

**T.C.**  
**FIRAT ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ**  
**BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ**  
**ANABİLİM DALI**

**TAVUK PARÇA ETLERİNDE *CLOSTRIDIUM***  
***PERFRINGENS*'İN TOKSİN GENLERİNİN**  
**MULTİPLEKS PCR METODU İLE BELİRLENMESİ**  
**VE FARKLI DONDURMA SICAKLIKLARININ**  
***CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*'İN YAŞAMI**  
**ÜZERİNE ETKİLERİ**

**HÜSNÜ ŞAHAN GÜRAN**

**DOKTORA TEZİ**

**ELAZIĞ-2012**

## ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Emine ÜNSALDI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Mehmet ÇALICIOĞLU

Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden  
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Gülsüm ÖKSÜZTEPE  
Danışman



Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

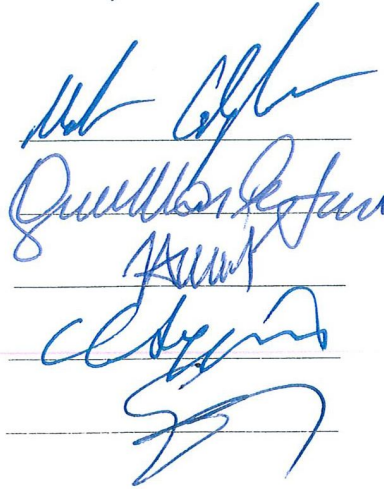
Prof. Dr. Mehmet ÇALICIOĞLU

Prof. Dr. Gürhan Raif ÇİFTÇİOĞLU

Prof. Dr. Hasan Basri ERTAŞ

Doç. Dr. Osman AYGÜN

Doç. Dr. Gülsüm ÖKSÜZTEPE



*Sevgili annem, babam ve ablama  
ithafen...*

## TEŞEKKÜR

Akademik hayatın vazgeçilmezi ve olmazsa olmazı olan doktora sürecimde danışmanlığımı üstlenen ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Gülsüm ÖKSÜZTEPE olmak üzere değerli meslek büyüğüm ve hocam Prof. Dr. Bahri PATIR ile paylaşımlarıyla bilimsel dünyama katkı sağlayan Yrd. Doç. Dr. O.İrfan İLHAK hocama şükranlarımı sunarım. Doktoram boyunca bilgi, deneyim ve bilimsel bakış açısından yararlandığım, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sayın Prof. Dr. Mehmet ÇALICIOĞLU hocama teşekkür etmeyi borç bilirim. Tezimin moleküler aşamasının gerçekleştirilmesinde her türlü destek ve katkıyı sağlayan sayın Doç. Dr. Murat KARAHAN'a, tez izleme jürimde bulunan Prof. Dr. H. Basri ERTAŞ'a ve her zaman yanımda olduklarını hissettiğim Doç. Dr. Aydın VURAL ve Doç. Dr. M. Emin ERKAN'a teşekkür ederim. Doktora sürecimde daima desteğini aldığım, sosyal bilimci kimliği ve hayata dair bakışı ile yaşam felsefeme katkı sağlayan ve bu tezin metinsel yazımının gerçekleştirilmesinde bilgisayarını esirgmeden paylaşan Arş. Gör. Deniz ÖZER'e teşekkür etmekten mutluluk duyarım.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyerek hayata hazırlanmamda çok büyük emeği olan ve haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim, hayatımın değerleri sevgili annem Sevinç GÜRAN ve babam Süleyman GÜRAN'a sonsuz teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR LİSTESİ .....	x
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT .....	3
3. GİRİŞ .....	6
3.1. <i>C. perfringens</i> 'in Biyolojisi ve Genel Özellikleri .....	9
3.1.1. Tarihçe.....	9
3.1.2. <i>Clostridium</i> Genusu ve Filogenetik Sınıflandırma .....	10
3.1.3. <i>C. perfringens</i> 'in Sınıflandırılması .....	12
3.1.4. <i>C. perfringens</i> Gelişimini Etkileyen Faktörler .....	13
3.2. Dondurma İşleminin Tavuk Etlerine ve <i>C. perfringens</i> 'in Yaşamı Üzerine Etkisi.....	17
3.2.1. Dondurma İşleminin Tavuk Etleri Üzerine Etkisi .....	17
3.2.2. Dondurma İşleminin <i>C. perfringens</i> 'in Yaşamı Üzerine Etkisi .....	19
3.3. <i>C. perfringens</i> 'in Virülens Faktörleri .....	22
3.3.1. <i>C. perfringens</i> Toksinleri.....	25
3.3.1.1. Alfa ( $\alpha$ ) Toksin .....	25
3.3.1.2. Beta ( $\beta$ ) toksin .....	25
3.3.1.3. Epsilon ( $\epsilon$ ) Toksin.....	26
3.3.1.4. İota ( $\iota$ ) Toksin.....	28
3.3.1.5. <i>C. perfringens</i> $\beta_2$ Toksini (CPB2).....	28
3.3.1.6. <i>C. perfringens</i> Enterotoksini (CPE).....	29
3.3.1.7. <i>C. perfringens</i> Genomu ve <i>cpe</i> Geni .....	31
3.3.1.8. Biyolojik Silah Olarak <i>C. perfringens</i> .....	35
3.4. <i>C. perfringens</i> 'in İnsanlarda Oluşturduğu Hastalıklar .....	35
3.4.1. <i>C. perfringens</i> tip A'nın Sebep Olduğu Gıda Zehirlenmesi .....	35
3.4.2. Antibiyotik İlişkili Diyare ve Sporadik Diyare.....	36

3.4.3. Ani Bebek Ölümü Sendromu.....	37
3.4.4. <i>C. perfringens</i> tip C'nin Sebep Olduğu Gıda Zehirlenmesi .....	38
3.5. <i>C. perfringens</i> 'in Epidemiyolojisi.....	39
3.5.1. <i>C. perfringens</i> 'in İnsidansı .....	39
3.5.2. Çevre, İnsan ve Gıdalarda Varlığı.....	40
3.5.2.1. Çevrede Varlığı .....	41
3.5.2.2. İnsanlarda Varlığı .....	42
3.5.2.3. Kırmızı Etlerde Varlığı .....	43
3.5.2.4. İşlem Görmüş ve Kürlenmiş Et Ürünlerinde Varlığı.....	44
3.5.2.5. Kanatlı Eti ve Ürünlerinde Varlığı .....	44
3.5.2.6. Gıdalarda <i>C. perfringens</i> Toksin Gen Varlığı.....	45
3.6. <i>C. perfringens</i> 'in Tespiti.....	46
3.6.1. Kültür Yöntemi ile Tespiti ve İdentifikasyonu.....	46
3.6.2. <i>C. perfringens</i> 'in Moleküler Yöntemlerle Tespiti .....	49
3.6.2.1. PCR ile Tespiti .....	49
3.6.2.2. Real Time PCR ve Mikroarray Teknolojileri.....	51
3.6.2.3. <i>C. perfringens</i> 'in Genotipik Tiplendirilmesinde Kullanılan Yöntemler .....	52
3.7. Koruma-Kontrol.....	57
<b>4. GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>	<b>61</b>
4.1. Gereç.....	61
4.2. Yöntem.....	61
4.2.1. Tavuk Parça Etlerinde <i>C. perfringens</i> 'in Kültür Yöntemi ile Tanımlanması ve Elde Edilen İzolatların Multipleks PCR Yöntemi ile Toksin Genlerinin Belirlenmesi .....	61
4.2.1.1. Tavuk Parça Etlerinde <i>C. perfringens</i> 'in Kültür Yöntemi ile İzolasyonu ve İdentifikasyonu .....	62
4.2.1.2. Kültür Yöntemi ile İzole Edilen <i>C. perfringens</i> İzolatlarının Multipleks PCR Yöntemi ile Toksin Genlerinin Belirlenmesi.....	63
4.2.1.2.1. Referans Suşlar.....	63
4.2.1.2.2. DNA Ekstraksiyonu .....	64
4.2.1.2.3. Multipleks PCR Aşaması.....	64

