerinin piliç iç organları (kalp- karaciğer ve taşlık) örneklerine göre dağılımı	33
Çizelge 3.3. Standart PCR tekniği ile <i>C. perfringens</i> olarak izolatların örneklere göre dağılımı	34
Çizelge 3.4. Multipleks PCR ile <i>C. perfringens</i> 'in <i>cpa</i> , <i>cpb</i> , <i>etx</i> , <i>iA</i> , <i>cpe</i> ve <i>cpb2</i> gen sekansları esas alınarak moleküler karakterizasyonu ve örnek tipine göre dağılımı	35

1. GİRİŞ

Gıda hijyeni, uygun hammadde kullanılarak üretimden tüketime kadar gıdaların hijyenik koşullara uygun ve güvenli olarak elde edilmesidir. Bu konsept hijyenik kaliteyi olumsuz yönde etkileyecek faktörlerin ortadan kaldırılmasını, ya da en az düzeye indirilmesini amaçlamaktadır. Hijyenik olarak üretilmeyen gıdalar çeşitli etkenlerle kontamine olabilmektedir. Bu durum çeşitli halk sağlığı problemleri ile büyük ekonomik kayıplara yol açabilmektedir. Gıda güvencesi insanların sağlıklı ve aktif yaşamlarını sürdürebilmeleri için yeterli, güvenli ve besin değeri yüksek gıdalara ulaşabilmeleri olarak tanımlanmaktadır (FAO, 2003).

ABD Hastalık Kontrol Merkezi'nin (Centers for Disease Control and Prevention) 2011 yılı raporuna göre ABD'de her yıl 48 milyon insan (her altı kişiden biri) gıda kaynaklı hastalıklardan etkilenmektedir. Hastalıkların % 90'ı *Salmonella*, *Norovirüs*, *Campylobacter*, *Toxoplasma*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* ve *Clostridium perfringens* gibi birçok farklı etkenden kaynaklanmaktadır. Bu enfeksiyonların yaklaşık % 58'i *Norovirüs*, % 11'i tifoid olmayan *Salmonella* spp., % 10'u *C. perfringens* ve % 9'u *Campylobacter* spp. kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Mead ve ark., 1999; Anon, 2011).

Milyonlarca insanın etkilendiği ve büyük ekonomik kayıplara neden olan gıda kaynaklı hastalık etkenleri bitki, hayvan, insan ve toprak kökenli olarak gıdalara bulaşabilmektedir. Gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonların çoğu kontamine hayvansal gıdalar nedeniyle oluşmaktadır. Kontaminasyon hayvansal gıda üretim zincirinin çiftlikten sofraya kadar her aşamasında oluşabilmektedir (Anon, 2004).

C. perfringens insan ve hayvanların bağırsak florası ile çevrede yaygın olarak bulunmaktadır. Bu nedenle personel, alet ve ekipman hijyeninin yeterli olmadığı başta kesimhaneler olmak üzere et işletmelerinde etken ile kontaminasyon riski artmaktadır (Mead, 1994). Kırmızı et, kanatlı eti ve ürünleri *C. perfringens* yönünden riskli gıdalar arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Özellikle gıdaların pişirme

sonrasında oda sıcaklığında muhafaza edilmeleri ve soğutma işleminin yetersiz olması ısıya dirençli *C. perfringens* sporlarının vejetatif forma dönüşerek hızla çoğalmasına neden olmaktadır (Labbe, 1989).

Son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen veriler *C. perfringens* kaynaklı gıda infeksiyonlarının önem kazandığını göstermektedir (Riley ve ark., 1999).

1.1. Tarihçe

C. perfringens ilk olarak 1892 yılında Amerikalı bakteriyolog Welch tarafından tanımlanmış ve *Bacillus aerogenes capsulatus* olarak adlandırılmıştır. Bu etken zaman içerisinde İngiltere’de *C. welchii*, Almanyada Welch-Frankel Basili ve Bergey’s Manual sistematığında *C. perfringens* olarak adlandırılmıştır. *C. perfringens* Gram pozitif, anaerob, spor oluşturan ve yara infeksiyonları ile gazlı gangrene neden olan bir etkidir. *C. perfringens* gıda infeksiyonu etkeni olarak 1940’larda tanımlanmıştır. Etkenin A tipinden sıklıkla kaynaklanan enterit ve daha az C tipinden kaynaklanan nekrotik enteritise (Pig-bel, Darmbarnd) rastlanmaktadır (Freeman, 1979; Hatheway, 1990; Yoo ve ark., 1997; Erol, 2007).

1.2. Klasifikasyon ve Genel Özellikler

C. perfringens *Clostridiaceae* familyasında, Gram pozitif, fakültatif anaerob, çubukçuk şeklinde, 3-9/ 1.0-1.5 µm boyutlarında, sporlu, hareketsiz, katalaz negatif, H₂S oluşturan, lesitinaz ve jelatinaz pozitif, nitrat indirgeme ve laktozu fermente etme özelliğine sahip bir bakteridir. Sporları oval şekilde olup santral veya subterminal lokalizasyona sahiptir. Bu sporlar ısı ve kurutma işlemelerine karşı dayanıklıdır (Labbe, 1989; Cooper ve Songer, 2009).

C. perfringens optimal 45 °C’de (üreme aralığı 14- 50 °C), pH 6-7 (pH değeri 5- 9 arasında) ve 0.95-0.97 a_w değerinde gelişir. Etkenin vejetatif formları % 6’lık

tuzlu ortamda baskılanırken spor formları % 21.5'luk NaCl'de canlılığını koruyabilmektedir (Labbe, 2000; Johansson, 2004).

Etkenin vejetatif formu ısıya karşı duyarlı olup, yaklaşık % 90'ı 60 °C' de 5 dakikada yıkımlanmaktadır. Buna karşın spor formunun ısıya ve çevresel faktörlere direnci değişkenlik göstermektedir. Isıya dirençli spor formları 90 °C' de 15 dakika ile 145 dakika arasında, ısıya duyarlı sporlar ise 90 °C' de 3-5 dakika arasında yıkımlanmaktadır (Labbe, 1989). Dondurma işlemi *C. perfringens* ve sporları üzerine oldukça etkili olup, uzun süreli muhafaza koşullarında (-18 °C'de 3-6 ay) etken canlılığını kaybedebilmektedir. Ayrıca *C. perfringens* sporlarının hipoklorit ve UV etkisiyle yıkımlanabildiği saptanmıştır (Jay, 1992; Garsia ve Heredia, 2009).

C. perfringens'in A, B, C, D ve E tipleri başlıca alfa, beta, gama, epsilon ve iota toksinlerini oluşturur. Bütün tipler tarafından oluşturulan alfa toksin letal, nekrotik ve hemolitik özelliktedir. *C. perfringens*'in B, C, D, E ile muhtemelen A tipi hayvanlar için A, C ve D tipleri de insanlar için patojendir. Bunların arasında gıda enfeksiyonlarına neden olanlar A ve C tipleridir. Etkenin temel virülens faktörü lesitinaz olup başlıca hemolizin, hiyaluronidaz, kollajenaz, DNAz ve amilaz gibi çeşitli hidrolitik enzimleri sentezleyebilmektedir (Kalender ve Ertaş, 2005; Erol, 2007; Garsia ve Heredia, 2009).

C. perfringens'in vejetatif formu gıdada hızla çoğalma özelliğine sahiptir. Etken, gelişim için yüksek amino asit, vitamin ve mineral madde içeriğine (biotin, pantotenik asit, pridoksal, adenin ve diğerleri) ihtiyaç duyduğundan genellikle hayvansal gıdalar etken için daha uygun bir ortam görevi görmektedir. Ayrıca heterofermentatif olarak çoğu karbonhidratı parçaladığı bilinmektedir (Jay, 1992; Erol, 2007).

C. perfringens'in gelişimi bulunduğu besi yerine ve gelişim fazına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Örneğin; durgunluk evresinde glikoz bakımından zengin olan besi yerindeki bakteri boyutu daha kısa iken, nişasta içeren besi yerinde daha uzun olmaktadır (Labbe, 1989).

C. perfringens toz, toprak, su, gibi çevresel kaynaklar, insan ve hayvanların bağırsaklarından bulaşmaktadır. Gıdaların etken ile kontaminasyonu bağırsak içeriği ve ya hava, su, alet ekipman ile temas sonucunda olmaktadır (Heredia ve Labbe., 2001; Brynestad ve Granum., 2002).

1.2.1. *C. perfringens*'in toksin tipleri

C. perfringens ürettiği nekrotik, hemolitik ve letal özellikte protein yapıdaki 4 büyük toksin (α , β , ϵ , ι) esas alınarak A-E olarak tanımlanan 5 değişik tipe ayrılmıştır (Heredia ve Labbe, 2001; Brynestad ve Granum, 2002). *C. perfringens* tarafından sentezlenen toksinler ve tipleri Çizelge 1. 1.'de belirtilmektedir.

Çizelge 1.1. *C. perfringens*'in sentezlediği toksinler (Rood ve Cole, 1991).

<i>C. perfringens</i> 'in Tipleri	Üretilen Toksinler											
	α	B	ϵ	ι	δ	θ	κ	λ	μ	ν	Nm ^a	En ^b
A	+++	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
B	+	++	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
C	+	++	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
D	+	-	++	-	-	+	+	+	+	+	+	+
E	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+

N m^a, Nöraminidaz : En^b, Enterotoksin

1.2.1.1. Alfa toksin (α): Hücre membranına etkiyerek hücre ölümüne neden olan nekrotik özellikteki bu toksin *C. perfringens*'in tüm tipleri (A, B, C, D, E) tarafından salgılanmaktadır. Bu toksin insanlarda gazlı gangren, hayvanlarda ise nekrotik enteritis ve enterotoksemiye neden olabilmektedir (Yoo ve ark., 1997; Cavalcanti ve ark., 2004).

1.2.1.2. Beta toksin (β): Beta toksin polipeptid ve ısıya dirençli olmasına karşın tripsine karşı oldukça duyarlı bir toksindir. *C. perfringens* tip B ve C tarafından salgılanan letal ve nekrotik özellikteki bu toksin hayvanlarda enterotoksemi ve

nekrotik enteritise, insanlarda ise yalnızca nekrotik enteritise neden olmaktadır (Adams ve Moss, 1995; Cavalcanti ve ark., 2004).

1.2.1.3. Epsilon toksin (ϵ): Protoksin salgılayarak tripsine benzer şekilde bağırsak proteazları üzerine etkilidir. Toksin bağırsak permeabilitesini arttırarak dolaşım sistemine kolaylıkla ulaşabilmektedir. Letal ve nekrotik özellikteki epsilon toksin *C. perfringens* tip B ve D tarafından salgılanır ve koyunlarda yumuşak böbrek hastalığına neden olabilmektedir (McDonel, 1986; Miyamoto ve ark., 2000).

1.2.1.4. İota toksin (ι): İota toksin a ve b olarak adlandırılan iki bağımsız polipeptid kısmına sahiptir. Bu toksin *C. perfringens* tip E tarafından salgılanan dermonekrotik ve letal etkili bir protoksindir (Yoo ve ark., 1997). Dana ve koyunlarda önemli bir enterotoksemi nedenidir (Rood ve Cole, 1991; Cavalcanti ve ark., 2004).

1.2.1.5. Teta toksin (θ): Letal ve sitolitik özellikteki bu toksin etkenin tüm tipleri tarafından salgılanır. θ toksin hemolizin, perfringolizin veya tiyol etkili bir sitolizin olarak da bilinmektedir (Tweten, 1988). Teta toksin, *C. perfringens* tarafından oluşturulan gazlı gangren ile ilişkili olup doku nekrozunda rol oynamaktadır (Stevens ve ark., 1987).

1.2.1.6. Delta toksin (δ): *C. perfringens* delta toksin hemolitik özelliğe sahip olup tip B ve C tarafından salgılanır. Delta toksin ruminantlarda eritrositler üzerinde bulunan reseptörlere immunojenik olarak tutunarak litik etki göstermektedir. Fakat insan, tavşan ve atlarda spesifik reseptörlerin az sayıda olması nedeniyle bu etkiye sahip değildir (Cavalcanti ve ark., 2004).

1.2.1.7. Lambda toksin (λ): Lambda toksin *C. perfringens* tip B, E ve bazı tip D'ler tarafından üretilmektedir. Evcil hayvanlarda enterit ve enterotoksemiye neden olmaktadır (Rood ve Cole, 1991).

1.2.1.8. Mu toksin (μ): Mu toksin hiyaluronidaz yapıda olup bağ dokunun önemli bir ögesi olan hiyaluronik asit miktarını azaltır. Bu toksin, ticari olarak noroamidiaz preparatlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (McDonel, 1986).

1.2.1.9. Enterotoksin (CPE): *C. perfringens* enterotoksini etkenin en önemli virülens faktörlerinden biridir (McClane, 1994). Molekül ağırlığı 35 kDa ve izoelektrik nokta pH değeri 4.3'dür. Enterotoksin yaklaşık 309-320 aminoasitten oluşan tek bir polipeptittir. Yapısı serin, lösin, glutamik asit, izolösin, glisin ve tireonin gibi amino asitler bakımından zengindir (Heredia ve Labbe., 2001; Garcia ve Heredia., 2009).

CPE *C. perfringens*'in A, C ve D tiplerinden sentezlenmektedir. *C. perfringens* toksinlerinin oluşumu için spor formlar büyük öneme sahiptir. Gıda ile 10^6 kob/g düzeyinde alınan vejetatif formdaki etkenin bir kısmı mide asitliğinde yıkımlanmaktadır. Canlılığını sürdürerek ince bağırsaklara ulaşan etkenler burada spor formlarını oluşturur. Enterotoksin, sporlanmış hücreler içinde oluşarak hücrenin lize olması ile ortama salınmaktadır (MacClane, 1992).

CPE'nin etki mekanizması bilinen diğer enterotoksinlerin karşılaştırması yapılarak belirlenmiştir. CPE'nin hızla hareket ederek ince bağırsak villuslarına bağlanıp villusları yıkılmadığı, bu etkinin en az 30 dakikada görüldüğü saptanmıştır. CPE'nin sentezlenip hücrenin lize olarak serbest kalması için yaklaşık 6-12 saat gerekli olmakta ve semptomlar bu süre içerisinde görülmeye başlamaktadır. CPE'nin bağırsak hücrelerini, villusları yıkımlaması için ekstraselüler Ca^{+2} iyonlarına gereksinim vardır (McClane, 1992). CPE, ince bağırsak klauidin reseptörlerine bağlanır ve bu küçük kompleks önce 50 kDa'luk proteinle daha sonrada 70 kDa'luk proteinle birleşerek hidrofobik büyük bir kompleks oluşturur. *C. perfringens* enterotoksininin insan intestinal epitel hücrelerinin apikal membranındaki porları bu şekilde oluşturduğu bildirilmiştir (Brynstad ve Granum, 2002).