4.2.1.2.4. PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi.....	67
4.2.1.2.5. İstatistiksel Analiz.....	67
4.3. Farklı Dondurma Sıcaklıklarında <i>C. perfringens</i> 'in Yaşam	
Kabiliyetinin Araştırılması .....	69
4.3.1. Referans Suş .....	69
4.3.1.2. İnokülümün Hazırlanması.....	69
4.3.1.3. Kanat Örneklerinin Kontaminasyonu .....	69
4.3.2. Dondurma ve Muhafaza Aşaması.....	70
4.3.2.1. Örneklerin Hazırlanması ve Mikrobiyolojik Analizler.....	70
4.3.2.2. <i>C. perfringens</i> Sayısının (kob/cm <sup>2</sup> ) Hesaplanması.....	71
4.3.2.3. İstatistiksel Analiz .....	71
<b>5. BULGULAR.....</b>	<b>72</b>
5.1. Tavuk Parça Etlerinde <i>C. perfringens</i> 'in Kültür Yöntemiyle	
Tanımlanması ve Toksin Genlerinin Multipleks PCR Yöntemi ile	
Belirlenmesi .....	72
5.1.1. Tavuk Parça Etlerinde <i>C. perfringens</i> 'in Kültür Yöntemi ile	
Tanımlanması .....	72
5.1.2. <i>C. perfringens</i> 'in Toksin Genlerinin Multipleks PCR ile	
Belirlenmesi.....	75
5.2. Farklı Dondurma Sıcaklıklarının <i>C. perfringens</i> 'in Yaşamı Üzerine	
Etkisi.....	80
<b>6. TARTIŞMA.....</b>	<b>83</b>
6.1. Tavuk Parça Etlerinde <i>C. perfringens</i> 'in Kültür Yöntemi ile	
Tanımlanması.....	83
6.2. <i>C. perfringens</i> 'in Toksin Genlerinin Multipleks PCR ile Belirlenmesi ....	87
6.3. Farklı Dondurma Sıcaklıklarının <i>C. perfringens</i> 'in Yaşamı Üzerine	
Etkisi.....	91
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>98</b>
<b>8. EKLER.....</b>	<b>111</b>
8.1. Kültür, PCR ve Deneysel Aşamalarda Kullanılan Ayıraçlar .....	111
<b>9. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>117</b>

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. <i>C. perfringens</i> 'in filogenetik kümesi .....	11
Şekil 2. <i>C. perfringens</i> 'in faz kontrast mikroskobik görüntüsü. ....	17
Şekil 3. <i>C. perfringens</i> 'in bağırsak lümeninde sporlanması ve toksin üretimi .....	31
Şekil 4. <i>cpe</i> (+) <i>C. perfringens</i> tip A izolatlarında <i>cpe</i> geninin genetik lokalizasyonu ve insersiyon sekansları (IS) ile ilişkisi. ....	34
Şekil 5. <i>C. perfringens</i> 'in tavuk parça etlerinden kültür yöntemi ile izolasyonu, identifikasyonu ve toksin genlerinin Multipleks PCR ile belirlenmesi .....	68
Şekil 6. <i>cpe</i> (+) <i>Clostridium perfringens</i> ile kontamine edilen tavuk kanatları.....	70
Şekil 7. Tavuk parça etlerine göre <i>C. perfringens</i> 'in dağılımı.....	74
Şekil 8. Tavuk parça etlerine göre <i>C. perfringens</i> izolat sayılarının dağılımı .....	74
Şekil 9. Tavuk parça etlerinden elde edilen <i>C. perfringens</i> izolatlarında toksin gen dağılımı.....	76
Şekil 10. Çalışmada kullanılan pozitif kontrollerin ethidium bromid ile boyanmış agaroz jel görünümü.....	77
Şekil 11. <i>cpa</i> ve <i>cpb2</i> geni pozitif bazı <i>C. perfringens</i> izolatlarının ethidium bromid ile boyanmış agaroz jel görünümü.....	78
Şekil 12. <i>cpa</i> ve <i>cpe</i> geni pozitif <i>C. perfringens</i> izolatının ethidium bromid ile boyanmış agaroz jel görünümü.....	79

## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b>	Türkiye’de kanatlı eti üretimi ve tüketimi.....	7
<b>Tablo 2.</b>	<i>C. perfringens</i> taksonomisi .....	10
<b>Tablo 3.</b>	<i>C. perfringens</i> ’in toksinlerine göre tiplendirilmesi .....	12
<b>Tablo 4.</b>	Dondurma sırasında bakterilerde meydana gelen değişimler .....	20
<b>Tablo 5.</b>	Dondurma ve çözündürmeye bağlı bakterilerde oluşan hasarın nedenleri .....	20
<b>Tablo 6.</b>	Kromozomal ve plazmidal kaynaklı <i>cpe</i> (+) <i>C. perfringens</i> suşlarının yüksek ve düşük sıcaklıklara karşı direnci .....	24
<b>Tablo 7.</b>	<i>C. perfringens</i> enzim ve toksinlerinin biyolojik aktivite özellikleri ile toksin genleri .....	27
<b>Tablo 8.</b>	<i>C. perfringens</i> ’in identifikasyonunda NMKL tarafından önerilen kriterler .....	63
<b>Tablo 9.</b>	Multipleks PCR’da pozitif kontrol amacıyla kullanılan <i>C. perfringens</i> referans suşlarının toksin gen içeriği .....	63
<b>Tablo 10.</b>	<i>C. perfringens</i> ’in toksin genlerinin belirlenmesinde kullanılan primerlerin dizilimi .....	65
<b>Tablo 11.</b>	Multipleks PCR reaksiyon protokolü.....	66
<b>Tablo 12.</b>	Multipleks PCR siklus protokolü.....	66
<b>Tablo 13.</b>	Tavuk parça etlerinde <i>C. perfringens</i> prevalansı .....	73
<b>Tablo 14.</b>	Tavuk parça etlerine göre <i>C. perfringens</i> izolatlarının dağılımı.....	73
<b>Tablo 15.</b>	Tavuk parça etlerinden elde edilen <i>C. perfringens</i> izolatlarında toksin gen varlığının dağılımı .....	75
<b>Tablo 16.</b>	Tavuk parça etlerinde <i>C. perfringens</i> izolatlarının toksin gen varlığına göre tiplendirilmesi.....	76
<b>Tablo 17.</b>	Farklı dondurma sıcaklıklarının tavuk kanatlarında <i>C. perfringens</i> ’in yaşamı üzerine etkisi .....	81

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>AAD</b>	: Antibiotic Associated Diarrhea (Antibiyotik İlişkili Diyare)
<b>ABD</b>	: Amerika Birleşik Devletleri
<b>AFLP</b>	: Amplified Fragment Length Polymorphism
<b>ATCC</b>	: American Type Culture Collection
<b>a<sub>w</sub></b>	: Su Aktivitesi
<b>CDC</b>	: Centers for Disease Control and Prevention
<b>CMM</b>	: Cooked Meat Medium
<b>CPE</b>	: <i>C. perfringens</i> Enterotoksini
<b>Eh</b>	: Oksidasyon/Redüksiyon Potansiyeli
<b>ELISA</b>	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<b>EMS</b>	: En Muhtemel Sayı
<b>FAO</b>	: Food and Agriculture Organization of the United Nations
<b>FTM</b>	: Fluid Thioglycollate Medium
<b>FDA</b>	: Food and Drug Administration
<b>HACCP</b>	: Hazard Analysis and Critical Control Point
<b>IS</b>	: Insertion Sequence
<b>ISO</b>	: International Organization for Standardization
<b>kb</b>	: Kilobaz
<b>kDa</b>	: Kilodalton
<b>kGy</b>	: KiloGray
<b>Mb</b>	: Megabaz
<b>MLST</b>	: Multilocus Sequence Typing
<b>MLVNTR</b>	: Multilocus Variable-Number Tandem Repeat

<b>NCTC</b>	: National Collection of Type Cultures (Ingiltere)
<b>NMKL</b>	: Nordic Committee on Food Analysis
<b>PEM</b>	: Perfringens Enrichment Medium
<b>PFGE</b>	: Pulsed Field Gel Electrophoresis
<b>RFLP</b>	: Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>RPLA</b>	: Reverse Passive Latex Agglutination
<b>rRNA</b>	: Ribozomal RNA
<b>SD</b>	: Sporadik Diyare
<b>SDS</b>	: Sodium Dodecyl Sulfate
<b>TBE</b>	: Tris-borik asit-EDTA
<b>TSC</b>	: Tryptose Sulphite Cycloserine Agar
<b>USDA/FSIS</b>	: United States Department of Agriculture, The Food Safety and Inspection Service

## 1. ÖZET

Bu çalışma tavuk parça etlerinde (but, göğüs, kanat, baget) *C. perfringens* varlığının kültür yöntemi ile araştırılması, elde edilen izolatların multipleks PCR yöntemi ile *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA*, *cpe* ve *cpb2* toksin genlerinin tespiti ve farklı dondurma ve muhafaza sıcaklıklarının tavuk kanatlarındaki *C. perfringens*'in yaşamı üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla yapıldı.

Elazığ ilinde çeşitli market, şarküteri ve kasaplarda satışa sunulan taze tavuk but (n: 50), göğüs (n: 50), kanat (n: 50) ve baget (n: 50) olmak üzere toplam 200 örnek materyal olarak kullanıldı. Analiz bulguları sonucunda 50 kanat örneğinin 47 (% 94)'sinin, 50 but örneğinin 40 (% 80)'inin, 50 baget örneğinin 34 (% 66)'nün ve 50 göğüs örneğinin 33 (% 66)'ünün *C. perfringens* ile kontamine olduğu ve bu örneklerden elde edilen 568 şüpheli izolatın 558'inin mikroskopik muayene ve biyokimyasal testler sonucunda *C. perfringens* olduğu saptandı. 558 *C. perfringens* izolatından elde edilen DNA örneklerinin multipleks PCR ile 545 (% 97.6)'inin *cpa*, 12 (% 2.1)'sinin hem *cpa* hem de *cpb2* ve 1 (% 0.1)'inin hem *cpa* hem de *cpe* toksin genlerini içerdiği tespit edildi. Ayrıca izolatların hiçbirinin *cpb*, *etx* veya *iA* toksin genlerinden herhangi birini bulundurmadığı ve bu sonuçlar ile 558 *C. perfringens* izolatının 545'inin tip A, 12'sinin *cpb2* (+) tip A ve 1'inin *cpe* (+) tip A olduğu belirlendi.

*C. perfringens*'in farklı dondurma sıcaklıklarında yaşam kabiliyetinin araştırılması için piyasada satışa sunulan deri ve kemiklerinden ayrılmamış yaklaşık 80 g ağırlığındaki tavuk kanatları kullanıldı. Çalışma 3 tekrarlı olacak şekilde tasarlandı ve her tekrar için 24 adet olmak üzere toplam 72 tavuk kanadı kullanıldı. Tavuk kanatlarının  $-12 \pm 1$  °C'de dondurma ve muhafazası (I. grup),  $-18 \pm 1$  °C'de dondurma ve muhafazası (II. grup),  $-40 \pm 1$  °C'de 1 gün dondurma

ve  $-18 \pm 1$  °C'de muhafazasının (III. grup) *C. perfringens* sayısı bakımından muhafaza süresince I. grupta II. ve III. grup ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ( $P < 0.05$ ). 0. günden muhafazanın sonuna kadar (112. gün) II. ve III. gruplar arasındaki fark önemsizken ( $P > 0.05$ ), I. grupta 0. günden muhafazanın sonuna kadar günler arasında farkın istatistiksel açıdan önemli olduğu belirlendi ( $P < 0.05$ ). Muhafaza sonunda (112. gün) *C. perfringens* düzeyi I. grupta; tespit edilebilir seviyenin ( $< 1.0 \log_{10} \text{ kob/cm}^2$ ) altında, II. grupta;  $4.23 \log_{10} \text{ kob/cm}^2$  ve III. grupta;  $4.30 \log_{10} \text{ kob/cm}^2$  olarak saptandı.

Sonuç olarak tavuk parça etlerinin çok önemli bir kısmının *C. perfringens* ile kontamine olduğu tespit edildi. Bundan dolayı tavuk etlerinin kesim işleminden satışa sunulmasına kadar olan aşamalarda hijyenik koşullara azami düzeyde dikkat edilmeli ve HACCP gibi gıda güvenliği sistemlerinin uygulanmasında gereken hassasiyetin gösterilmesine önem verilmelidir.

Ayrıca, tavuk kanatlarının farklı sıcaklıklarda dondurularak uzun süre muhafaza edilmesinin *C. perfringens*'in yaşamı üzerine önemli etkilerinin olduğu saptandı. Dondurarak muhafaza sıcaklığı olan  $-18$  °C ve altındaki değerlerin tavuk kanatlarındaki *C. perfringens*'in vejetatif formları üzerine muhafaza süresince beklenen etkiyi göstermediği dolayısıyla bu sıcaklıklarda muhafaza edilen tavuk kanatlarının potansiyel bir tehlike oluşturabileceği belirlendi. *C. perfringens* sayısının  $-12$  °C'deki muhafaza süresince azaldığı ve 112. günde tespit edilebilir limitin altında belirlenmesinin önemli olduğu, ancak bu sıcaklık değerinin ürünün raf ömrü açısından yaratacağı olumsuzlukların dikkate alınması gerektiği kanaatine varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Tavuk parça etleri, *C. perfringens*, toksin genleri, multipleks PCR, dondurulmuş muhafaza

## 2. ABSTRACT

### **DETECTION OF *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* TOXIN GENES BY MULTIPLEX PCR METHOD IN CHICKEN MEAT PARTS AND EFFECTS OF DIFFERENT FREEZING TEMPERATURES ON SURVIVAL OF *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS***

This study was carried out (i) to investigate the presence of *C. perfringens* in chicken meat parts (breast, wing, drumstick and leg) by culture methods (ii) to detect the *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA*, *cpe* ve *cpb2* toxin genes of isolates obtained from the chicken meat parts by multiplex PCR and (iii) to investigate the effects of different freezing temperatures on the survival of *C. perfringens* in chicken wings.

A total of 200 samples, the fresh chicken breasts (n: 50), wings (n: 50), drumsticks (n:50) and legs (n: 50) were collected from various retail points including supermarkets, delicatessen stores and butchers in Elazig city. Results indicated that 47 of 50 wing samples (94 %), 40 of 50 leg samples (80 %), 34 of 50 drumstick samples (66 %) and 33 of 50 breast samples (66 %) were found contaminated with *C. perfringens*, and 558 out of 568 presumptive-positive isolates obtained from these samples were identified as *C. perfringens* based on the microscopic examination and biochemical tests. It was detected that 545 (97.6 %) of DNA products extracted from these 558 *C. perfringens* strains carried *cpa* toxin gene, 12 (2.1 %) of them carried both *cpa* and *cpb2* toxin gene, one (0.1 %) of them carried both *cpa* and *cpe* toxin genes, according to the multiplex PCR results. In addition, it was determined that none of the isolates carried *cpb*, *etx* or *iA* toxin genes. As a conclusion, 545, 12 and 1 of 558 *C. perfringens* isolates were type A, *cpb2* (+) type A and *cpe* (+) type A, respectively.

Another purpose of the research was to investigate the survival ability of *C. perfringens* at different freezing temperatures. For this purpose, a total 24 chicken wings (c.a 80 g) were used for each repetition and the study was composed from 3 repetitions with a total of 72 wings. In the first group (frozen and stored at  $-12 \pm 1$  °C), the numbers of the pathogen decreased significantly ( $P < 0.05$ ) compared to the second group (frozen and stored at  $-18 \pm 1$  °C) and the third group (frozen at  $-40$  °C following stored at  $-18 \pm 1$  °C), during 112 day storage. No significant difference between the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> group was detected during the storage ( $P > 0.05$ ). Within the first group, significant differences between the days of the storage were found ( $P < 0.05$ ). At the end of the storage (112<sup>th</sup> day), *C. perfringens* level dropped below the detectable level ( $< 1.0 \log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup>) in 1<sup>st</sup> group, and decreased to 4.23 and 4.30  $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup> in 2<sup>nd</sup> group and 3<sup>rd</sup> group, respectively.

The results of the study indicate that the majority of the chicken meat parts are contaminated with *C. perfringens*. Consequently, the hygienic conditions from farm to fork should be ensured by implementing HACCP.