Enterotoksin ince bağırsak epitel hücrelerinin membran yüzeyindeki spesifik protein reseptörlerine bağlanarak hızla içeriye girmektedir (McDonel ve Duncan,

1977; McClane, 1992). İnce bağırsağın tümünde CPE reseptörleri bulunmaktadır. Toksin en yüksek aktivitesini ileumda, en düşük aktivitesini ise duodenumda göstermektedir (Labbe, 1989). Toksin, bağırsak epitel hücrelerinin geçirgenliğini değiştirmektedir. Bu etki sonucunda bağırsakta sıvı birikmesi ile Na^+ ve Cl^- artışı olurken, K^+ ve HCO_3^- (bikarbonat) emilimi etkilenmemektedir (McClane ve ark., 1988; McClane, 1992).

1.2.1.10. Nöraminidaz: Glikoprotein, glikolipit ve oligosakkaritlerin nöraminik aside bağlanmasıyla oluşan enzim *C. perfringens*' in tüm tipleri tarafından sentezlenebilmektedir. Etkisini bağ doku veya hücre yüzeyindeki reseptörleri yıkımlayarak göstermektedir (McDonel, 1986).

1.3. *C. perfringens*'in Gelişimini Etkileyen Faktörler

1.3.1. Sıcaklık

C. perfringens'in vejetatif formlarının gelişebildiği en düşük sıcaklık yaklaşık 12-18.5 °C, en yüksek sıcaklık ise yaklaşık 50-51.7 °C arasında değişmektedir (Brown ve Twedt,1972; Clifford ve ark.,1974). İnsanların sindirim sisteminde önemli ölçüde enterotoksin salgılanması sindirilen vejetatif formların spor formuna dönüşmesine bağlıdır. Bakterinin spor formunun oluşması için gerekli sıcaklık optimal 35-40 °C'dir (Labbe ve Duncan, 1974). Sporlanma ve toksin üretimi 46 °C'de daha kuvvetli olup toksinler genellikle 60 °C'de 10 dakikada yıkımlanmaktadır(Labbe ve Harmon, 1992; Baumgart, 1997).

1.3.2. Oksidasyon redüksiyon potansiyeli (E_h)

C. perfringens, fakültatif anaerob özelliği nedeniyle hava ile temas eden katı besi yeri yüzeyinde gelişmez. E_h değeri; ölçme tekniği, besiyeri yapısı, etkenin inokulum şekli ve metabolik durumu gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Birçok çalışmaya göre *C. perfringens*'in vejetatif formu için E_h değerinin -125 ve +350 mV

arasında deęiřtięi tespit edilmiřtir. Ayrıca etkenin E_h deęeri'nin spor oluřumu sırasında -450 mV'a dūřtūęu ve logaritmik geliřme fazından sonra -400 mV'a yūkseldięi bilinmektedir (Jay, 1992; Brynestad ve Granum., 2002; Garcia ve Heredia, 2009).

1.3.3. Su aktivitesi (a_w)

C. perfringens'in gelişebilmesi için gerekli a_w değeri 0.95 – 0.97 arasında değişmektedir. Etkenin gelişimi için gerekli a_w değeri; sıcaklık, pH ve E_h değeri gibi faktörlere bağlıdır (Erol, 2007).

1.3.4. pH

C. perfringens pH 5.0 ile 8.5 aralığında gelişebilmektedir. Optimal pH değeri ise 6.0-7.5 arasında değişmektedir. Spor formunun oluşması için gerekli pH değeri 6.0 – 8.0 arasındadır (Labbe, 1989).

1.3.5. Tuz

C. perfringens'in gelişebilmesi için ortamdaki NaCl oranının optimum % 3'den az olması gerekmektedir. Etkenin vejetatif formunun gelişimi % 5- 8'lik NaCl konsantrasyonunda baskılanırken, spor formu % 21.5 NaCl olan ortamda bile canlılığını koruyabilmektedir (Adams ve Mos, 1995).

1.3.6. *C. perfringens*'in inhibitörleri

Et ve et ürünlerindeki psikrofil mikroorganizmalar, aerob mezofil bakteriler ve enterokok gibi gıdaların normal florasında bulunan bakteriler *C. perfringens* üzerine baskılayıcı etkiye sahiptir. Ayrıca gıdalara ilave edilen sodyum nitrit (NaNO_2) gibi katkı maddeleri *C. perfringens*'in gelişimini baskılamaktadır. NaNO_2 sporların germinasyonunu da baskılar. Örneğin laboratuvar koşullarında 300 ppm NaNO_2 ilave edildiğinde *C. perfringens*'de hiçbir gelişme görölmediği saptanmıştır. Bu nedenle

kürlenmiş etlerin *C. perfringens* ile kontaminasyon riski oldukça az olmaktadır. Yine bazı bakteriler tarafından sentezlenen bakteriyosinler *C. perfringens* üzerine kuvvetli inhibitörük etki göstermektedir (Labbe, 1989; Erol, 2007).

1.4. Gıda Kaynaklı *C. perfringens* İnfeksiyonları

C. perfringens gıda yoluyla infeksiyona sebep olan önemli etkenlerden biridir. Okul, hastane, kantin, yemekhane vb. toplu yemek yenilen yerlerde özellikle kırmızı et ve kanatlı eti gibi hayvansal ürünleri içeren gıdalar *C. perfringens* yönünden büyük risk taşımaktadır (Rood, 1998).

C. perfringens 'in A tipi infeksiyonlarında inkübasyon süresi 12 saat (8-24 saat) olup, belirtiler yaklaşık 12-24 saat içerisinde ortadan kalkar. İnfeksiyonlarda en belirgin semptom kuvvetli karın krampı ve profuz diyaredir. Bulantı, kusma ve dolaşım bozukluklarına nadiren rastlanır. Ölüm dehidrasyona bağlı olarak yaşlı ve çocuklarda görülebilir. Enterotoksinler spor formundaki etkenin lize olmasından hemen önce en üst düzeyde sentezlenir. Toksinler bağırsak epitel hücrelerini etkileyerek bağırsak lumeninde proteinlerin kaybına ve glikoz transportunun baskılanmasına neden olur (Erol, 2007).

A tipi *C. perfringens* kaynaklı infeksiyonlar özetle şu şekilde ifade edilebilir (Erol, 2007).

- Gıda ile 10^7 kob/g'den fazla etkenin alınması
- Mide asidinden etkilenmeyen etkenlerin bağırsağa geçişi
- İnce bağırsaklara ulaşabilen etkenin vejetatif formdan spor formuna dönüşmesi
- Spor formdaki bakteri hücrelerinde toksin sentezlenmesi
- Sporların lize olarak toksinin serbest hale gelmesi
- Toksin etkisiyle bağırsak lumeninde sıvı birikmesi ve diyare

1.4.1. Enteritis Necroticans (Pig bel)

Gıda kaynaklı *C. perfringens* tip C infeksiyonları nadiren görülmektedir. Beslenme ve sosyal faktörler hastalığın epidemiyolojisinde önemli bir yere sahiptir. Malnutrisyon, intestinal proteaz miktarlarının azalmasına neden olarak *C. perfringens* infeksiyonlarına karşı duyarlılığı artırır. C tipi *C. perfringens* infeksiyonlarında inkübasyon süresi yaklaşık 5-6 saattir. Semptomlar abdominal kramp ve diyare ile sınırlı olmayıp, kusma ve dışkıda kan şeklinde görülür. Bu infeksiyonlarda mortalite oranı % 15-40 arasında değişmektedir (Labbe, 1989; Swartz, 1990; Rood, 1998).

Enteritis necroticans, *C. perfringens* tip C'nin salgıladığı toksin etkisiyle ileum ve jejunumda akut nekrotik yangı ve gangren oluşturmasıyla ortaya çıkmaktadır. Hastalıktan çoğunlukla Asya, Afrika, Avustralya, Yeni Zelanda, Papua Yeni Gine ve komşu adalarda protein yönünden yetersiz gıdalarla beslenen çocuklar etkilenmektedir (Gui ve ark., 2002).

Enteritis necroticansın patogenezinden sindirim sisteminde tripsin tarafından hızla inaktif olan β toksin sorumludur. Protein bakımından yetersiz beslenme, tripsin gibi pankreatik enzimlerin salınımını azaltmaktadır. Örneğin tripsin inhibitörü içeren tatlı patates ile kontamine domuz etlerinin birlikte tüketilmesinin *C. perfringens* infeksiyonlarının ortaya çıkmasında etkili olduğu bildirilmiştir(Rood, 1998).

1.5. Gıda Kaynaklı *C. perfringens* İnfeksiyonlarının Epidemiyolojisi

Gıda kaynaklı *C. perfringens* zehirlenmeleri tüm dünyada yaygın olmasına karşın insidensi tam olarak bilinmemektedir. Hastalık hafif seyrettiğinden vakaların ancak küçük bir kısmı rapor edilmektedir. Et ve ürünleri *C. perfringens* infeksiyonlarının temel kaynağı olarak değerlendirilmektedir (Jay, 1992).

ABD'de yapılan birçok epidemiyolojik çalışma gıda kaynaklı *C. perfringens* infeksiyonlarının uygun olmayan pişirme (% 65), kontamine alet ve ekipman

kullanımı (% 28), sağlıksız hammadde ile gıda hazırlanması (% 6), yetersiz personel hijyeni (% 26) ve diğer nedenlerden (% 34) kaynaklandığını göstermektedir (Bean ve Griffin, 1990).

Avustralya'nın Melborn kentinde 58 kişiden 33'ünü etkileyen ishal olgusu incelendiğinde, enfeksiyona önceden pişirilen ve uygun olmayan koşullarda muhafaza edilen etli yemekteki *C. perfringens*'in neden olduğu saptanmıştır (Veitch ve ark., 1996).

İtalya'da bir otelin lokantasında domates soslu et yemeğinden kaynaklanan gıda zehirlenmesinde 25 kişinin etkilendiği ve laboratuvar muayenesinde 13 (% 52) kişinin dışkıında *C. perfringens* izole edildiği bildirilmiştir (Archer ve ark., 1999).

1.6. *C. perfringens*'in Bulaşma Kaynakları

C. perfringens, doğada geniş bir dağılım gösteren özelliğe sahip bir bakteridir. Etken insan ve hayvan dışkısından kontamine olan su, toprak, çiğ kırmızı et, kanatlı eti ve diğer gıdalardan izole edilebilmektedir(Adams ve Moss, 1995).

1.6.1. Su ve toprak

Toprak mikroflorasının bir parçası olan *C. perfringens*, doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Antartika'da yapılan bir araştırmada toprak örneklerinin % 63'ünün bu etkeni içerdiği tespit edilmiştir. Bir başka çalışmada ise deniz tortularından izole edilen *C. perfringens*'in yakın zamanda oluşan bir kirliliği işaret ettiği rapor edilmiştir (Matches ve ark., 1974).

1.6.2. Dışkı

Yetersiz kesim hijyeni kırmızı et, kanatlı eti ve ürünlerinin *C. perfringens* ile kontamine olmasına neden olmaktadır. Özellikle kesim sırasında mide ve bağırsak içeriğinin karkas yüzeyine bulaşması büyük risk taşımaktadır (Miwa ve ark., 1997). Sığır, domuz ve tavuk bağırsak içerikleri üzerinde yapılan bir çalışma sonucunda 50 sığır örneğinin 38'inde (% 76), 50 domuz örneğinin 22'sinde (% 44), 50 tavuk örneğinin de 40'ında (% 80) *C. perfringens* izole edildiği bildirilmişlerdir. Heikinheimo ve Korkeala (2005), tavuk dışkılarından izole ettikleri 118 *C. perfringens*'in hepsinin *cpa* genine sahip olduğunu, ancak hiçbirinin diğer toksin genlerine sahip olmadığını tespit etmişlerdir. Bir diğer çalışmada 160 tavuk bağırsak içeriğinin 8'inde (% 5) *C. perfringens* izole edilmiş ve bunların 6'sının tip A olduğu tespit edilmiştir (Kalender ve Ertaş, 2005).

C. perfringens sağlıklı insan dışkısında 10^2 - 10^4 kob/g oranında bulunabilmektedir (Labbe, 1989). Japonya ve İngiltere'de yapılan çalışmalar sonucunda sağlık problemleri olmayan yaşlı insanların dışkı florasında 10^8 - 10^9 kob/g düzeyinde *C. perfringens* olabileceği saptanmıştır (Jakson ve ark., 1986).

1.6.3. Gıdalar

C. perfringens infeksiyonlarında sorumlu tutulan gıdalar çoğunlukla protein bakımından zengin çiğ veya ısıtılmış işlem görmüş kırmızı et ve kanatlı etidir. Ayrıca sucuk, sosis, güveç ve salata gibi farklı gıdalardan da izole edilebilmektedir (Shandera ve ark., 1993). Bu kapsamda özellikle pişirildikten sonra yavaş soğutulan veya uygun olmayan koşullarda muhafaza edilen et ve et ürünleri *C. perfringens* infeksiyonlarının oluşumunda büyük öneme sahiptir (Ali ve Fung, 1991).

1.6.3.1. Kanatlı eti ve ürünlerinde *C. perfringens* varlığı

Kanatlı eti ve ürünleri *C. perfringens* infeksiyonları açısından risk taşıyan gıdalar arasındadır. Hall ve Angelotti (1965), 26 tavuk etinin 15'inde (% 58), Saito (1990),

68 tavuk etinin 16'sında (% 24) *C. perfringens* izole ve identifiye etmişlerdir. Başka bir çalışmada 19 tavuk etinin 5'inden (% 26) *C. perfringens* tespit edilmiş ve PCR yöntemiyle hepsinde *cpa* geni, ancak hiçbirinde *cpe* geni bulunmadığı saptanmıştır(Lin ve Labbe, 2003).

Çakmak ve ark. (2006), yaptıkları çalışmada 40 tavuk kıyması örneğinin 28'inden (% 70) *C. perfringens* izole etmişlerdir. Fukushima ve ark (1987), 120 tavuk etinin 13'ünden (% 10.8) *C. perfringens* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Pekin'de tüketime sunulan 16 piliç karkasının 14'ünden (% 88) *C. perfringens* saptamıştır (Guang-Hua ve Xia-Ling, 1994).

Ali ve Fung. (1992), 55 hindi kıymasının 40'ından (% 73) *C. perfringens* saptadıklarını bildirmişlerdir. Erol ve ark (2008), yaptıkları bir çalışmada marketlerden alınan 180 hindi eti örneğinin 22'sinden (% 12.2) *C. perfringens* izole etmiştir. İzolatların multipleks PCR yöntemiyle yapılan moleküler tiplendirilmesi sonucu tüm izolatların *cpa* geni içerdiği ve hiç birinin *cpe* geni taşımadığı tespit edilmiştir.