In addition, it was determined that for a long time storage of the chicken wings at different freezing and storage temperatures have a significant effect on the survival of *C. perfringens*. It can be speculated that chicken meat frozen and stored at  $-18$  °C and below may still pose public health risk because of the treatment did not show the expected reduction on the survival of vegetative *C. perfringens* cells. However, freezing and storing the chicken meats at  $-12$  °C decreased the survival ability of vegetative *C. perfringens* and caused to drop below the detectable level of the pathogen at the end of the storage. It is

concluded that the number of *C. perfringens* at -12 °C decreased during the storage period and dropped below detection limit by the 112<sup>th</sup> day. However, the potential negative effects on the shelf life of the product at this storage temperature should be taken into consideration.

**Keywords:** Chicken meat parts, *C. perfringens*, toxin genes, multiplex PCR, frozen storage

### 3. GİRİŞ

Dünyada ve Türkiye’de hayvansal gıda üretiminde kanatlı eti üretim payının son yıllarda artış göstermesi dünya nüfusunun hızla artmasına, kanatlı hayvanların kısa sürede kesim ağırlığına ulaşmalarına, fiyatlarının ekonomik olmalarına bağlanabilir (1). Kanatlı eti; kanatlı hayvanların karkaslarından elde edilen insan tüketimi için uygun tüm parçaları kapsamaktadır. Kanatlı etleri içinde tavuk eti en çok bilineni ve tüketilenidir.

Kanatlı etleri diğer kasaplık hayvan etleriyle kıyaslandığında protein içeriği bakımından daha üstün durumdadır. Sığır eti % 20.9, koyun eti % 19.5, dana eti % 20 oranında protein ihtiva ederken bu oran derisiz tavuk etinde % 21.3’dir. Kanatlı etlerinin içerdiği protein, tüm esansiyel aminoasitleri yeterli ve dengeli oranda içerdiği için yüksek kalitelidir ve sindirilebilme oranı da yüksektir. Ayrıca diyetle ihtiyaç duyulan potasyum, magnezyum, kalsiyum, fosfor ve demir gibi birçok minerali içerir (2).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) istatistikleri Dünya’da kanatlı eti üretiminin 2000 yılında 58.9 milyon ton iken bu rakamın 2009 yılında 80.2 milyon tona ulaştığını göstermektedir (3). Türkiye’de ise 1995 yılında toplam kanatlı eti üretimi 417.539 ton ve kişi başı tüketim 6.62 kg/yıl iken bu rakam 2009 yılında 1.323.625 ton ve 17.104 kg/yıl’a ulaşmıştır (Tablo 1) (3, 4). Dünya genelinde kanatlı eti üretimi içerisinde en büyük payı % 85 düzeyinde tavuk, % 7.5 hindi, % 4.2 ördek, % 2.8 kaz ve % 0.5 ile diğer kanatlı (bıldırcın, keklik, sülün, v.b) etleri alır (5).

**Tablo 1.** Türkiye’de kanatlı eti üretimi ve tüketimi

Yıl	Tavuk eti üretimi (ton)	Hindi eti üretimi (ton)	Diğer kanatlı eti üretimi (ton)*	Toplam üretim (ton)	Değişim (%)	Kişi başına tüketim (kg/yıl)
1995**	313.154	2.646	101.739	417.539	34.11	6.62
1996**	415.155	3.223	135.162	553.540	32.57	8.64
1997**	493.271	2.678	120.640	616.589	11.39	9.47
1998**	497.720	9.577	114.853	622.150	0.90	9.37
1999**	557.666	18.270	80.142	656.078	5.45	9.77
2000**	662.096	23.265	67.021	752.382	14.68	11.05
2001**	592.567	38.991	41.813	673.371	-10.50	9.60
2002**	620.581	24.582	60.043	705.206	4.73	10.01
2003**	768.012	34.078	51.255	853.345	21.01	11.94
2004**	940.889	46.248	58.295	1.045.432	22.51	14.44
2005**	978.400	53.530	52.850	1.084.780	3.76	14.53
2006**	945.779	45.750	40.250	1.031.779	-4.89	13.81
2007***	-	-	-	1.099.920		15.220
2008***	-	-	-	1.123.132		15.017
2009***	-	-	-	1.323.625		17.104

\* Köy tavuğu, ördek, kaz, yumurtacı tavuk

\*\* BESD-BİR

\*\*\* Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı

Tavuk eti, tam karkas, but, göğüs ve kanat ile bunlardan elde edilen ürünler şeklinde yaygın olarak tüketilmektedir (6). Türkiye’de satış miktarlarının ürünlere göre dağılımına yönelik herhangi bir veri bulunmamakla beraber parça tavuk talebinde bir artış olduğu ve eğilimin bu yönde geliştiği bildirilmektedir (7). Benzer şekilde Mulder ve Schlundt (8), gelişmiş ülkelerde tüketicinin bütün

karkas yerine pişmiş ve/veya marine edilmiş ürünlere eğilimin olduğunu bildirmişlerdir.

Gıda ürünleri ile birlikte hayvansal kaynaklı gıdaların da küreselleşmesi gıda kaynaklı patojenlerin dünyanın bir bölgesinden başka bir bölgesine yayılmasını kolaylaştırmakta ve bunun paralelinde gıda kaynaklı hastalıkların ortaya çıkışını hızlandırmaktadır. Gıda kaynaklı hastalık nedenleri arasında patojen bakteri, virus, parazit ve fungus gibi mikroorganizmaların önemli bir yeri vardır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından gıda kaynaklı hastalıklar; patojen mikroorganizmalar veya bunların toksinleri ile kontamine olan gıda veya suların tüketilmesi sonucunda oluşan hastalık durumu olarak tanımlanmakta ve 2005 yılında dünya genelinde 1.5 milyon insanın ishalle ilişkili hastalıklardan dolayı öldüğünü bildirmektedir (9).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)' nde yıllık ortalama 9.4 milyon gıda kaynaklı hastalık vakasının meydana geldiği, bunun 5.5 milyonunun (% 59) viral, 3.6 milyonunun (% 39) bakteriyal ve 0.2 milyonunun (% 2) paraziter kaynaklı olduğu tahmin edilmektedir. Gıda kaynaklı hastalıklara neden olan patojenler arasında sırasıyla norovirüs (5.5 milyon, % 58), non-tifoidal *Salmonella* spp. (1.1 milyon, % 11), *C. perfringens* (1.0 milyon, % 10) ve *Campylobacter* spp. (0.8 milyon, % 9) yer alır. Her yıl bu hastalıklardan dolayı ortalama 55.961 kişinin hastaneye yattığı, 1.351 kişinin ise öldüğü ve bu ölümlerin % 64'ünün bakteriyal, % 25'inin paraziter, % 12'sinin viral kaynaklı olduğu bildirilmektedir (10).

İnsan beslenmesinde önemli bir yer tutan tavuk eti, mikroorganizmaların üremesi için uygun bir ortam sağlar. Kanatlı etlerinde mikrobiyal bulaşma

yumurtadan başlayarak çiftlikten sofraya kadar olan her aşamada oluşabilmektedir. Tavuk kesimhanelerinde ise özellikle tüy ıslatma, iç organların çıkarılması ve daldırma tipi soğutma sırasında meydana gelmektedir (11). Kanatlıların bağırsak içeriğinde, deri ve tüylerinde yüksek oranda mikroorganizma bulunması (12, 13), kanatlı kesimhanelerinde birim zamanda çok sayıda kesimin yapılması ve birçok kontaminasyon noktasının (tüy ıslatma, tüy yolma, iç organların çıkarılması ve soğutma) bulunmasından dolayı çapraz kontaminasyon kaçınılmazdır. Epidemiyolojik veriler, gıda kaynaklı hastalıkların oluşmasında kanatlı et ve ürünlerinin hala en önemli primer nedenler arasında olduğunu göstermektedir (14-16). Bu kapsamda kanatlı etleri arasında üretimi en çok yapılan tavuk etlerinde *C. perfringens* gibi patojenlerin çiftlikten çatala kadar olan süreçte tespit edilmesi ve gerekli koruyucu tedbirlerin alınması gıda güvenliği ve tüketici sağlığı açısından önemini korumaktadır.

### **3.1. *C. perfringens*'in Biyolojisi ve Genel Özellikleri**

#### **3.1.1. Tarihçe**

*C. perfringens* yeryüzünde en geniş yayılıma sahip patojen bakterilerden biri olarak bilinmektedir. 1991 yılında Alpler'deki buzulların erimesi sonucu ortaya çıkan mumyanın (Tyrolean Iceman) kalın barsağında yapılan incelemelerde *C. perfringens*'e ait DNA fragmentlerinin tespit edilmesi bu bakterinin hem doğada hem de insanlarda yaklaşık 5300 yıldır var olduğunu göstermektedir (17). Amerikalı Dr. Welch ve çalışma arkadaşları tarafından 1892 yılında *Bacillus aerogenes capsulatus* olarak bildirilen etken için *Bacillus welchii*, *Bacillus enteritidis sporogenes*, *Bacillus perfringens*, *Bacterium welchii* veya *Clostridium welchii* isimleri kullanılmıştır ve günümüz literatüründe *C. perfringens* olarak

kullanılmaktadır (18-21). Özellikle I. Dünya Savaşı sırasında yaralı askerlerde gazlı gangrenin oluşmasında önemli bir rol oynayan etken yüzbinlerce askerin ölümüne neden olmuştur (22). İlk kez 1950'lerde serotiplendirilmesine başlanan *C. perfringens*'e ait 57 serotip tanımlanmıştır (23).

### 3.1.2. *Clostridium* Genusu ve Filogenetik Sınıflandırma

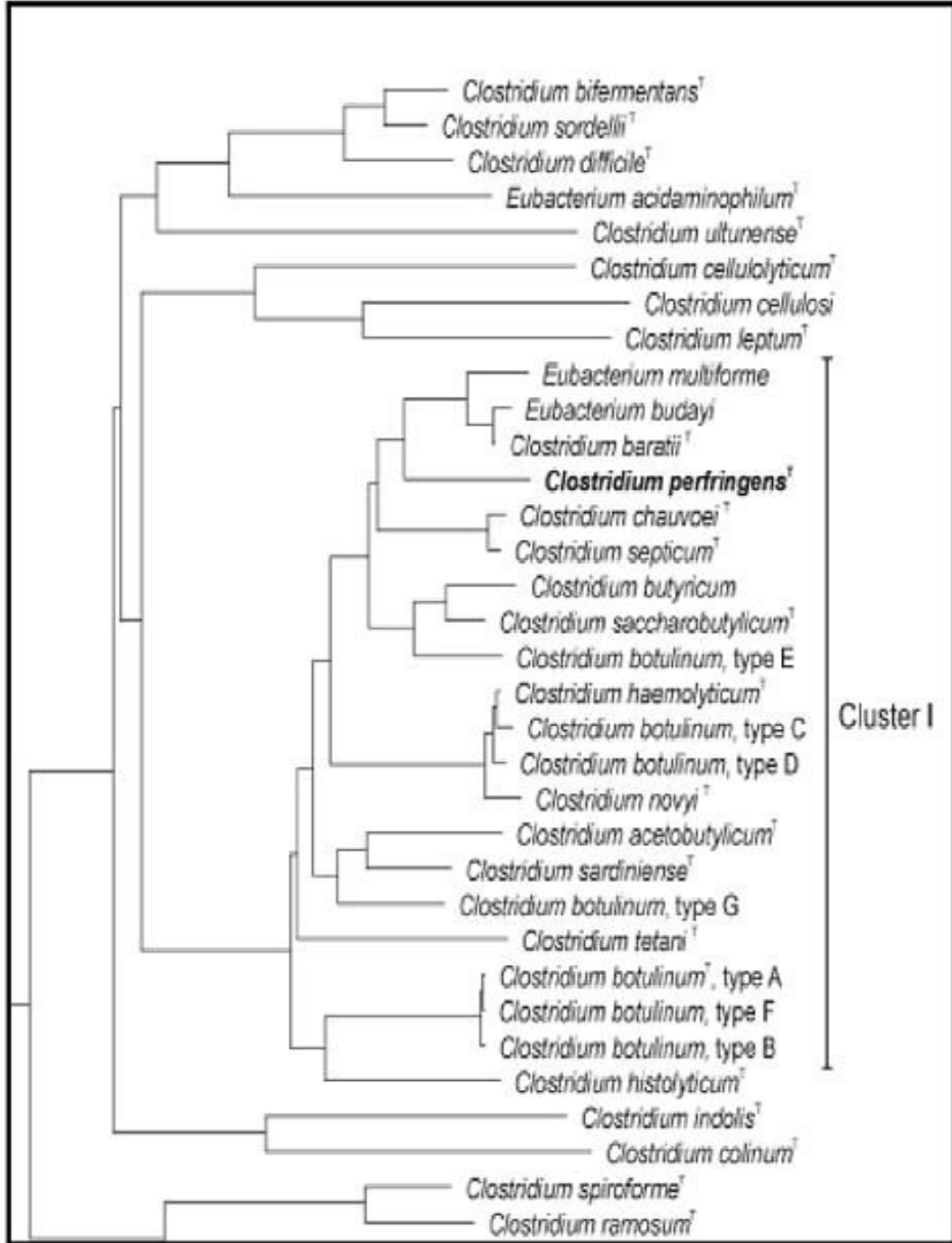
*Clostridium* genusu 150 den fazla türü içinde bulunduran en geniş bakteri cinslerinden biridir. *Clostridium* genusunun önemli bir kısmı biyoteknolojik öneme sahip (biyo-yakıt, önemli enzimlerin sentezi vb.) olup ancak küçük bir kısmı patojen karakterdedir. Clostridial etkenler tarafından üretilen bazı toksinler tıbbi ve kozmetik uygulamalarda son yıllarda geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Bundan dolayı *Clostridium*'lar hem endüstriyel hem de medikal kullanım açısından değerlendirildiğinde yararlı mikroorganizmaları da bünyesinde bulundurur (24).

**Tablo 2.** *C. perfringens* taksonomisi (25)

<b>Bölüm (phylum)</b>	:	<i>Firmicutes</i>
<b>Sınıf(class)</b>	:	<i>Clostridia</i>
<b>Takım (order)</b>	:	<i>Clostridiales</i>
<b>Aile (family)</b>	:	<i>Clostridiaceae</i>
<b>Cins (genus)</b>	:	<i>Clostridium</i>
<b>Tür (species)</b>	:	<i>C. perfringens</i>

Bu genusun üyeleri genellikle Gram (+) ve anaerobik özellik gösterir. *Clostridium*'lar 16 S rRNA gen sekans analizlerine göre filogenetik açıdan 19 farklı clostridial tür kümesinde (cluster) ve düşük oranda G+C içeren Gram (+)

bölüm (phylum) içinde bulunur (Tablo 2). *C. perfringens* çoğu patojenik clostridial türün de yer aldığı (*Clostridium difficile* hariç) Clostridium genusunun merkezi olarak bilinen cluster I içinde Ia alt kümesinde (subcluster) *Clostridium botulinum* ile birlikte yer alır (Şekil 1) (25).



Şekil 1. *C. perfringens*'in filogenetik kümesi (25)

### 3.1.3. *C. perfringens*'in Sınıflandırılması

*C. perfringens* Gram (+), katalaz (-), hareketsiz, endospor oluşturan, sporları subterminal ve oval olan bir mikroorganizmadır. *Clostridium* genusunun tipik bir üyesi olan ve gelişimi için anaerobik koşullara ihtiyaç duyan *C. perfringens* diğer clostridiumların aksine aerotolerant bir özellik gösterir (25).

*C. perfringens* tarafından sentezlenen insan ve hayvanlarda hastalık oluşturabilme potansiyeline sahip en az 14 farklı toksin tanımlanmıştır. *C. perfringens*; bir veya daha fazla ekzotoksin (alfa, beta, epsilon ve iota) üretebilme yeteneğine göre beş tipte (A'den E'ye kadar) incelenir (Tablo 3). *C. perfringens* enterotoksini (CPE) ve beta toksin 2 ( $\beta_2$ ) major toksin olarak tanımlanmamakla beraber önemli clostridial enteritis formlarının virülens faktörü olarak bilinir (26, 27).