Wen ve McClane (2004), 24 koyun etinin 9'undan (% 38), 147 tavuk etinin 56'sından (% 38), 68 hindi etinin 19'undan (% 28), 83 sığır etinin 17'sinden (% 21) *C. perfringens* tespit etmişlerdir. Hindi etlerinden 2'sinin, tavuk etlerinden ise 1 tanesinin *cpe* geni taşıdığı saptanmıştır. Diğer bir çalışmada, tüketime sunulan 100 hindi kıyma örneğinin 58'inden (% 58) *C. perfringens* izole edilmiş, izolatların hiçbirinde *cpe* geni bulunmadığı bildirilmiştir (Sarıgözel ve Erol, 2005).

1.6.3.2. Kırmızı et ve et ürünlerinde *C. perfringens* 'in varlığı

Kırmızı et ve ürünlerinde yapılan bir çalışmada sığır eti örneğinin 4'ünden (% 3.3) *C. perfringens* saptandığı bildirilmiştir (Fukushima ve ark., 1987). Bir diğer çalışmada 50' şer adet sığır, domuz ve kanatlı eti örneği alınarak MPN (Most Probable Number, en muhtemel sayı yöntemi) ve PCR (Polimerase Chain Reaction, polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi kullanarak *C. perfringens* varlığı tespit edilmiştir. Çalışma

sonucunda sığır eti örneklerinin 8'inden (% 16), domuz eti örneklerinin 5'inden (% 10) ve tavuk eti örneklerinin 42'sinden (% 84) *C. perfringens* ile kontamine olduğu bildirilmiştir. Ayrıca *C. perfringens* kontaminasyon düzeyinin sığır etinde $<1 \times 10^2$ - 4.3×10^2 MPN/100g, domuz eti $<10^2$ MPN/100g ve tavuk etinde $<1 \times 10^2$ - 9.3×10^3 MPN /100g olduğu saptanmıştır (Miwa ve ark., 1998).

Başka bir çalışmada marketlerden donmuş hamburger, köfte, kıyma, sosis ve kobeba ile tüketime hazır pastırma, konserve sığır eti ve luncheonun ayrı ayrı 25'er örnek alınmıştır. Pişirmeye hazır donmuş hamburger gibi gıdaların % 48.8'inde, tüketime hazır gıdalarda ise % 21.3'ünde *C. perfringens* izole edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 1.2. ve Çizelge 1.3'de gösterilmektedir (Atawa ve Ross, 2011).

Çizelge 1.2. Pişirmeye hazır et ürünlerinde *C. perfringens*'in insidensi (Atawa ve Ross, 2011).

Örnek	İncelenen Örneklerin Sayısı	Pozitif Örneklerin Sayısı	%
Hamburger	25	15	60
Köfte	25	13	52
Kıyma	25	7	2
Sosis	25	17	68
Kobeba	25	9	36
Toplam	125	61	48.8

Çizgele 1.3. Tüketime hazır et ürünleride *C. perfringens* insidensi (Atawa ve Ross, 2011).

Örnek	İncelenen Örneklerin Sayısı	Pozitif Örneklerin Sayısı	%
Pastırma	25	4	16
Konserve sığır eti	25	7	28
Luncheon	25	5	20
Toplam	75	16	21.3

Guang-Hua ve Xiao–ling (1994), yaptıkları çalışmada tüketime sunulan 31 sığır karkas örneğinin 20’sinden (% 65), 30 domuz karkas örneğinin 23’ünden (% 77) *C. perfringens* izole etmişlerdir. Aynı araştırmacılar inceledikleri 11 pişmiş sucuk örneğinin 3’ünden (% 27), 11 pişmiş jambon örneğinin 4’ünden (% 36), 10 Çin usulü kızartılmış tavuk örneğinin 2’sinde (% 20) ve 20 Çin usulü baharatlı pişirilmiş sığır eti örneğinin 1’inde (% 5) olmak üzere toplam 52 farklı et ürününün 10’undan (% 19) *C. perfringens* saptamışlardır.

Ali ve Fung (1991) 118 sığır kıymasının 64’ünden (% 54), Hoskins ve Davidson (1988), 35 sığır kıyması örneğinin 18’inden (% 51.4) *C. perfringens* tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada Arjantin’de tüketime sunulan 136 taze sucuk örneğinin 110’undan (% 80.9) *C. perfringens* izole edilmiştir (Guzman ve ark, 1990).

1.6.3.3. Diğer gıdalarda *C. perfringens* varlığı

Yürük ve ark. (1996), yaptıkları bir çalışmada 155 bitki konservesinin 20’sinden (% 13), 27 et konservesinin 10’undan (% 37) ve 25 balık konservesinin 3’ünden (% 12) *C. perfringens* izole etmiştir. Başka bir çalışmada MPN tekniği kullanılarak, marketlerden alınan çeşitli gıdalarda *C. perfringens*’in varlığı ve kontaminasyon düzeyini araştırmak amaçlanmıştır, 133 gıda örneğinin (kanatlı eti ve ürünleri, kırmızı et ve ürünleri) 40’ından (% 30) *C. perfringens* izole edilmiş ve kontaminasyon düzeyleri minimum 3 ve maksimum 292 kob/g olarak belirlenmiştir. Ayrıca PCR tekniği kullanılarak izolatların hepsinin *cpa* geni taşıdığı ve hiçbirinin *cpe* geni taşımadığı tespit edilmiştir (Labbe ve ark., 2003).

1.7. Korunma ve Kontrol

C. perfringens’in neden olduğu gıda infeksiyonlarından korunma ve kontrol için dikkat edilmesi gereken hususlar aşağıda belirtilmiştir (Labbe, 1989; Erol, 2007).

- Kırmızı et, kanatlı eti ve ürünlerinin çevresel kontaminasyonu engellemelidir.

- Gıdalar uygun şekilde pişirilmeli, sıcak gıdalar servis öncesi 60 °C'nin üzerinde tutulmalı veya hemen 10 °C'nin altında soğutulmalı, mümkünse pişirildikten sonra tamamı tüketilmelidir.
- Yeniden ısıtılacak pişmiş ve donmuş gıdalardaki vejetatif formların yok edilmesi için gıdalar iç ısıları en az 74 °C olacak şekilde (74-100 °C) hızla ısıtılmalıdır.
- Gıdaların pişirme ve soğutma işlemleri tercihen küçük porsiyonlar halinde yapılmalıdır.
- Gıdaların oda sıcaklığında tutulması ile donmuş gıdaların oda sıcaklığında çözündürülmeleri önlenmelidir.
- Pişirilmiş gıdaların çiğ gıdalar, kirli yüzey ve alet-ekipmanla çapraz kontaminasyonu önlenmelidir. Gıdaların üretimi sırasında personel hijyenine özen gösterilmelidir.

Bu çalışmada kesimhaneden alınan yenilebilir piliç iç organları (kalp- karaciğer, taşlık) örneklerinden *C. perfringens*'in kültür yöntemi ile izolasyonu ve izolatların alfa (*cpa*), beta (*cpb*), beta 2 (*cpb2*), epsilon (*etx*), iota (*iA*) ve enterotoksin (*cpe*) toksin genlerinin multipleks PCR ile saptanması amaçlanmıştır. Yapılan literatür taramalarında yenilebilir piliç iç organlarında *C. perfringens*'in moleküler tiplendirilmesinin yapıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. GEREÇ

2.1.1. Örnek

Bu çalışma kapsamında, 2011 yılının Nisan ve Temmuz ayları arasında Ankara'daki bir kanatlı kesimhanesinden alınan 45 kalp - karaciğer ve 45 taşlık olmak üzere toplam 90 örnek materyal olarak kullanılmıştır.

2.1.2. *C. perfringens*'in İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri ve Test Ayıraçları

2.1.2.1. *Perfringens* Enrichment Medium (PEM: OXOID, Thioglycollate Medium CM 0173)

Hazırlanışı

Hazır besi yerinden 29.5 gr tartılarak 1 litre distile suda çözündürüldü. Besi yerinin pH değeri (7.1 ± 0.2 , 25°C'de) uygun olacak şekilde ayarlandı. Homojen olarak çözündürülmüş besi yeri, 121°C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra 50 °C'ye kadar soğutuldu. 1000 ml hazırlanarak soğutulan PEM için steril olarak 2 ml steril distile su ile sulandırılmış vial *Perfringens* (TSC) selective supplement (OXOID: SR0088E) ilave edilerek karıştırıldı(1 litre için 2 vial *Perfringens* (TSC) selective supplement kullanılır).

2.1.2.2. *Perfringens* (TSC) Selective Supplement (OXOID;SR0088E)

Her bir vial 500 ml besi yeri için standart olarak hazırlandı: D-cycloserine 200 mg.

Hazırlanışı

Her bir viala 2 ml sterilize distile su ilave edilerek, vorteks edildikten sonra soğutulmuş PEM'e katılarak homojen bir şekilde karıştırıldı.

2.1.2.3. Tryptose Sulphite Cycloserine (TSC) agar (OXOID; CM587)

Hazırlanışı

Hazır TSC agardan 23g tartılarak 500 ml distile su içerisinde çözdürülerek pH değeri (7.6 ± 0.2) ayarlanıp sıcak su banyosunda tamamen homojen görünüme sahip olana kadar eritildi. Otoklavda 121°C 'de 10 dakika steril edildikten sonra 50°C 'ye kadar soğutuldu. *Perfringens* Supplement (TSC) (Oxioid: SR0088E) 2 ml steril distile su ile hazırlanarak, hazırlanan besi yerine katıldı. Daha sonra steril petrilere yaklaşık 12-13 ml döküldü. Agar oda sıcaklığında donana kadar bekletildikten sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

2.1.2.4. Columbia Blood Agar Base (OXOID; CM0331)

Hazırlanışı

Hazır besiyerinden 39 g alınarak 1 litre distile suda çözdürüldü. Besiyerinin pH değeri kontrol edilerek (7.3 ± 0.2 , 25°C 'de) ayarlanıp ve sıcak su banyosunda homojen olacak şekilde eritildi. Otoklavda 121°C 'de 15 dakika ısı işlemiyle steril edildikten sonra 50°C 'ye kadar soğutuldu ve üzerine 70 ml steril defibrine koyun kanı eklenerek toplam hacimde % 7'lik kan içerecek şekilde hazırlandı. Besi yeri steril petrilere dökülerek 4°C 'de muhafaza edildi.

2.1.2.5. Lactose Gelatine Medium

Bileşim	Gram/Litre (g/l)
Pepton casein (Tryptone)	15.0
Yeast extract	10.0
Lactose	10.0
Na_2HPO_4	5.0

Gelatine	120.0
Phenol red (%1'lik çözeltisi)	5 ml
Distile su	1000 ml
pH	7.5 ± 0.2

Hazırlanışı

Jelatin hariç diğer bileşenler 1 litre distile suda çözündürülerek, 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 edildi.

2.1.2.6. Motility Nitrate Medium (Fluka;14305)

Hazırlanışı

Hazır besi yerinden 23.5g tartılarak 1 litre distile suda çözündürülerek 5 ml gliserin ilave edildi. pH değeri (7.3 ± 0.1) ayarlandıktan sonra sıcak su banyosunda eritildi. Daha sonra 16×150 mm tüplere 11 ml paylaştırılarak otoklavda 121°C 'de 15 dakikada steril edildi.

2.1.2.7. Griess-Ilosvay Solüsyonu (A)

Sulfanilic acid (Merck; 1.00686.0250)	0.8 g/l
Acetic acid 5 N (Merck; 1.00366.2500)	100 ml

2.1.2.8. Griess-Ilosvay Solüsyonu (B)

α -naphthylamine (Merck; 8.22291.0100)	0.5 g/l
Acetic acid 5N (Merck; 1.00366.2500)	100 ml

Hazırlanışı

Sülfanilik asitten 0.8 g tartılarak 5N'lik 100 ml asetik asitte çözündürülerek Griess Ilosvay Solusyonu (A) hazırlandı. α -naftilaminden 0.5 g tartılarak 5N'lik 100 ml asetik asitte çözündürülerek Griess Ilosvay Solusyonu (B) hazırlandı.

2.1.2.9. Asit Fosfataz Testi

2.1.2.9.1. Fosfataz Ayıracının Bileşimi

1Naphtyl phosphate sodium salt	(Merck;8.22291.0100)	0.2 g /l
Fast blue salt B	(Merck;1.03191.0025)	4 g /l

Hazırlanışı

10 ml, 0.2 M sodyum sitrat buffer içerisinde çözündürülerek pH değeri 4.5'e ayarlandı. 1 saat 4 °C'de bırakıldı. Hazırlanan solüsyon membran filtrasyon tekniği ile steril edilerek buzdolabında 3 haftaya kadar muhafaza edildi.

2.1.2.9.2. Sodyum Sitrat Buffer Hazırlanışı

9.882 g trinatrium citrate x 2H₂O (Merck; 1.06448.0500) 20 ml NaoH'de (1 mol/ l) (Merck;1.06462.1000) çözündürüldükten sonra distile suyla 100 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 2:1 oranında 1 M HCl (Merck; 1.00314) ile karıştırıldı.

2.1.2.10. Katalaz Testi

%3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) (Merck; 1.08597.1) ile yapıldı.

Hazırlanışı

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

2.1.2.11. AnaeroGen Gaz Kitleri (Oxoid, AN0025 A)

Jarlar içinde anaerob ortam sağlayan 2.5-3.5 litrelik AnaeroGen (Oxoid AN 025A- AN 035A) ticari gaz kitleri kullanıldı.

2.1.2.12. Test Suşu

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

2.1.3. PCR İçin Kullanılan Maddeler

Taq DNA polymerase (Promega M3005, Madison, ABD)	500 U (5 U/μl)
PCR Buffer (Promega M8901)	10X
MgCl ₂ (Promega A3511)	25 mM
dNTP s (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Promega U1515)	10 mM

2.1.3.1. DNA Marker

DNA Ladder Plus (BIORON)	100 bp
--------------------------	--------

2.1.3.2. 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.

2.1.3.3. Primer Çiftleri

Primerler	Primer dizisi (5'- 3')	Büyüklik (bp)	Gen	Marka	Ülke
CPA F	GCTAATGTTACTGCCGTTGA	324	<i>cpa</i>	IDT 30040033	USA
CPA R	CCTCTGATACATCGTGTAAG			IDT 30040031	USA
CPB F	GCGAATATGCTGAATCATCTA	196	<i>cpb</i>	Alpha DNA452974	USA
CPB R	GCAGGAACATTAGTATATCTTC			Alpha DNA452975	USA
ETX F	GCGGTGATATCCATCTATTC	655	<i>etx</i>	Alpha DNA452978	USA
ETX R	CCACTTACTTGTCTACTAAC			Alpha DNA452979	USA
IA F	ACTACTCTCAGACAAGACAG	446	<i>iA</i>	Alpha DNA452980	USA
IA R	CTTTCCTTCTATTACTATACG			Alpha DNA452981	USA
CPE F	GGAGATGGTTGGATATTAGG	233	<i>cpe</i>	Alpha DNA 452992	USA
CPE R	GGACCAGCAGTTGTAGATA			Alpha DNA 452993	USA
CPB2 F	AGATTTTAAATATGATCCTAACC	567	<i>cpb2</i>	Alpha DNA452976	USA
CPB2 R	CAATACCCTTCACCAAATACTC			Alpha DNA452977	USA

2.1.3.4. TBE Solüsyonu (Tris-Borik Asit-EDTA)

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

Tris	0.89 M
Borik asit	0.89 M
EDTA	0.02 M

2.1.3.5. Ethidium Bromide (% 0.1'lik)

Ethidium Bromide (Appli Chem A 1152 GmbH, Darmstadt, Almanya)

Ethidium Bromide 10 mg/ml

Hazırlanışı

Ethidium Bromide (AppliChem A115 GmbH, Darmstadt, Almanya) stok solüsyonundan 1: 9 oranında sulandırarak 1 µg/ ml konsantrasyonda kullanıldı.