**Tablo 3.** *C. perfringens*'in toksinlerine göre tiplendirilmesi (26)

Tip	Toksiner			
	Alfa	Beta	Epsilon	Iota
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) yöntemi kullanılarak genom haritası tamamlanan ilk Gram (+) bakteri olan *C. perfringens* genomu 3.0 ile 3.7 megabase (Mb) arasındadır. Şu ana kadar tamamlanan üç farklı *C. perfringens*

suşuna ait genom sekans sonuçları, suşlar arasında değişik derecelerde genomik çeşitliliğin varlığını ortaya koymuştur (28, 29). *C. perfringens*'in farklı çevre koşullarına adaptasyonunda önemli bir yere sahip olan bu farklılıklar (metabolik kabiliyet, hücre dışı kapsül, toksin ve diğer enzimler gibi) suşlara farklı virülens özellikleri kazandırmaktadır (30).

#### **3.1.4. *C. perfringens* Gelişimini Etkileyen Faktörler**

Mikroorganizmalar sıcaklık, pH, su aktivitesi ( $a_w$ ), oksidasyon/redüksiyon potansiyeli (Eh) gibi faktörlere bağlı olarak gıdalarda gelişip çoğalabilmektedirler. Diğer birçok patojen bakteride olduğu gibi *C. perfringens* de bu koşulların optimal olduğu durumlarda hastalık oluşturabilecek sayıya ulaşabilir. *C. perfringens*, gelişmesi için birçok aminoasit (prikoksal, adenin, biotin, pantotenik asit vb.), vitamin ve minerale ihtiyaç duyar (31). Bundan dolayı et, tavuk eti, balık ve bunların ürünlerinin içinde bulunduğu proteinden zengin gıdalar bu bakteri için favori ortamlardır (32).

Mikroorganizmalar arasında jenerasyon hızı en yüksek olan bu patojenin 43-47 °C arasındaki sıcaklıklarda sıvı buyyon ve ette jenerasyon zamanı 6.3 ile 6.6 dakika arasında değişir (33, 34). *C. perfringens*'in jenerasyon zamanı optimum sıcaklıklarda pişmiş et ürünlerinde 20 dakikadan daha azdır. Jenerasyon zamanı, suşlar arasında farklılık göstermekle birlikte aynı suşun farklı besi ortamlarında üretilmesiyle de değişiklik gösterebilmektedir. Willardsen ve ark. (35), pişmiş sığır kıyımında *C. perfringens* 8238 suşunun 41 °C'deki jenerasyon zamanının 7.3 dakika olduğunu bildirmiştir.

Mezofilik karakter de olan *C. perfringens* 15-50°C arasındaki sıcaklıklarda gelişebilirken 6 °C ile 52.3°C olarak bilinen ekstrem gelişme sıcaklıklarında

etkenin 6°C'nin altındaki sıcaklıklarda canlılığını uzun süre koruyamadığı belirtilmektedir (33, 36, 37). Matematiksel tahminlere göre maksimum ve minimum gelişme sıcaklıkları sırasıyla 51°C (% 95 güven aralığı: 50.92-51.13°C) ile 10.1°C (% 95 güven aralığı: 6.2-16.5°C)'dir (38). Literatür verileri ile desteklenen minimal gelişme sıcaklığı için geniş güven aralığı 15 °C'de her zaman gelişmenin olmayabileceğini göstermektedir (39-43).

Düşük sıcaklıkların *C. perfringens* üzerine etkisi ile ilgili yapılan çalışmalarda buzdolabı (0-10°C) koşullarında genellikle gelişmenin olmadığı ve 15 °C ya da altındaki sıcaklıklarda vejetatif *C. perfringens* sayısında zamanla sayısal bir azalmanın görüldüğü belirtilmektedir (44, 45). Traci ve Duncan (46), eksponensiyal fazdaki *C. perfringens* vejetatif hücrelerinin ani bir soğutma (4°C) ile başlangıç hücre sayısının % 96 azaldığını ve bu sıcaklıkta 90 dakika süre ile bekletmenin, kalan sayının da % 95'inin ölmesine neden olduğunu bildirmiştir.

*C. perfringens* diğer clostridiumların aksine sıkı bir anaerobik özellik göstermez. Pearson ve Walker (47), *C. perfringens*'in +320 mV'da gelişebildiğini ve pH 7.0'de Eh değerinin maksimum +350 mV olduğunu bildirmiştir. Eh değeri yeterli düşüklükte (+320 ile -460 mV) olduğu durumlarda *C. perfringens*'in gelişiminin uyarıldığı belirtilmektedir (33, 47). Bulunduğu ortamda çevresel koşulları modifiye edebilme yeteneğine sahip etken ferrodoksin gibi ürettiği indirgeyici moleküller sayesinde logaritmik faz sırasında çoğalma sürecini devam ettirir. Ancak istasyonier fazda ortam bileşenlerinin daha hızlı okside olmasından dolayı bakterinin metabolik aktivitesinde azalmalar meydana gelir ve buna bağlı hücrel aktivitede yavaşlama görülür.

Çiğ et veya et suyu gibi birçok gıda, *C. perfringens*'in gelişimine izin verecek düzeyde düşük redoks potansiyeline sahiptir. Pişirme işlemi, redoks potansiyelinin düşmesini teşvik eden önemli bir unsurdur. 25°C'den 62°C'ye kadar pişirilen "rolled beef strip" lerde Eh değerinin +312 mV'den +123 mV'ye, çiğ sığır kıymasının aynı ısılarda pişirilmesi durumunda Eh değerinin +112 mV'den -6 mV'ye, otoklavlanma işlemi ile 0 mV'den -45 mV'ye kadar düştüğü ve sıcaklığa bağlı Eh değerindeki bu düşmenin sıcaklık arttıkça oksijen çözünürlüğünün azalmasından kaynaklandığı şeklinde ifade edilmektedir (48).

*C. perfringens* pH 5 ile 9 arasında gelişebilmekte ve ihtiyaç duyduğu optimal değer et ve tavuk etinin de pH değerleri arasında olan 6 veya 7'dir. Etkenin gelişimi pH 5.0'in altında ve 9'ün üstünde azalır (31).

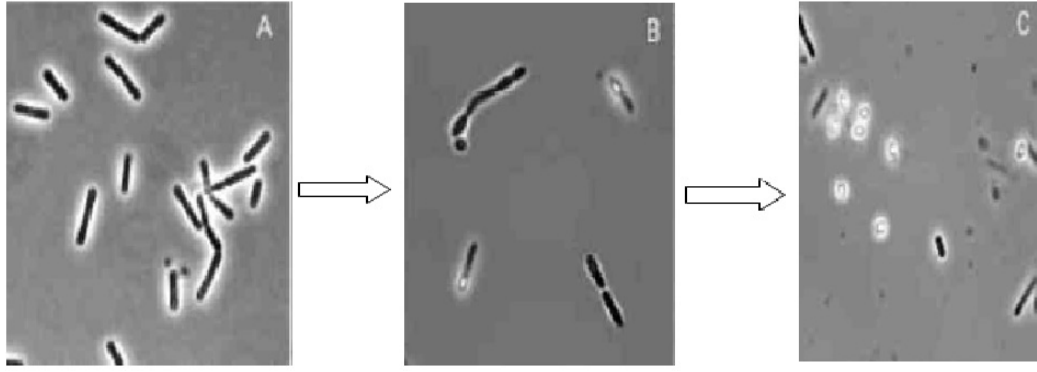
*C. perfringens* düşük  $a_w$  değerlerine dirençli olmayan bir mikroorganizmadır ve optimal  $a_w$  değeri 0.95'tir. Ortamdaki suda çözünen madde türü ve miktarına bağlı olarak vejetatif *C. perfringens* için en düşük  $a_w$  değeri 0.93 ile 0.97 arasında değişir. Bundan dolayı en düşük  $a_w$  değeri; sıcaklık, pH ve çözelti gibi faktörlere bağlıdır. Ancak NaCl, KCl, süktroz veya glikoz eklenerek  $a_w$  değerinin 0.95-0.97 arasında ayarlandığı durumlar da *C. perfringens* gelişiminin baskılandığı belirtilmektedir (49).