2.1.3.6. Agaroze Jel (Cambrex SeaKem LE Agaroze, Rockland, ABD)

Agaroze jel (% 1,5'lik) hazırlamak için, agardan (Cambrex SeaKem LE Agaroze, Rockland, ABD) 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 elektroforez işlemi için hazırlandı.

2.2. Yöntem

Bu çalışmada kanatlı kesimhanesinden paketlenme öncesi aşamada aseptik koşullarda alınan kalp-karaciğer ve taşlık örnekleri steril kavanozlar içerisinde soğuk zincir altında laboratuvara getirildikten hemen sonra *C. perfringens* yönünden analiz edildi. Her bir örnekten aseptik koşullarda steril plastik poşet içerisine 10 gram tartılıp 90 ml *Perfringens* Enrichment Medium (PEM) ilave edilerek homojenize edildikten sonra anaerob koşullarda (AnaeroGenTm Gaz Kitleri, OXOIDAN0025A) inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında öze yardımıyla Tryptose Cycloserine (TSC) agara çizme plak yöntemiyle ekim yapıldı ve plaklar anaerob koşullarda inkübe edildi. Her plaktan siyah renkli *C. perfringens* şüpheli kolonilerden alınarak kolonilerin identifikasyonu için TSC agara geçildi ve plaklar tekrar anaerob koşullarda inkübe edildi. Tryptose Cycloserine

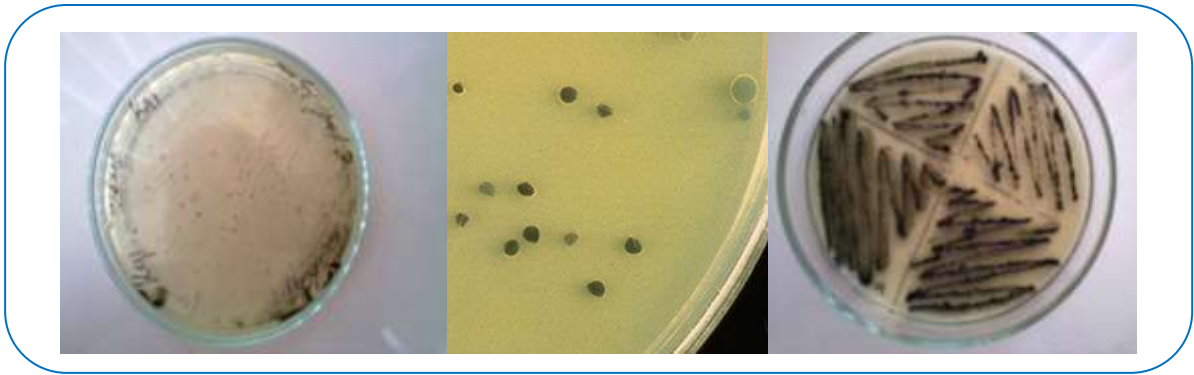
(TSC) agarada üreyen siyah renkli kolonilerden biyokimyasal testler yapıldı. Bu kapsamda Gram boyama, katalaz (% 3 H₂O₂), hareketlilik, nitrat redüksiyon, laktoz fermentasyon, jelatinaz aktivitesi, Reverse-CAMP (*S. agalactiae*), asit fosfataz testleri yapılarak identifikasyon yapıldı. Elde edilen izolatlar PCR analizi ile toksin genlerinin (*cpa*, *cpb*, *etx*, *iA*, *cpe* ve *cpb2*) tespiti için Cooked Meat Medium'da anaerob koşullarda saklandı (Labbe,1989; Schalch ve ark., 1996; Baumgart,1997).

2.2.1. *C. perfringens*'in İzolasyonu

Her bir yenilebilir piliç iç organ örneğinden aseptik koşullarda steril plastik torbalara 10 gram tartılıp 90 ml *Perfringens* Enrichment Medium (PEM) ilave edilerek homojenize edildikten sonra 46 °C'de 20 saat süre ile anaerob koşullarda (AnaeroGenTm Gaz Kitleri, OXOIDAN0025A) inkübe edildi. Zenginleştirme sonrası PEM'den, etüvden çıkartılan numunelerden öze dolusu alınarak Tryptose Cycloserine (TSC) agar (OXOID CM 587) yüzeyine çizme plak yöntemiyle ekim yapıldı ve plaklar anaerob koşullarda (AnaeroGenTm Gaz Kitleri, OXOIDAN0025A) 46°C'de 20 saat inkübe edildi (Labbe,1989; Schalch ve ark., 1996; Baumgart,1997).

2.2.2. *C. perfringens*'in İdentifikasyonu

İnkübasyon sonucunda üreyen siyah renkli *C. perfringens* şüpheli kolonilerden 3-5'i seçilerek identifikasyonu için TSC agara geçildi ve plaklar 46 °C'de 20 saat anaerob koşullarda inkübe edildi(Şekil 2.1). Bu işlem sonunda biyokimyasal testler yapılarak şüpheli kolonilerin identifikasyonu gerçekleştirildi. Test sonuçlarına göre Gram pozitif, katalaz negatif, Reverse - CAMP pozitif, laktoz fermentasyon pozitif, jelatinaz aktivitesi pozitif, hareket negatif, nitrat indirgeyen koloniler *C. perfringens* olarak değerlendirildi (Labbe,1989; Schalch ve ark., 1996; Baumgart,1997).



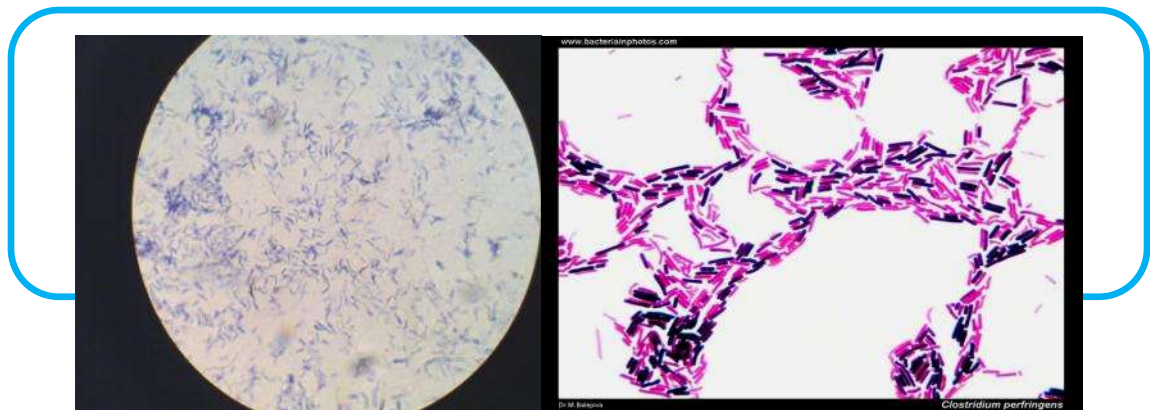
Şekil 2.1. Tryptose Cycloserine (TSC) agarda *C. perfringens* şüpheli kolonilerinin görünümü.

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

Etken	Gram boyama	Katalaz	Reverse - CAMP	Asit Fosfataz	Hareket	Nitrat indirgeme	Laktoz fermentasyon	Jelatinaz
<i>C. perfringens</i>	+	-	+	+	-	+	+	+

2.2.2.1. Gram Boyama ile Mikroskopik Bakı

Bakteriler tespit edilerek, kristal viyole, lugol çözeltisi ve sulu karbol fuksin yardımıyla boyandı. Preparatlar mikroskopun immersiyon objektifinde incelendi ve mavi - mor renk almış, çubuk, kokobasil vejetatif veya spor formundaki mikroorganizmalar Gram (+) olarak değerlendirildi (Şekil 2.2.).



2.2.2.2. Katalaz Testi

Bir lam üzerine, % 3'lük H₂O₂ solüsyonundan alınarak üzerine öze yardımı ile şüpheli *C. perfringens* kolonisinden konulup karıştırıldı ve 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, içerisinde 11'er ml Motility Nitrat Medium bulunan tüplere 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 nitrat ayırıcının (0.2ml Griess A+ 0.2ml GriessB) damlatılmasından 15 dakika sonra kırmızı veya menekşe rengin oluşumu nitratın nitrite indirgendiğini göstermektedir. Bu durumda nitrat redüksiyon pozitif, her hangi bir renk oluşmaması durumu ise nitrat redüksiyon negatif olarak değerlendirildi (Labbe,1989; Schalch ve ark., 1996; Baumgarat, 1997).

2.2.2.4. Laktoz Jelatin Testi

Şüpheli koloniler içerisinde 10'er 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 süreyle soğutuldu ve jelatinin kıvamı kontrol edildi, sıvı halde ise pozitif olarak değerlendirildi (Labbe,1989; Baumgart ve ark., 1990; Schalch ve ark., 1996; Baumgart, 1997).

2.2.2.5. Reverse –CAMP Testi

Reverse - CAMP testinde % 7 defibrine koyun kanı katılarak hazırlanan Columbia Blood Agar (Oxoid,CM 0331) ortasına, plağı iki eşit parçaya ayıracak şekilde *Streptococcus agalactiae* kültürün alınarak çizildi. Bu çizgiden 1-2 mm aralıkta ve şüpheli *C. perfringens* suşların birbirine paralel 2 cm aralık bırakılarak ve çizgiye dik

çizilerek ekim yapıldıktan sonra 37°C’de 24 saat anaerob ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda referans suşa (*Streptococcus agalactiae*) yakın yerde yarım ay şeklindeki zon (β -hemoliz zonları) gösterenler pozitif olarak değerlendirildi (Baumgart ve ark., 1990; Schalch ve ark., 1996; Baumgart,1997).

2.2.2.6. Asit fosfataz Testi

Fosfataz ayırıcından birkaç damla Reverse- CAMP Testinden hemen sonra Columbia Blood Agar (OXOID CM 331) üzerindeki seçilen kolonilere damlatıldı. Kolonilerin 3 dakika içerisinde kahverengi- mor renge dönüşmesi pozitif olarak değerlendirildi (Schalch ve ark., 1996; Baumgart, 1997).

2.2.3. *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 (Merck:1.04092.2500) eklenerek vorteks ile homojen dağılması sağlandı. Daha sonra -80°C’lik dipfriz içerisine alınarak donduruldu (Schalch ve ark., 1996).

2.2.4. *C. perfringens* İzolatlarının Multipleks PCR ile Moleküler Tiplendirilmesi

İzolatların PCR ile analizinde kullanılması amacıyla DNA ekstraksiyon işlemi yapıldı. PCR koşulları optimize edildi. İlk aşamada izolatların *cpa* geni tespit edildi. 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.

2.2.4.1. DNA Ekstraksiyonu

Bu çalışmada pozitif olarak değerlendirilen koloniler Cooked Meat Medium (Oxoid CM0081) içerisine alınarak anaerob ortamda 37 °C’de, 24-48 saat inkübe edildi. Kültürlerden 1’er ml eppendorf tüpüne alınarak 12.000 g’de 3 dakika santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5417R) edildi. Üstte kalan süpernatant sıvı atılarak tüpte kalan tortu üzerine 200 µl steril ultra saf su ilave edildi. Daha sonra örnekler su banyosunda 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 (Erol ve ark., 2008).

2.2.4.2. *C. perfringens*’in *cpa* Geni Tespiti

C. perfringens’in *cpa* geni standart PCR yöntemi ile tespit edilmiştir.

2.2.4.2.1. PCR Protokolü ve Amplifikasyonu: Standart PCR, 25 µl hacimde Master mix hazırlanarak gerçekleştirildi. MgCl₂ içermeyen 1X PCR buffer (Promega M8901, Madison, ABD), 1.5 mmol l⁻¹MgCl₂ (Promega A3511), 0.12 mmol l⁻¹ dNTP karışımı (dATP,dCTP, dGTP, dTTP) (Promega U1515), 5 Unit *Taq* DNA polimeraz (Promega M3005), 0.5 µmol l⁻¹ her bir *cpa* primerden ilave edilerek hazırlanan karışım vortekslendi. Elde edilen Master mix’den 20’şer µl alınıp Thermowell tüplere (Corning 3749, Thermowell Gold PCR Tubes, 0.8 ml, USA) konularak üzerine 5µl template DNA ilave edildi. Elde edilen toplam 25 µl hacimdeki PCR karışımı yeniden vortekslenerek üzerine buharlaşmanın önlenmesi amacıyla üzerine steril mineral yağ (Sigma M5904) ilave edildi. Daha sonra amplifikasyon işlemi için Thermal Cycler’a (Biometra Personal Cycler) konuldu. Amplifikasyon 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 olarak gerçekleştirildi. Elde edilen amplikonlar agaroz jel elektroforez yöntemiyle görüntüleme işlemine kadar 4°C’de muhafaza edildi (Meer ve Songer, 1997).

2.2.4.2.2. Agaroz Jel Elektroforez: *cpa* geninin saptanması amacıyla, her bir örneğe ait 10 µl amplikon 2 µl boya (6x Loading Dye; Fermentas R 0611) ile boyandı. 1 µl/ml (% 0.1'lik) oranında Ethidium bromide (AppliChem A 1152 GmbH, Darmstadt, Almanya) içeren % 1.5'lik agaroz jel (Cambrex SeaKem LE Agarose, Rockland, ABD) TBE solüsyonu yardımıyla elektroforez işlemi için hazırlandı. Daha sonra DNA marker, 10'ar µl hacimde ve 2 µl 6x Loading Dye ile boyanan pozitif kontrol *C. perfringens* ATCC 13124 (*cpa* geni için), negatif kontrol (Aynı miktarda steril distile su, template DNA yerine Master mix'e eklenir), örneklerle ait amplikonlar jeldeki kuyucuklara yüklenerek (Biometra - Max-System B15359) 100 voltta, 1 Amper'de (Biometra Power Pak P25) 1 saat süreyle elektroforez işlemi yapıldı. Bu işlem sonunda, pozitif kontrol ve DNA Marker yardımıyla elde edilen spesifik DNA bantları UV-görüntüleyici Transilluminator (Biometra T11 UV 9511011) ve jel görüntüleme sistemleri ile (Syngene Ingenus, Cambridge, İngiltere) belirlenerek değerlendirildi (Meer ve Songer, 1997).

2.2.4.3. Multipleks PCR ile Toksin Genlerinin Tespiti

2.2.4.3.1. Multipleks PCR Protokolü

Multiplex PCR, 50 µl hacimde Master mix hazırlanarak gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı $MgCl_2$ içermeyen 1X PCR Buffer (Promega M8901, Madison, ABD), 1.5 mmol l^{-1} (1,5 mM) $MgCl_2$ (Promega A3511), 0.12 mmol l^{-1} dNTP karışımı (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Promega U1515), 0.34 µmol l^{-1} her bir *cpe* primerden, 0.36 µmol l^{-1} her bir *cpb* primerden, 0.36 µmol l^{-1} her bir *cpb2* primerden, 0.44 µmol l^{-1} her bir *etx* primerden, 0.5 µmol l^{-1} her bir *cpa* primerden, 0.52 µmol l^{-1} her bir *iA* primerden, 5 Unit Taq DNA polimeraz (Promega M3005), hazırlanarak vortekslenen karışımdan 40'ar µl alındı ve üzerine 10 µl template DNA eklenerek karışım tekrar vortekslendi ve buharlaşmanın önlenmesi amacıyla üzerine steril mineral yağ (Sigma M5904) ilave edildi. Tüpler Thermal Cycler'a (Biometra Personal Cycler) yerleştirilmiş ve 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 gerçekleştirilmiştir. Amplikonlar 4 °C’de jel elektroforez işlemine kadar muhafaza edilmiştir (Meer ve Songer, 1997).

2.2.4.3.2. Agaroz jel Elektroforez

Her bir örneğe ait amplikondan 10 µl alınarak 2 µl 6X Loading Dye (Fermentas R 0611) ile boyanmıştır. 1 µl/ml (% 0.1’lik) oranında Ethidium bromide (AppliChem A 1152 GmbH, Darmstadt, Almanya) içeren % 1.5’lik agaroz jel (Cambrex SeaKem LE Agarose, Rockland, ABD) TBE solüsyonu yardımıyla jel elektroforez için hazırlandı. Daha sonra 10’ar µl hacimde ve 2 µl 6X Loading Dye ile *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 (*iAgeni* için) suşlarına ait amplikonlar, negatif kontrol (steril distile su), DNA marker (BIORON) ve örneklerle ait amplikonlar jeldeki kuyucuklara yüklenerek (Biometra Agagel- Max-System B15359) 100 voltta, 1Amper’de (Biometra Power Pak P25) 1 saat süreyle elektroforez işlemine tutuldu. Bu işlem sonunda, elde edilen spesifik DNA bantları UV-görüntüleyici (Biometra T11 UV 9511011) ve jel görüntüleme sistemlerinde (Syngene Ingenus, Cambridge, İngiltere) değerlendirildi (Meer ve Songer, 1997).

3. BULGULAR

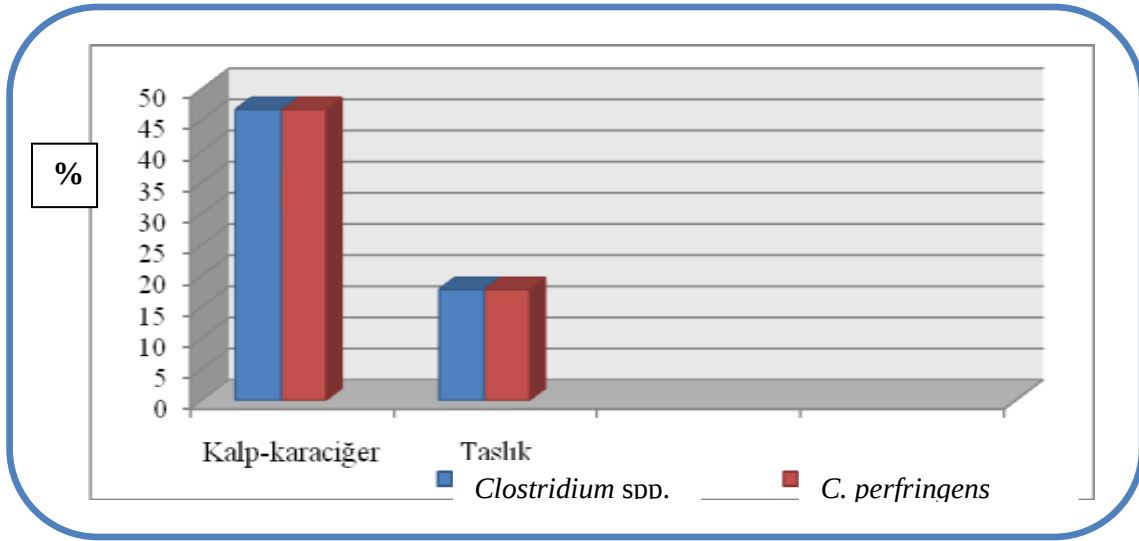
Bu çalışma kapsamında, 2011 yılı Nisan ve Temmuz ayları arasında Ankara'daki bir kanatlı kesimhanesinden alınan 45 kalp - karaciğer ve 45 taşlık olmak üzere toplam 90 örnek materyal olarak kullanılmıştır. Klasik kültür tekniği ile *C. perfringens* izole ve identifiye edilmiştir. Bu isolatlar standart PCR tekniği ile *cpa* geni yönünden incelenmiş ve doğrulama yapılmıştır. Daha sonra multipleks PCR yöntemiyle Meer ve Songer (1997) tarafından önerilen *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA*, *cpe* ve *cpb2* gen dizilimleri esas alınarak toksin genleri yönünden moleküler tiplendirme yapılmıştır.

3.1. Kültür Tekniği Sonuçları

Klasik kültür tekniği ile 45 kalp - karaciğer örneğinin 21'inde (% 46.7), 45 taşlığın 8'inde (% 17.7) olmak üzere toplam 90 yenilebilir iç organ örneğinin 29'undan (% 32.2) *C. perfringens* izole ve identifiye edilmiştir. Bu kapsamda toplam 94 koloni elde edilmiştir (Çizelge 3.1; Şekil 3.1).

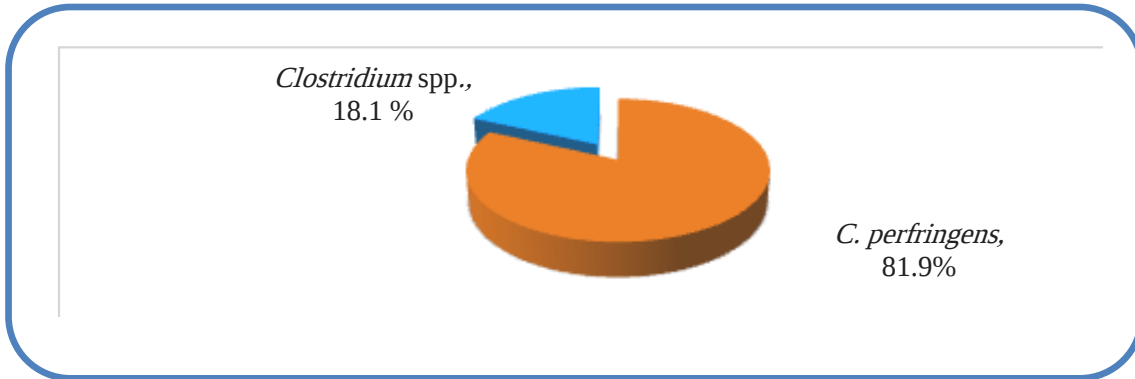
Çizelge 3.1. Piliç iç organlarında kültür tekniği ile saptanan *C. perfringens* pozitif örneklerin dağılımı.

Örnek	İncelenen Örnek Sayısı	Pozitif Örnek Sayısı	%
Kalp-Karaciğer	45	21	46.7
Taşlık	45	8	17.7
Toplam	90	29	32.2



Şekil 3.1. Piliç iç organlarında kültür tekniği ile saptanan *Clostridium* spp. ve *C. perfringens* pozitif örneklerin dağılımı.

Klasik kültür tekniğiyle izole edilen toplam 94 *Clostridium* spp. kolonisinin 77'si (% 81.9) *C. perfringens* olarak identifiye edilmiştir.



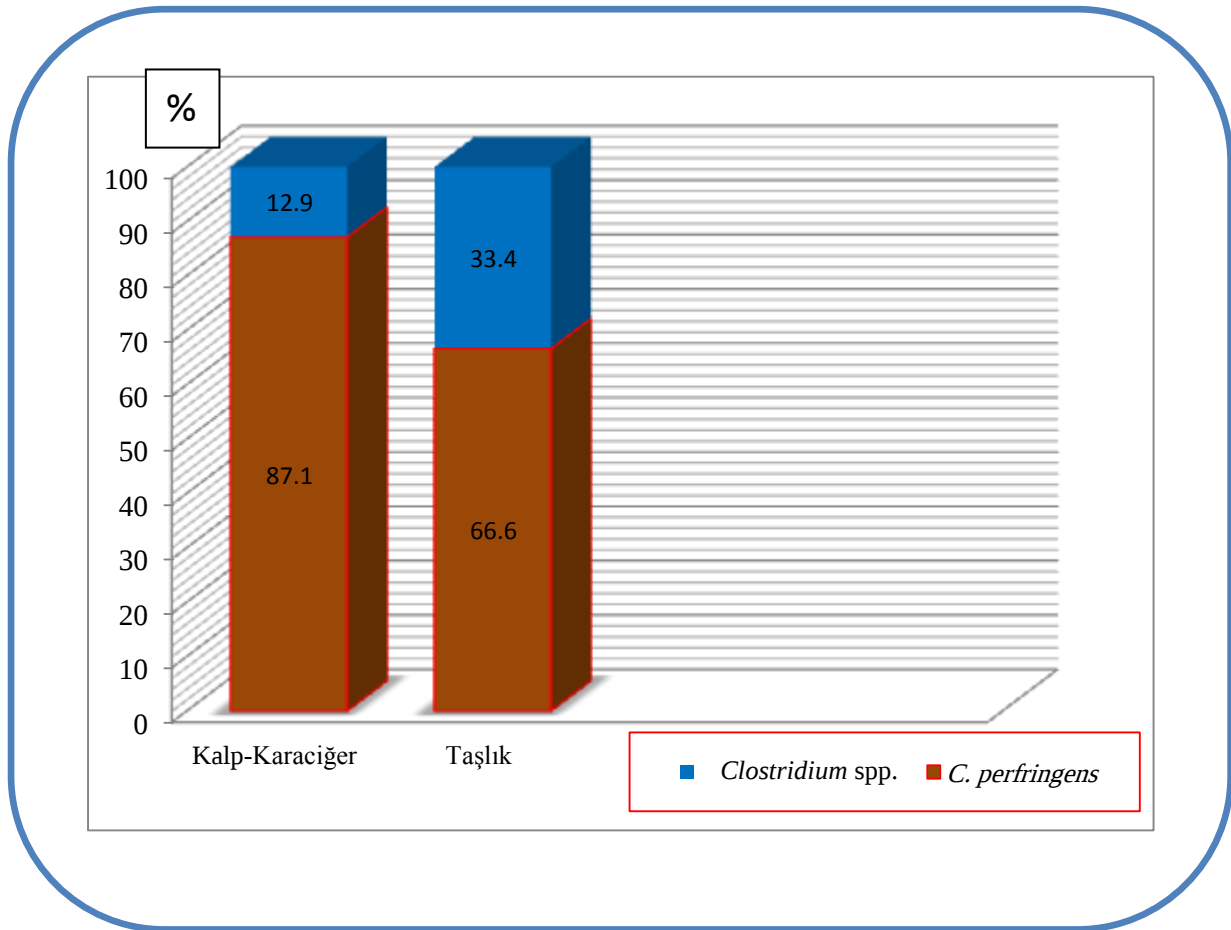
Şekil 3.2. Kültür tekniği ile saptanan *Clostridium* kolonilerinin dağılımı.

Analiz sonucunda elde edilen *Clostridium* spp. kolonilerinin örnek tipine göre dağılımı değerlendirildiğinde, kalp karaciğer örneklerine ait kolonilerin % 87.1'inin (61/70) ve taşlık örneklerine ait kolonilerin % 66.6'sının (16/24) *C. perfringens* olduğu saptanmıştır (Çizelge 3.2; Şekil 3.3).

Çizelge 3.2. Kültür tekniği ile saptanan *Clostridium* spp. kolonilerinin piliç iç organları (kalp- karaciğer ve taşlık) örneklerine göre dağılımı.

	Kalp-Karaciğer	Taşlık
<i>C. perfringens</i> / <i>Clostridium</i> spp.		
x/n	61/70	16/24
(%)	(87.1)	(66.6)

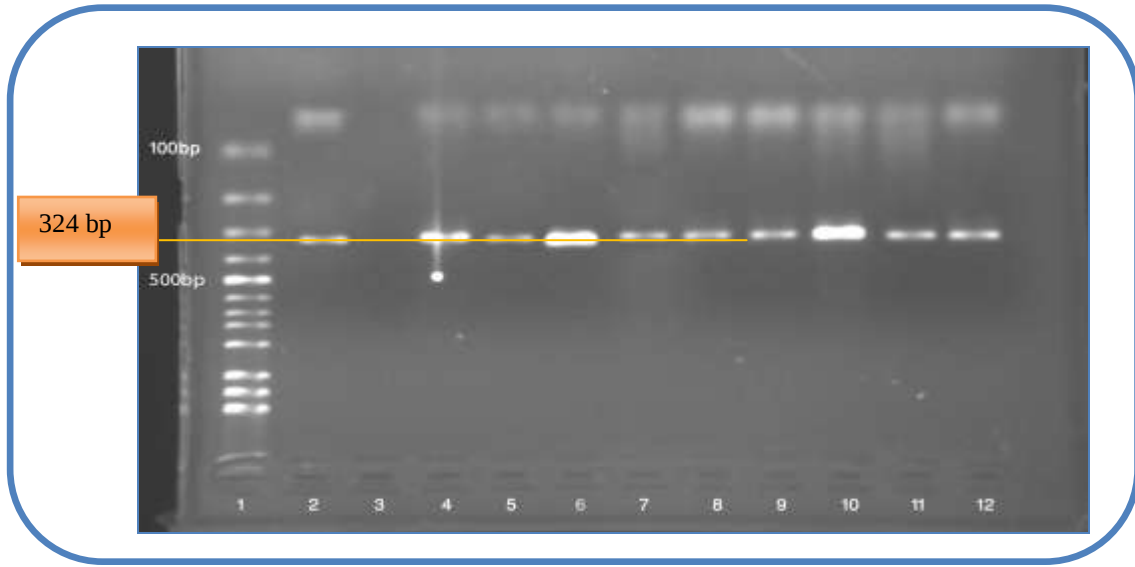
x/n (x:İzole edilen koloni sayısı; n: örnek tipine göre elde edilen toplam koloni sayısı)



Şekil 3.3. Kültür tekniği ile saptanan *Clostridium* spp. kolonilerinin piliç iç organları örneklerine göre dağılımı.