Gıdaların normal mikroflorasında bulunabilen psikrofiller, aerob mezofil bakteriler ve enterokok gibi mikroorganizmalar yarışmacı özelliği yetersiz olan *C. perfringens*'in gelişimini baskılar (33). Ortamdaki bakteriyosinler de *C. perfringens* üzerine kuvvetli inhibitörük etki gösterebilmektedir. 200 ppm (% 0.02) düzeyinde sodyum nitrit ( $\text{NaNO}_2$ ) ile 300 ppm (% 0.03) sodyum klorür

(NaCl) yalnız veya kombine kullanılmasının *C. perfringens* üzerine etkili olduğu ve hiçbir gelişme göstermediği belirtilmektedir (49).

Uygun bir yaşam ortamının bulunmadığı durumlarda (sıcaklık, su aktivitesi, radyasyon ve kimyasalların varlığı vb.) sporlanan bir bakteri bu formda yüzlerce yıl yaşamını devam ettirebilir. Metabolik açıdan aktif olmayan bakteri sporları çevresel koşulların elverişli olduğu durumlarda tekrar vejetatif forma dönüşürler. Sporların vejetatif forma dönüşmelerine “jerminasyon” adı verilir ve bu süreç yaklaşık 15 dakika da gerçekleşir. Jerminasyon geri dönüşümsüz (irreversible) bir süreçtir.

*C. perfringens* sporları oval ve subterminal olup, ısıya ve kurumaya dayanıklıdır (Şekil 2). *C. perfringens*'in sporlanması için  $a_w > 0.96$ , sıcaklığın 27-50 °C arasında ve pH değerinin 6.0-8.0 arasında olması gerekir. Bundan dolayı sporlanma koşullarının sağlanması için gerekli şartlar vejetatif hücrelere göre daha sınırlıdır. Uygun koşullarda sporlanma yaklaşık 3 saat içinde gerçekleşir. Optimal sporlanma sıcaklığı 35-40°C arasında olup *C. perfringens* sporlarının ısıya duyarlılıkları suşların genetik özellikleri ile çevresel faktörlere bağlıdır (33). Isıya dirençli sporlarda  $D_{90^\circ\text{C}}$  değeri 15-145 dakika iken ısıya duyarlı sporlarda bu değer 3-5 dakika kadardır (33). Yine sporlar suşa bağlı değişkenlik göstererek, 100 °C'de 0.31-38 dakika arasında yıkımlanırlar (50, 51). Peptonlu su içindeki *C. perfringens* sporları 80 °C'de 10 dakikada % 60.7'si veya 100 °C'de 10 dakikalık ısı işlemi ile % 8'i canlı kalabilmektedir (52). Gough ve Alford (53), *C. perfringens* sporlarının 200 ppm sodyum nitrit içeren kürlenme salamura solüsyonlarında 3°C'de 48 güne kadar varlığını devam ettirebildiğini bildirmişlerdir.



A: vejetatif hücreler

B: sporlanma

C: serbest sporar

**Şekil 2.** *C. perfringens*'in faz kontrast mikroskobik görüntüsü.

### **3.2. Dondurma İşleminin Tavuk Etlerine ve *C. perfringens*'in Yaşamı Üzerine Etkisi**

#### **3.2.1. Dondurma İşleminin Tavuk Etleri Üzerine Etkisi**

Bir gıda maddesinin donma noktası altına düşürülmesi için yapılan işleme “dondurma” denir. Donma sırasında gıdadaki su buza dönüşür. Gıdalarda suyun buza dönüşümü suda çözünebilen protein ve karbonhidrat gibi maddelerin konsantrasyonuna bağlıdır. Et,  $-1.5^{\circ}\text{C}$ 'de donmaya başlar ve etteki suyun yaklaşık yarısı  $-2.5^{\circ}\text{C}$ 'de donmuş olur (54). Genel olarak etin  $0$ - $(-5)^{\circ}\text{C}$  arasında % 74'ü,  $-10^{\circ}\text{C}$ 'de % 83'ü ve  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de % 88'e kadar ulaşan kısmı donmaktadır (55).  $-40^{\circ}\text{C}$ 'de ise etin tamamının donmuş olduğu kabul edilmekle beraber yaklaşık % 10 düzeyinde donmamış suyun bulunduğu belirtilmektedir (55, 56).

Donmuş muhafaza, kanatlı etlerinin daha uzun süre muhafaza edilmesinde ideal bir yöntem olarak kabul edilmektedir.  $-10^{\circ}\text{C}$ 'nin altındaki sıcaklıklarda mufazaya “dondurarak muhafaza” denir ve günümüzde yaygın olarak kullanılan dondurarak muhafaza sıcaklığı  $-18^{\circ}\text{C}$ 'dir (57). Dondurma ile  $-10^{\circ}\text{C}$  ve altındaki sıcaklık değerlerinde mikroorganizmal aktivite baskılanırken biyokimyasal ve

enzimatik aktiviteler düşük düzeyde de olsa devam eder. Dondurarak muhafaza işleminde dondurma ve derin dondurma (deepfreezing) terimleri yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. Ürünün  $-10^{\circ}\text{C}$  ve  $-12^{\circ}\text{C}$  sıcaklıklarda bulunmasına “dondurulmuş ürün”,  $-18^{\circ}\text{C}$  ve altındaki sıcaklık derecelerinde bulunmasına ise “derin dondurma” denir (57).

Endüstriyel anlamda dondurma terimi ile çoğunlukla kırmızı et ile kanatlı eti gibi ürünlerin  $-2^{\circ}\text{C}$ 'den  $-18^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar olan sıcaklıklarda muhafazası ve dağıtılması anlaşılır. Ultra dondurma (ultrafreezing) ise  $-18^{\circ}\text{C}$  ve altındaki sıcaklıklarda muhafaza etme veya ürün için donma hızının yeterli olduğu anlamında kullanılır. Bu tip yöntemlerle dondurma işlemi konvansiyonel dondurma işlemine göre daha hızlı yapılır. Dondurma hızının  $0.3\text{ cm/dakika}$  ve kristal oluşum aşamasını 30 dakikada geçerek ürünün 90 dakikadan daha az bir sürede tamamen donması ise “çok hızlı dondurma” olarak tanımlanır (58).

Hava dolaşımli (air-blast tunnels) dondurmada sıcaklık  $-35^{\circ}\text{C}$  ile  $-45^{\circ}\text{C}$  arasında ve hava hızı en az  $2.5\text{ m/sn}$  kadar olup bu koşullar gıdaların hızlı dondurulmasına neden olur. Yavaş dondurma koşullarında maksimum kristal oluşum zonu olarak bilinen  $-0.5^{\circ}\text{C}$  ile  $-3.8^{\circ}\text{C}$  sıcaklık değerlerinin yavaş geçilmesinden dolayı büyük buz kristalleri oluşurken bu zonun hızlı geçilmesi daha küçük buz kristallerin oluşumuna neden olarak daha az et suyunun ve damlacıklarının meydana gelmesini sağlar. Ayrıca yavaş soğutmaya bağlı olumsuz yöndeki organoleptik değişiklikler tüketici tercihlerini etkileyebildiği için kanatlı etlerinin dondurulduktan sonra  $-17.73^{\circ}\text{C}$  ya da daha düşük derecelerdeki ortamlarda muhafaza edilmesi önerilmektedir (58).

### 3.2.2. Dondurma İşleminin *C. perfringens*'in Yaşamı Üzerine Etkisi

Dondurma işlemi gıdalarda bakteriyal gelişimin kontrol altına alınmasında kullanılan önemli bir muhafaza yöntemidir. Ancak gıdaların dondurulması veya dondurularak muhafaza edilmesi steril olmaları anlamına gelmemektedir (59). Et florasında bulunan bakterilerin yaşam kabiliyeti dondurma düzeyi ile yakından ilişkili olup yavaş dondurma, hızlı dondurmaya göre bakteriler üstüne daha letal bir etkiye sahiptir (59). Yavaş dondurma sırasında (örneğin 1°C/dakika'lık azalma) birçok mikroorganizma gıdada bulunan donmamış su fraksiyonlarına hareket ederek bakteri hücrelerinde su kaybının artmasına ve bakterilerin uzun bir süre ozmotik strese maruz kalmasına neden olur (55). Ozmotik stres ise hücre içi pH ve iyon dengesinde değişime neden olarak enzimlerin inaktivasyonu ile diğer protein yapılarında denatürasyona ve bunların sonucunda da metabolizmal aktivitenin durmasıyla sonuçlanır. Ayrıca bu durum bakterileri hücre ve hücre transport sistemlerinde onarılabilen zararlara ve oksidatif strese daha duyarlı hale getirir (56).