3.2. PCR Sonuçları

Klasik kültür tekniği ile *C. perfringens* olarak belirlenen izolatlar standart PCR tekniği ile *cpa* geni yönünden incelenmiş ve izolatların tamamının *cpa* geni içerdiği belirlenmiş dolayısıyla PCR ve kültür tekniği sonuçlarının % 100 uyumlu olduğu saptanmıştır. *C. perfringens* izolatlarının multipleks PCR ile yapılan moleküler tiplendirilmesi sonucunda, yalnızca taşlıktan elde edilen izolatlardan 2'sinin (% 4.4) *cpb2* genine sahip olduğu saptanmıştır. İzolatların hiçbirinin *cpb*, *etx*, *iA* ve *cpe* genlerini taşımadığı görülmüştür (Şekil 3.4 ve Şekil 3.6).

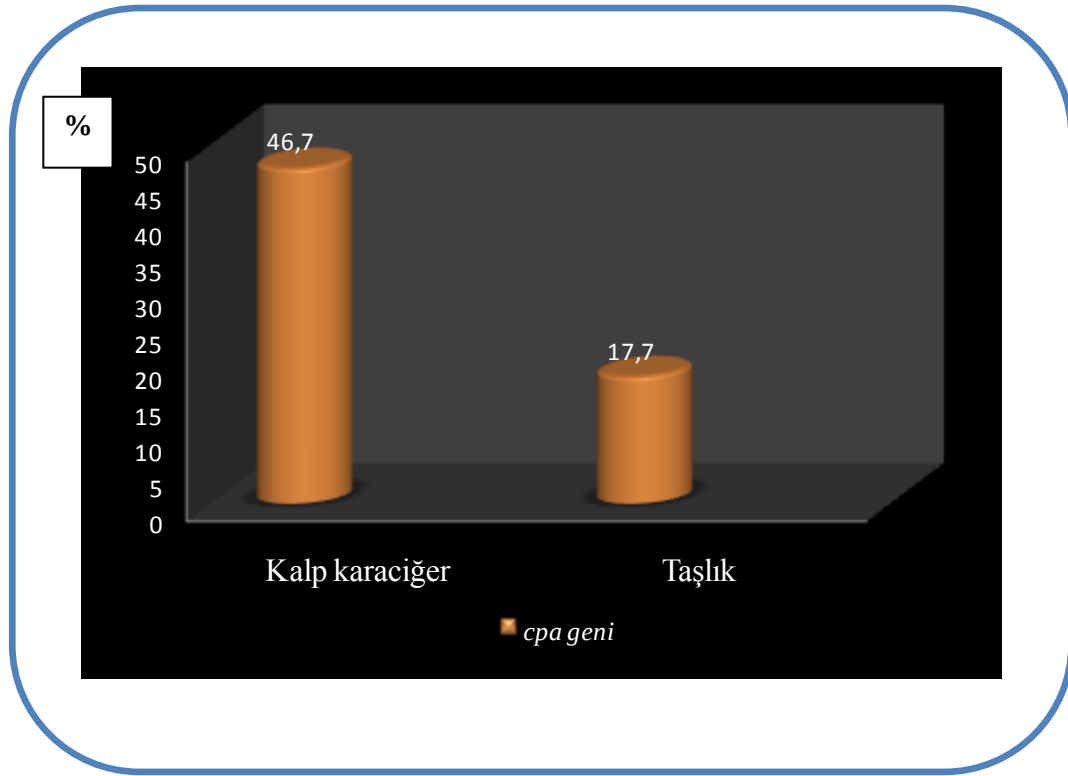


Şekil 3.4. Standart PCR ile *cpa* geni (324 bp) içeren *C. perfringens* izolatlarının görünümü (1: 100 bp DNA marker, 2: Pozitif kontrol (*C. perfringens* ATCC 13124), 3: Negatif kontrol, 4-12: *cpa* pozitif *C. perfringens* izolatları).

Çizelge 3.3. Standart PCR tekniği ile *C. perfringens* olarak izolatların örneklere göre dağılımı.

	Örnek Tipi	
	Kalp- Karaciğer	Taşlık
x/n	21/45	8/45
(%)	(46.7)	(17.7)

x/n (x: Standart PCR tekniği ile *C. perfringens* olarak doğrulanan örnek tipinin sayısı; n: Toplam örnek sayısı).

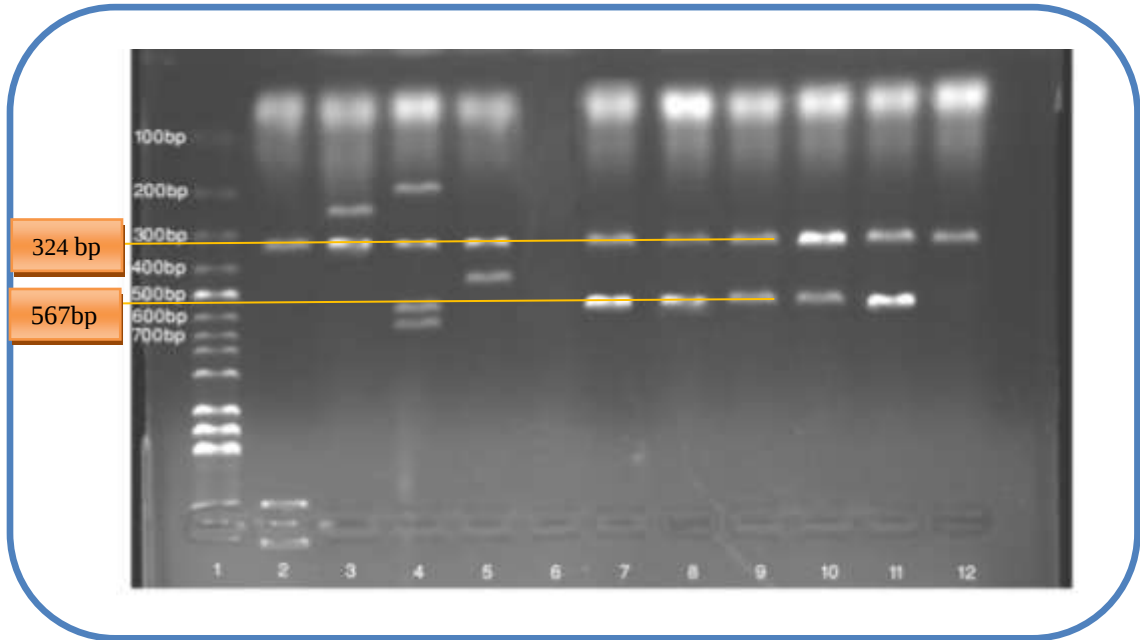


Şekil 3.5. PCR tekniği ile *C. perfringens* olarak doğrulanan örnek tipine göre dağılım.

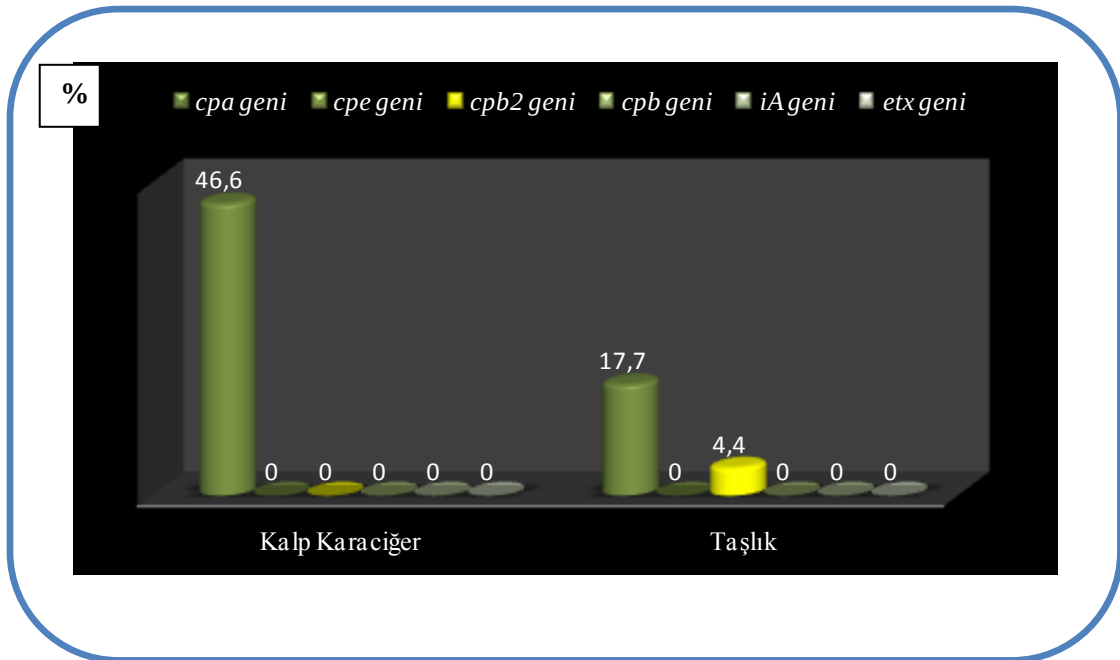
Çizelge 3.4. Multipleks PCR ile *C. perfringens*'in *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA*, *cpe* ve *cpb2* gen sekansları esas alınarak moleküler karakterizasyonu ve örnek tipine göre dağılımı.

Örnek Tipi	MULTİPLEKS PCR					
	Genler					
	<i>cpa</i>	<i>cpe</i>	<i>cpb₂</i>	<i>cpb</i>	<i>iA</i>	<i>etx</i>
Kalp- Karaciğer x/n (%)	21/45 (46.6)	-	-	-	-	-
Taşlık x/n (%)	8/45 (17.7)	-	2/45 (4.4)	-	-	-

x/n (x:Multipleks PCR tekniği ile *C. perfringens* gen sekansları olarak doğrulanan örnek tipinin sayısı; n: Toplam örnek sayısı).



Şekil 3.6. Multipleks PCR ile *cpa* (324bp), *cpb* (196 bp), *etx* (655bp), *ia* (446bp), *cpb2* (567bp), *cpe* (233bp) genlerinin görünümü. (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 (*cpa* ve *cpb2* geni).



Şekil 3.7. Multipleks PCR ile *C. perfringens*'in *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA*, *cpe* ve *cpb2* gen sekansları esas alınarak moleküler karakterizasyonu ve örnek tipine göre dağılımı.

4. TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında, 2011 yılında bir kanatlı kesimhanesinden paketlenme öncesi aşamada aseptik koşullarda toplanan yenilebilir piliç iç organların (kalp - karaciğer ve taşlık) % 32.2'sinden (29/90) *C. perfringens* izole edilmiştir. Yapılan literatür taramalarında piliç yenilebilir iç organlarında *C. perfringens*'in moleküler tiplendirilmesinin yapıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak piliç parça etlerinde, hindi ve sığır etlerinde, *C. perfringens*'in kontaminasyon düzeyine yönelik çalışmalar bulunmaktadır.

Bu çalışma bulguları ile uyumlu olarak, Craven ve ark. (2001) tavuk karkaslarının *C. perfringens* ile kontaminasyon düzeyini % 8 ila % 68 arasında değiştiğini ve ortalama % 30 olduğunu belirlemişlerdir. Benzer çalışmalarda Wen ve MacClane (2004) 68 hindi et örneğinin 19'unda (% 28), 147 tavuk karkas örneğinin 56'sında (% 38), 83 sığır etinin 17'sinde (% 21) ve sonuç olarak tüm etlerde *C. perfringens* ile kontaminasyon düzeyini % 20 - 40 olarak belirlemişlerdir. Saito (1990), 68 tavuk eti örneğinin 16'sından (% 24), Lin ve Labbe (2003) inceledikleri 19 tavuk eti örneğinin 5'inde (% 26) *C. perfringens* tespit etmişlerdir. Bu çalışmada ise 45 piliç kalp- karaciğer örneğinin 21'inde (% 46.6), 45 taşlığın 8'inde (% 17.7) ve toplam *C. perfringens* prevalansı % 32.2 olarak belirlenmiştir.

Buna karşın, Fukushima ve ark. (1987), 120 tavuk etinin 13'ünden (% 10.8), Miwa ve ark. (1998), 50 sığır eti örneğinin 8'inden (% 16), 50 domuz eti örneğinin 5'inden (% 10) *C. perfringens* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bu sonuçların tez çalışmasındaki bulgulardan düşük olması kesim aşamasında hijyenik koşulların iç organların bağırsak içeriği ile kontamine olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Miwa ve ark. (1998), yaptıkları çalışmada 50 tavuk eti örneğinin 42'sinde (% 84), Ali ve Fung (1992), 55 hindi kıyması örneğinin 40'ından (% 73), Guang-Hua ve Xia-

Ling (1994) Pekin’de tüketime sunulan 16 piliç karkasının 14’ünden (% 88) *C. perfringens* izole etmişlerdir. Bu çalışmada piliç yenilebilir iç organlarında *C. perfringens* ile kontaminasyon düzeyinin karkas ve etlere göre düşük olması, karkaslar ve etlere uygulanan parçalama işlemine bağlı olarak kontaminasyon riskinin daha fazla olmasından kaynaklanabileceğine bağlanabilir.

Kesim aşamasında yetersiz hijyenik koşullara bağlı olarak karkaslar ve iç organlar dışkı ve bağırsak içeriği ile kontamine olabilmektedir. Bu çerçevede, Miwa ve ark. (1997) sığır, domuz ve tavuk bağırsak içerikleri üzerinde yapmış oldukları çalışmada, inceledikleri 50 sığır örneğinin 38’inden (% 76), 50 domuz örneğinin 22’sinden (% 44), 50 tavuk örneğinin 40’ından (% 80) *C. perfringens* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bazı çalışmalarda piliç bağırsak içeriklerinde *C. perfringens* insidensinin % 75- 95 oranlarında bulunduğu bildirilmiştir (Miwa ve ark., 1997; Craven ve ark., 2001). Değişik araştırmacılar etlerin ve tavuk karkaslarının *C. perfringens*’le kesim sırasında bağırsak içeriğinden kontamine olabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da diğer çalışmalara benzer olarak yenilebilir iç organların kontaminasyonunda bağırsak içeriğinin önemli bir etkiye sahip olduğu değerlendirilmektedir.

Bu çalışmada da analiz edilen örnek tipine göre; piliç kalp-karaciğer örneklerinin piliç taşlık örneğine göre *C. perfringens* ile daha yüksek düzeyde kontamine olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılığın muhtemel nedeni olarak, karaciğerde *C. perfringens* varlığı açısından safra kesesinin potansiyel bir kontaminasyon kaynağı olabileceği düşünülmektedir. Nitekim bazı çalışmalarda safra kesesinden *C. perfringens*’in izole edildiği bilinmektedir (Thomas ve ark., 1990; Onderka ve ark., 1990; Immersal ve ark., 2004; Hafez, 2011). Kesimhanede iç organ çıkarma sırasında safra kesesi içeriğinin genelde karaciğeri kontamine etmesi nedeniyle karaciğerin diğer dokulardan daha fazla etken içerebileceği düşünülmektedir.

PCR tekniğinin gıdalarda mikroorganizmaların saptanmasında başarılı bir şekilde kullanıldığı ve kültür tekniği ile tespit edilen *C. perfringens* izolatlarının

doğrulanmasında etkin olarak kullanabileceği bildirilmiştir (Yoo ve ark., 1997). *C. perfringens*'in moleküler tiplendirmesi ve toksin genlerinin saptanmasına yönelik yapılan çalışmalar çoğunlukla multipleks PCR üzerine odaklanmaktadır (Lukinmaa ve ark., 2002; Engström ve ark., 2003; Wen ve MacClane, 2004).

Bu çalışma bulgularını destekler nitelikte Erol ve ark. (2008) Ankara'da yaptıkları çalışmada 180 hindi eti örneğinden izole edilen 22 *C. perfringens*'in, Heikinheimo ve Korkeala (2005), tavuk dışkılarından izole edilen 118 *C. perfringens*'in tamamının *cpa* geni içerdiğini ve hiçbirinin diğer toksin genlerine (*cpb*, *etx*, *iA*, *cpe*) sahip olmadığını ortaya koymuşlardır. Kanatlı hayvanlarda *C. perfringens* tip A'nın predominant olduğu değişik araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Engström ve ark., 2003; Meer and Songer 1997). Bu çalışmada multipleks PCR analizinde doğrulanan tüm izolatların *cpa* geni taşıdığı ve *cpb*, *etx*, *iA*, *cpe* toxin genlerine sahip olmadığı belirlenmiş olup konuyla ilgili çalışma sonuçlarıyla uyum sağlamaktadır.

Bu çalışmadaki bulgular ile benzer olarak Svobondova ve ark. (2007), tavuk bağırsak örnekleri üzerinde yaptıkları çalışmada 609 örneğin 112'sinden (% 18.39) *C. perfringens* izole etmişlerdir. *C. perfringens* izolatlarının multipleks PCR kullanılarak yapılan moleküler tiplendirilmesi sonucu tüm izolatların *cpa* geni içerdiği, izolatların hiçbirinin *cpe* genini içermediği ve 4'ünün *cpb2* geni taşıdığı tespit etmişlerdir. Engström ve ark. (2003), yaptıkları bir araştırmada tavuk bağırsaklarından elde edilen 53 *C. perfringens* izolatının, multipleks PCR kullanılarak yapılan moleküler tiplendirilmesi sonucunda tüm izolatların *cpa* geni ve izolatların 2'sinin *cpb2* geni içerdiğini belirlemiştir. Gholamiandehkordi ve ark. (2006), sağlıklı broyler bağırsağı örneklerinden elde edilen 27 izolatın 4'ünde *cpb2* ve 2'sinde *cpe* geni tespit etmişlerdir. Bu çalışmada 45 taşlık örneğinin 8'inden (%17.7) *C. perfringens* izole edilmiş olup Multipleks PCR analiz sonucu tüm izolatların *cpa* geni içerdiği, izolatların hiçbirinin *cpe* geni içermediği ve 2'sinin *cpb2* geni taşıdığı belirlenmiştir.

Wen ve McClane (2004), bir çalışmada 887 farklı gıda (tavuk eti, hindi eti, sığır eti, kuzu eti ve sosis) örneğinden 278 (%31.3) *C. perfringens* izolatının % 80' ini tip A olarak belirlemişlerdir. Tip A ile kontamine olan gıdaların yaklaşık % 20'sinin *cpb2* geni taşıdığı ve multipleks PCR kullanarak izolatların % 4.3'ünün *cpe* geni taşıdığı bildirilmiştir. Bir başka çalışmada Engström ve ark. (2003), 53 *C. perfringens* izolatının, multipleks PCR kullanılarak yapılan moleküler tiplendirilmesinde tüm izolatların *cpa* geni taşıdığını, izolatların 2'sinin $\beta 2$ - geni içerdiğini ve hiçbirinde izolatların *cpe* geni bulunmadığını belirlemiştir. Meer ve Songer. (1996), yaptıkları çalışmalar sonucunda *C. perfringens* izolatının çoğunlukla tip A ve izolatların % 0-5 arasında *cpe* gen taşıdığını belirlemişlerdir. Johansson ve ark. (2006), yaptıkları çalışmalarda *cpb2* geninin gıda infeksiyon vakalarında % 20 ve kanatlılarda % 10 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışma sonuçlarına göre kanatlılarda *C. perfringens* tip A en sık rastlanan tip ve örneklerin moleküler tiplendirme sonucu izolatların hepsinin *cpa* geni ve 2 izolatın *cpb2* geni taşıdığı saptanmıştır. İzolatların toksin yönünden yapılan moleküler tiplendirmesinde *cpb*, *cpe*, *ia*, *etx* genleri yönünden negatif olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar, yukarıdaki araştırma sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, kanatlı eti ve ürünlerinden elde edilen *C. perfringens* izolatlarının % 10 oranında *cpb2* ve % 0-5 arasında *cpe* gen taşıdığını doğrular nitelikte ve uyumlu olduğu görülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mezbahada kesimden hemen sonra alınan 90 piliç iç organ örneğinin 29'undan (% 32.2) kültür tekniği ile *C. perfringens* izole edilmiş ve izolatlar PCR ile doğrulanmıştır. Tüm izolatların *cpa* geni içerdiği ve yalnızca 2 taşlık izolatının (% 4.4) *cpb2* genine sahip olduğu, diğer izolatların hiçbirinin *cpb*, *etx*, *iA*, *cpe* genlerini taşımadığı saptanmıştır.

Kesim aşamasında, hijyenik koşulların yetersizliğine bağlı olarak karkas ve yenilebilir iç organların bağırsak içeriğindeki patojen bakteriler ile kontamine olması potansiyel sağlık riski oluşturabilmektedir.

Gıda güvenliğinin sağlanması ve halk sağlığının korunması amacıyla, piliç iç organ üretiminde uygun hijyenik ve teknolojik koşullar sağlanmalıdır. Bu kapsamda personel eğitimi ve tüketici bilinçlendirilmesi önemlidir.

ÖZET

Yenilebilir Piliç İç Organlarında *Clostridium perfringens*'in Saptanması ve Moleküler Tiplendirilmesi

Bu çalışmada, yenilebilir piliç iç organlarından *Clostridium perfringens* izolasyonu ve moleküler tiplendirmesi amaçlanmıştır. Ankara'daki bir kanatlı kesimhanesinden alınan 45 kalp-karaciğer ve 45 taşlık olmak üzere toplam 90 örnek materyal olarak kullanılmıştır. Numuneler laboratuvara soğuk zincir altında getirilip, aynı gün içinde teste alınmıştır.

Kültür tekniği ile numunelerden *C. perfringens* izole edilmiş ve standart PCR (*cpa*) ve multipleks PCR (*cpa*, *etx*, *iA*, *cpe* ve *cpb2* genler) kullanarak moleküler karakterizasyon yapılmıştır. *C. perfringens* test edilen 21 kalp-karaciğer (% 46.7) ve 8 taşlık (% 17.7) örneklerinden izole edilmiştir. Toplam 29 izolatin (% 32.2) *cpa* geni içerdiği belirlenmiş ve sadece 2 taşlık izolatinin (% 4.4) *cpb2* genine sahip olduğu, diğer izolatların hiçbirinin *cpb*, *etx*, *iA*, *cpe* genlerini taşımadığı saptanmıştır.

Elde edilen bulgular sonucunda piliç yenilebilir iç organ örneklerinin önemli bir bölümünün *C. perfringens* ile kontamine olduğu tespit edilmiştir. Piliç ürünleri ve iç organların güvenli üretiminin sağlanması için, uygun hijyenik ve teknolojik koşullar sağlanmalıdır.

Anahtar Sözcükler: *Clostridium perfringens*, moleküler tiplendirme, multipleks PCR, yenilebilir piliç iç organ.

SUMMARY

Molecular typing of *Clostridium perfringens* isolated from edible offals of chicken by multiplex PCR

The study was aimed for the isolation and molecular typing of *Clostridium perfringens* of chicken edible offals. A total of 90 samples consisting 45 heart-liver and 45 gizzard were collected from a slaughterhouse in Ankara. The samples were brought under cold condition to the laboratory and tested for the same day.

For the isolation of *Clostridium perfringens* from the samples culture technique was used, whereas for molecular typing of the isolates standard (*cpa*) and multiplex (*cpa*, *etx*, *iA*, *cpe* and *cpb2* genes) PCR assay was used. *C. perfringens* was isolated from 21 heart-liver (46.7 %) and 8 gizzard (17.7 %) samples tested. All of the *C. perfringens* isolates 29 (32.2 %) were found positive for *cpa* gene and only 2 gizzard isolates (4.4 %) were positive for *cpb2*, gene but *cpb*, *etx*, *iA* or *cpe* genes were detected in any of the isolates.

In conclusion, a significant part of the chicken edible offal samples tested in this study was found positive for *C. perfringens*. Suitable hygienic and technical conditions should be taken for the safety of the chicken products and edible offals .

Key words: *Clostridium perfringens*, chicken edible offals, molecular typing, multiplex PCR.

KAYNAKLAR

- ADAMS, M.R., MOSS, M.O. (1995). *Bacterial agents of foodborne illness*. In: Food Microbiology. Cambridge: The Royal of Chemistry. **p.:**177-181.
- ALI , M.S., FUNG, D.Y.C. (1991). Occurence of *Clostridium perfringens* in ground beef and ground turkey evaluated by three methods. *J. Food Safety*.**11(3):** 197-203.
- ANON (2004). CDC. Food Marketing Institute conducts programs in research, education, industry in the United States and around the world. Erişen adres (<http://www.cdc.gov/foodnet>). Erişim tarihi: 09.02.2012.
- ANON (2011). CDC. Food Estimates of Foodborne Illness in the United States. Erişen adres (<http://www.cdc.gov/foodborneburden/> 2011-foodborne-estimates.html hospitalizationes). Erişim tarihi: 22.03.2012.
- ARCHER, D.L., KVENBERG, J.E. (1985). Incidence and costs of foodborne diarrheal disease in United States. *J. Food Prot.* **48:**887-894.
- ATAWA, I.E., EL-ROOS, A.A. (2011). Incidence of *Clostridium perfringens* in meat products at som egyptian governorates. *In. J.Microbiol.* **2(3):** 196-203.
- BAUMGART, J. (1997). *Microbiologysche Untersuchung von Lebensmitteln*. Behr's Verlag. Hamburg. **p.:**271-284.
- BAUMGART, J., BAUM, O., LIPPERT, S. (1990). Schneller und direkter nachwies von *Clostridium perfringens*. *Fleischwirtsch.* **70(9):** 1010-1014.
- BEAN, N.H., GRIFFIN, P.M. (1990). Foodborne disease outbreaks in United States. 1973-1987. Pathogens, vehicles and trends. *J. Food Prot.* **53(9):** 804- 817.
- BROWN, D.F., TWEDT, R.M.(1972). Assessment of the sanitary effectiveness of holding temperatures on beef cooked at low temperature. *Appl.Microbiol.* **24:** 599-603.
- BRYNESTAD, S., GRANUM, P. E. (2002). *Clostridium perfringens* and foodborne infections. *Int J Food Microbiol.* **74:** 195-202.
- CAVALCANTI, M.T.H., PORTO, T., PORTO, A.L.F., BRANDI, I.V., FILHO, J.D.L., JUNIOR, A. P. (2004). Large scale purification of *Clostridium perfringens* toxins: a review. *B. J. P. S-Vol.40, N.2* **p.:**152-164.

- CLIFFORD, W.J., ANELIS, A., ROSS, E.W. (1974). Evaluation of media, time and temperature of incubation and method of enumeration of several strains of *Clostridium perfringens* spores. *Appl. Microbiol.* **41**: 1184-1191.
- COOPER, K.K., SONGER, J.G. (2009). Necrotic Enteritis in chickens: A paradigm of enteric by *Clostridium perfringens* type A. *Anaerobe*. **15**: 55-60.
- CRAVEN, S.E. (2001). Occurrence of *Clostridium perfringens* in the broiler chicken processing plant as determined by recovery in iron Milk Medium. *J. Food Prot.* Vol. 64 (12). **pp.**: 1956-1960.
- CRAVEN, S.E., STERN, N.J., BAILEY, J.S. & COX, N.A. (2001). Incidence of *Clostridium perfringens* in broiler chickens and their environment during production and processing. *Avian Diseases*. **45** : 887-896.
- 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.
- DUNCAN, C.L., STRONG, D.H. (1969). Ileal loop fluid accumulation and production of diarrhea in rabbits by cell-free products of *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* **110 (19)**: 378-391.
- ENGSTROM, B. E., FERMER, C., LINDBERG, A., SAARINEN, E., BAVERUD, V., GUNNARSSON, A. (2003). Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. *Vet Microbiol.* **94**: 225-235.
- EROL, I. (2007). *Clostridium perfringens* . Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi, Pozitif Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara. **p.**: 154-162 .
- EROL, I., GONCUOGLU, M., AYAZ, N. D., BİLİR ORMANCI, F. S., HILDEBRANDT, G. (2008). Molecular typing of *Clostridium perfringens* isolated from turkey meat by multiplex PCR. *Lett Appl Microbiol.* **47**: 31–34.
- FAO (2003). Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Trade Reforms and Food Security*. Rome, **S**:25.
- FICKEN, M.D., WAGES, D. P. (1997). Necrotic enteritis. *In Diseases of Poultry*, 10th ed. Calnek, B.W. **pp.** : 261– 264.
- FREEMAN, B. A. (1979). *Burrows Textbook of Microbiology*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, USA.
- FUKUSHIMA, H., HOSHINA, K., NAKAMURA, R., ITO, Y. (1987). Raw beef, pork and chicken contaminated with *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp.

- Yersinia enterocolitica* and *Clostridium perfringens* comparative study. *Z.B.L. Bact.Hyg.B.* **184**: 60-70.
- GARCIA, S., HEREDIA, N. (2009). *Clostridium perfringens*: A dynamic foodborne pathogen. *Food Bioprocess. Technol.* **4**:624–630.
- GHOLAMIANDEKHORDI, A.R., DUCATELLE, R., HEYNDRICKX, M., HAESEBROUCK, F., AND VAN IMMERSEEL, F. (2006). Molecular and phenotypical characterization of *Clostridium perfringens* isolates from poultry flocks with different disease status. *Vet . Microbiol.* **113**: 143-152.
- GROSS, T.P., KAMARA, L.B., HATHEWAY, C.L., POWERS, P., LIBONATI, J.P., HARMON, S.M., ISRAEL, E. (1989). *Clostridium perfringens* food poisoning: Use of serotyping in an outbreak setting . *J. Clin. Microbiol.* **27(4)**:660-663.
- GUANG-HUA, W., XIAO-LING, Q. (1994). Fleisch und fleischprodukte aus dem einzelhandel in Beijing. Vorkommen von *Cl. perfringens*, *S.aureus*, *Salmonellen* und *L.monocytogenes*. *Fleischwirtsch.* **74 (3)**: 326-328.
- GUI, L., SUBRAMONY, C., FRATKIN, J., HUGHSON, M.D. (2002). Fatal enteritis necroticans (Pigbel) in a diabetic adult. *Mod.Pathol.* **15**: 66- 70.
- GUZMAN, A.M.S., MICALIZZI, B., PAGANO, C.E.T., GIMENEZ, D.F. (1990). Incidence of *Clostridium perfringens* in fresh sausages in Argentina. *J. Food Port.*, **52(3)**: 173-175.
- HAFEZ, H.M. (2011). Enteric diseases of poultry with special attention to *Clostridium perfringens*. *Pak. Vet. J.* **31(3)**:175-184.
- HALL, H.E., ANGELOTTI, R. (1965). *Clostridium perfringens* in meat and meat products. *Appl. Microbiol.* **13**: 352- 357.
- HATHEWAY, C. L. (1990). Toxigenic Clostridia. *Clinical Microbiology Reviews* **3**:66-98.
- HEIKINHEIMO, A. (2008). Diagnostics and molecular epidemiology of cpe-positive *Clostridium perfringens* type A . PhD Thesis. Department of Food and Environmental Hygiene, University of Helsinki, Finland.
- HEIKINHEIMO, A., KORKEALA, H. (2005). Multiplex PCR assay for toxinotyping *Clostridium perfringens* isolates obtained from Finnish broiler chickens. *Lett. Appl . Microbiol.* **40**: 407– 411.

- HEREDIA, N.L., LABBE, R.G. (2001). *Clostridium perfringens*. In *Guide to Foodborne Pathogens* ed. Labbe, R.G. and Garcia J.S. (Eds). NewYork, USA: John Wiley&Sons. **pp.** 133-142.
- HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T., WILLIAMS, S.T. (1994). Genus *Clostridium*. In: Bergeys Manual of determinative Bacteriology, 9th ed. The Williams-Wilkins Co., Baltimore. **P.:** 15,560-563.
- HOSKINS, C.B., DAVIDSON, P.M. (1988). Recovery of *Clostridium perfringens* from food samples using an oxygen-reducing membrane fraction. *J. Food Prot.* **51(3)**:187-191.
- IMMERSEEL, F.V., DE BUCK, J., PASMANS, F., HUYGHEBAERT, G., HAESEBROUCK, F., DUCATELLE R. (2004). *Clostridium perfringens* in poultry : An emerging threat for animal and public health. *Avian pathol.***33(6)**:537-549.
- JAKSON, S.G., YIP-CHUCK, L., PARILLA, C., MOTA, L. (1986). Diagnostic importance of *Clostridium perfringens* enterotoxin analysis in recurring enteritis among elderly chronic care psychiatric patients. *J. Clin. Microbiol.* **23**:748- 751.
- JAY, J.M. (1992). Food poisoning caused by Gram-positive spore forming bacteria. In: *Mod. Food Microbiol.* USA: AVI Book. **p.:** 479-487.
- JOHANSSON, A., ASPAN, A., BAGGE, E., BAVERUD, V., ENGSTROM, B. E. AND JOHANSSON, K. E. (2006). Genetic diversity of *Clostridium perfringens* type A isolates from animals, food poitero toxigenic *Clostridium perfringens* strains by classical soning outbreaks and sludge. *BMC Microbiol.* **6**: 47.
- JOHANSSON, A., GREKO, C., ENGSTROM, B.E., KARLSSON, M. (2004). Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of *Clostridium perfringens* from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes. *Vet. Microbiol.* **99**: 251-257.
- KALENDER, H., ERTAS, H. B. (2005). Isolation of *Clostridium perfringens* from chickens and detection of the alpha toxingene by polymerase chain reaction (PCR). *Turk J Vet Anim Sci.* **29**: 847–851.
- KOTULA, K.L., PANDYA, Y. (1995). Bacterial contamination of broiler chicken before scalding. *J. Food Prot.* **58**: 1326-1329.
- LABBE, R.G. (1989). *Clostridium perfringens*. In: *Foodborne Bacterial Pathogens*, Ed.: M: P: Doyle, New York and Basel Marcel Decker INC. **p.:** 191-227.

- LABBE, R.G. (2000). *Clostridium perfringens*. In: Compendium of methods for the Microbiological Examination of Food. Ed.: C.Vanderzant, D.F. Splittstoesser. American Public Helth Association. **p.:**623-632.
- LABBE, R.G., DUNCAN, C.L. (1974). Sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* type A under conditions of controlled pH and temperature. *Can. J. Microbiol.***20**: 1493-1501.
- LABBE, R.G., HARMON, S.M. (1992). *Clostridium perfringens*. In. Compendium of Metods for the Microbiological Eximination of Foods. Ed.: C.Vanderzant, D.F. Splittstoesser. *American Public Health Associations*. **P.:**623-632.
- LABBE, R.L., TONG, Y.L. (2003). Enterotoxigenicity and Genetic Relatedness of *Clostridium perfringens* Isolation from Retail Foods in the United States. *En.l Microbiol.* **p.:** 1642-1646.
- LILLARD, H.S. (1973). Contamination of blood sydtem and edible parts of poultry with *Clostridium perfringens* during water scalding. *J. Food Sci.* **38**:151-155.
- 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.
- LUKINMAA, S., TAKKUNEN, E., SITONEN, A. (2002). Molecular epidemiology of *Clostridium perfringens* related to food-borne outbreaks of disease in Finland 1984–1999. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3744–3749.
- MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M. (2006). Brock Biology of Microorganisms, Prentice Hall International Inc. 11th; New Jersy, USA.P: 923-938.
- MATCHES, J.R., LISTON, J., CURRAN, D. (1974). *Clostridium perfringens* in environment. *Appl. Microbiol.***28**: 655-660.
- McCLANE, B.A. (2007). *Clostridium perfringens*. In M. Doyle, L. Beuchat (Eds.), *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers (Third edition)* Washington, DC.USA: American Society for microbiology. **pp.:** 385- 406.
- McCLANE, B.A. (1992). *Clostridium perfringens* enterotoxin : Structure, action and detection. *J. Food Safety.* **12**: 237-252.
- McCLANE, B.A. (1994). *Clostridium perfringens* enterotoxin acts by producing small molecule permeability alterations in plasma membranes. *Toxicology.* **87**:43-67.

- McCLANE, B.A. (2000). *Clostridium perfringens* enterotoxin and intestinal tight junctions. *Trends Microbiol.* **8**: 145-146.
- McCLANE, B.A., HANNA, P.C. (1988). *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Microb Pathogen.* **4**: 317-323.
- McDONEL, J.L. (1986). Toksin of *Clostridium perfringens* types A, B, C, D and E. In: Pharmacology of Bacterial Toxins. Ed.: F. Dorner, J. Drews. Oxford: Pergamon Press. **p.**: 477-517.
- McDONEL, J.L., DUNCAN, C.L. (1977). Regional localization of activity of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in the rabbit ileum, jejunum and duodenum. *J. Infect. Dis.* **136**: 661-666.
- MEAD, P. S., SLUTSKER, L., DIETZ, V., McCAIG, L.F. , BRESEE, J. S., SHAPIRO, C. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis.* **5**:607-25.
- MEAD, G.C. (1994). Microbiological hazards from meat and their control. *B.F.J.* **96(8)**: 33-36.
- MEER, D.R., SONGER, J.G. (1997). Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *Am. J. Vet. Res.* **58**: 702-705.
- MIKI, Y., MIYAMOTO, K., HIYARONO, I.K., FUJIUCHI, K., AKIMOTO, S. (2008). Prevalance and Characterization of Enterotoksin Gene-Carrying *Clostridium perfringens* Isolates from Retail Meat Products in Japan. *Environ Microbiol.* **p.**: 5366-5372.
- MIMS, C.A., PLAYFAIR, J.H.L., ROITT, IM., WAKELIN, D., WILLIAMS, R., ANDERSON, R.M. (1993). Gastrointestinal tract infections. In: Medical Microbiology Mosby, London. **P.**: 11-15.
- MIWA, N., NISHINA, T., KUBO, S., ATSUMI, M., HONDA, H. (1998). Amount of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meat detected by nested PCR. *Int. J. Food Microbiol.* **42(3)**: 195-200.
- MIWA, N., NISHINA, T., KUBO, S., ATSUMI, M., HONDA, H. (1997). Most Probable Numbers of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in intestinal contents of cattle, pig and chicken. *J. Vet. Med.Sci.* **59 (7)**:557-560.
- MIYAMOTO, O., SUMITANI, K., NAKAMURA, T., YAMAGAMI, S-I., MIYATA, S., ITANO, T., NEGI, T., OKABE, A. (2000). *Clostridium perfringens* epsilon toxin causes excessive release of glutamate in mouse hippocampus. *FEMS Microbiol. Lett.* **V. 189**:109-113.
- MURRELL, T.G.C., EGERTON, J.R., RAMPLING, A., SAMELS, J., WALKER, P.D. (1969). The ecology and epidemiology of the pig-bel syndrome in man in New Guinea. *J.Hyg.* **64**: 375-396.

- ONDERKA, D. K., CC, LANGEVIN., J. A., HANSON. (1990). Fibrosing cholehepatitis in broiler chickens induced by bile duct ligations or inoculation of *Clostridium perfringens*. *Can. J. Vet. Res.* **54**: 285- 290.
- RILEY, A., KANG, D.H., FUNG, D.Y.C. (1999). Comparison of five anaerobic incubation metods for enumeration of *Clostridium perfringens* from foods. *J. FoodProt.* **62 (9)**:1041-1044.
- ROOD, J.I. (1998). Virulence genes of *Clostridium perfringens*. *Annu. Rev.Microbiol.* **52**: 533-560.
- ROOD, J.I., COLE, S.T. (1991). Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Rev.* **55 (4)**: 621- 648.
- SAITO, M. (1990). Production of enterotoxin by *Clostridium perfringens* derived from humans, animals, foods and the natural environment in Japan. *J.Food Prot.* **53(2)**:115-118.
- SAMBROOC, J., RUSSELL, D.W. (2001). Molecular Cloning A laboratory Manual. Third edition. *CSHL Press, New York.* **8**:1- 24.
- SARIGUZEL, D., EROL, I. (2005). Occurrence of *Clostridium perfringens* in ground turkey and investigation of the isolates for the presence of *cpe* by PCR. In: *Proceedings of 14th World Veterinary Poultry Congress*.**pp.** F14-605 (502).
- SCHACH, B., EISGRUBER, H., GEPPERT, P., STOLLE, A. (1996). Vergleich von vier routinieverfahren zur bestaetigung von *Clostridium perfringens*. *Appl.Microbiol.* **21**:500-506.
- SHANDERA, W.X., TACKET, C.D., BLAKE, P.A. (1983). Food posioning due to *Clostridium perfringens* in the United States. *J. Infect. Dis.* **147**: 167-1170.
- SMITH, W.P., McDONEL, J.R. (1980). *Clostridium perfringens* type A: Invitro system for sporulation and enterotoxin synthesis. *J.Bacteriol.***144**:306-311.
- SONGER, J. G. (1996). *Clostridial* enteric diseases of domestic animals. *Clin Microbiol Rev.* **9**: 216–234.
- STEVENS, D.L., MITTEN, J., HENRY, C. (1987). Effects of α and θ toxins from *Clostridium perfringens* on human polymorphonuclear leokocytes. *J.Infect. Dis.***156**: 324-333.
- SVOBODOVA, I., STEINHAUSEROVA, I., NEBOLA, M. (2007). Incidence of *Clostridium perfringens* in broiler chickens in the Czech Republic. *Acta. Vet. Brno.***76**: 25- 30.
- SWARTZ, M.N. (1990). Anaerobic spore forming bacilli: the Clostridia. In: *Microbiology . J. B. Lippincoatt Co., Philadelphia.* **p.:** 633-635.
- THOMAS, W.S. HUTCHISON, RIDDELL, C. (1990). A study of hepatic lesions in broiler chickens at processing plants in Saskatchewan. *Can. Vet. J.***Vol: 31(1)**: 20–25.

- TRAKULCHANG, S.P., KRAFT, A.A. (1977). Survival of *Clostridium perfringens* in refrigerated and frozen meat and poultry items. *J. Food Sci.* **42**: 518-521.
- TSCHIRDEWAHN, B., NOTERMANS, S., WERNARS, K., UNTERMANN, F. (1991). The presence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains in faeces of various animals. *Int. J. Food Microbiol.* **14**: 175-178.
- TWETEN, R.K. (1988). Nucleotide sequence of the gene for the perfringolysin θ (theta toxin) from *Clostridium perfringens* significant homology with the genes for streptolysin θ and pneumolysin. *Infect Immun.* **56**: 3235-3240.
- VEITCH, M., FERREIRA, C., DENSTEN, K., HEATON, S., GRIFFITH, J. (1996). Catering on the move investigating a typical outbreak of gastroenteritis. *C.D.I.* **20(12)**: 279-283.
- 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.
- YOO, H.S., LEE, S.U., PARK, K.Y., PARK, Y.H. (1997). Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **35(1)**: 228-232.
- YÜRÜK, B., CEYHAN, İ., BABÜR, C. (1996). Investigation of *Clostridium perfringens* in canned foods. *Türk Hij. Dern. Biy. Derg.* **53 (2)**:21-24.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı	: Alireza
Soyadı	: HANİFEHNEZHAD
Doğum yeri ve tarihi	: TABRİZ, 08.05.1979
Uyruğu	: İRANLI
Medeni durumu	: Bekar
İletişim adresi ve telefonu	: İran-Tabriz. Maralan. Sok. Amiri

II-Eğitimi

Yüksek Lisans	: 2009-2012 Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimler Enstitüsü, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü
Üniversite	: 2001-2005 Tabriz Üniversitesi, Ziraat Mühendisliği
Ortaokul-Lise	: 1991-1998 Şahid Aştah- Mansur Lisesi
İlkokul	: 1986-1991
Yabancı dili	: İngilizce

III- Bilimsel İlgili Alanlar:

Gıda Mikrobiyolojisi, Moleküler Mikrobiyoloji, Biyoteknoloji

IV- Verdiği Seminerler:

Kitosanın gıdalarda kullanımı

V- Katıldığı kongreler:

Biyoteknoloji Kongresi. Ankara, 08-10 Kasım, 2010