Çok yüksek dondurma hızı (dakikada 10°C'lik bir azalma) hücre içi buz kristallerinin oluşumunu tetikleyerek bakteri hücrelerinde mekanik bir yaralanmaya neden olur (55). Ancak gıda işlemede bu seviyedeki dondurma hızına ulaşılması çok zordur. Donma hızından bağımsız bir şekilde ekstrasellüler buz oluşumuna bağlı mekanik hasarın meydana geldiği fakat bu yolla bakteriyal inhibisyonun oldukça sınırlı olduğu belirtilmektedir (55, 56). Dondurma sırasında gliserol veya gliserin gibi kriyojenik maddelerin varlığı bakterilerin canlı kalmalarını desteklerken, laktik asit gibi etin yapısında bulunan maddeler özellikle

yavaş dondurma sırasında bakterilerde dondurma yaralanmalarını arttırabilmektedir (60).

Bakterilerin dondurma sırasında hangi gelişme fazında olduğu yaşam kabiliyetleri açısından önemli olup aktif üreme fazdaki bakterilerin durgunluk fazındaki bakterilere göre dondurmaya karşı daha duyarlı olduğu belirtilmektedir (60). Ayrıca bakteri türlerinin dondurulmuş ürünlerdeki varlığı başlangıç popülasyonlarına bağlıdır (55). Genel olarak dondurma işlemi sırasında bakterilerde meydana gelen değişimler Tablo 4’de belirtilmiştir. Dondurma ve çözündürmeye bağlı olarak bakterilerde oluşan hasarı açıklamak için öne sürülen çeşitli faktörler ise Tablo 5’te verilmiştir.

**Tablo 4.** Dondurma sırasında bakterilerde meydana gelen değişimler (60, 61)

- 
- a) Kısmi bir ölüm
  - b) Dondurma muhafazasının  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’nin üstünde olduğu durumlarda subletal yaralanma ve çözündürmeye bağlı tekrar gelişim
  - c)  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’nin altındaki sıcaklıklarda oluşan subletal etkiye bağlı yaralananlarda ölme eğilimi
- 

**Tablo 5.** Dondurma ve çözündürmeye bağlı bakterilerde oluşan hasarın nedenleri (60, 61)

- 
1. Ekstrasellüler buz oluşumu
  2. İntrasellüler buz oluşumu
  3. Ekstrasellüler çözünebilen maddelerin konsantrasyonu
  4. İntrasellüler çözünebilen maddelerin konsantrasyonu
  5. Düşük sıcaklık
-

Mikroorganizmaların dondurma ve çözündürme sırasında yaşam kabiliyetinin, soğutma hızı, muhafaza sıcaklığı, dondurma matriksinin bileşimi, mikroorganizmanın besin durumu gibi temel faktörler göz önünde bulundurularak değerlendirilmesi önerilmektedir (61).

*C. perfringens*'in vejetatif formu donmaya karşı duyarlı olmakla beraber sporları daha dirençlidir. Vejetatif *C. perfringens* hücrelerinin donmaya karşı duyarlılıkları üzerine yapılan araştırmalarda dondurma matriksinin (freezing matrix) etkenin canlı kalmasında veya ölmesinde önemli olduğu ortaya konmuştur. Trakulchang ve Kraft (62), farklı et ürünlerine inoküle ettikleri vejetatif *C. perfringens* hücrelerini -29°C'de 42 gün muhafaza ettikleri çalışmalarında vejetatif hücrelerin hızla azaldığı ve muhafazanın 1. gününde vejetatif hücrelerin % 38-75'nin, 42. günde ise % 89.5'inin öldüğünü tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada Ellner's medium'unda 42. günde vejetatif hücrelerin % 99.5'inin öldüğü bildirilmiştir. Harmon ve Kautter (63), -20 °C'de beklettikleri gıda örneklerinde vejetatif *C. perfringens* sayısının 17. günde yalnızca % 0.1'inin canlı kalabildiğini bildirmişlerdir. Juneja ve ark. (64), *cpe* (+) *C. perfringens* suşları (NCTC 8238, NCTC 8239) ile kontamine edilen pişmiş hindi kıymalarının 4 °C'de 6 gün boyunca muhafazasında herhangi bir azalmanın olmadığını, Strong ve Canada (65), *C. perfringens* hücrelerinin % 90'ından fazlasının -17.7 °C'de 30 gün dondurarak muhafazada inaktive olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan diğer araştırmalarda -17.7 °C'de 48 saat, -23 °C'de 14 gün ya da -20 °C'de 17 gün bekletilen gıda ürünlerinde *C. perfringens*'in yaşam oranının % 0.1 ile % 6 arasında değiştiği saptanmıştır (66, 67).

Li ve McClane (68), kromozomal ve plazmidal kaynaklı *cpe* (+) *C. perfringens* tip A izolatlarına ait vejetatif ve spor formlarının 4 °C ve -20 °C'deki sıcaklıklarda yaşam kabiliyetini incelemişlerdir. Vejetatif NCTC 10239 (kromozomal kaynaklı *cpe*) suşu için 4 °C (D<sub>4</sub>) ve -20 °C (D<sub>-20</sub>)'deki D değerinin sırasıyla 11 gün ve 1.5 gün, vejetatif 458 suşunun (plazmidal kaynaklı *cpe*) D<sub>4</sub> ve D<sub>-20</sub> değerini sırasıyla 1.8 gün ile 0.6 gün olarak saptamışlardır. NCTC 10239 suşuna ait spor formunun 4 °C ve -20 °C'de 6 ay bekletilmesinde sırasıyla 0.32 ve 0.42 log, 458 izolatında ise aynı sıcaklık ve sürede sırasıyla 1.34 ve 1.64 log'luk bir azalma olduğunu bildirmişlerdir. Kromozomal ve plazmidal kaynaklı *cpe* (+) *C. perfringens* suşlarının yüksek veya düşük sıcaklıklara karşı direnci ile ilgili yapılan araştırmalar Tablo 6'da özetlenmiştir (69).

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

*C. perfringens* insanlarda orta şiddetli gıda zehirlenmelerinden yaşamı tehdit edebilecek miyonekrozislere kadar değişen derecelerde çeşitli patolojik bozukluklara bağlı hastalık durumlarından sorumludur. *C. perfringens* tarafından üretilen ve önemli virülens faktörler arasında yer alan en az 14 potansiyel toksin veya enzim ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\iota$ ,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ,  $\mu$ ,  $\nu$ , nöraminidaz, CPE ve  $\beta_2$ ) tanımlanmıştır (Tablo 7). Bunlar arasından  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  majör toksin, CPE ve  $\beta_2$  ise minör toksinlerdendir (25, 26).

*C. perfringens* tip A izolatları arasında yer alan *cpe* plazmidinin konjugasyon ile horizontal transferinin gerçekleşebilmesi etkenin virülensi açısından önemlidir. Bunun yanı sıra NCTC 8239 gibi kromozomal kaynaklı *cpe* (+) suşlarında transpozonların bulunması *cpe*'nin hareketli olmasına neden olur ve

bu da *C. perfringens* tip A'nın virülensine katkı sağlayan önemli bir özellik olarak kabul edilir (25).

*C. perfringens* virülens gen ekspresyonlarının düzenlenmesinde diğer Gram (+) patojenlerde olduğu gibi farklı yollar izleyebilmektedir. Bunlar arasından en bilineni *C. perfringens*'in  $\alpha$ ,  $\theta$ ,  $\beta_2$  ve  $\kappa$  toksin ekspresyonlarını VirR/VirS olarak adlandırılan iki bileşikli bir regülatör sistem aracılığıyla düzenlenmesi olup bu sistemin VR/RNA ile ilişkili olabileceği ifade edilmektedir (70, 71). Türler arası iletişimde rol oynayan *luxS* geninin AI-2 (auto inducer-2) sinyalinin *C. perfringens*'in VirR/VirS regülasyon sistemini uyardığı ve  $\alpha$ ,  $\theta$  ve  $\kappa$  toksinlerin sentezini arttırdığı belirtilmektedir (70, 72).

Sporlanma sırasında CPE ekspresyonunda sporlanma ile ilişkili gen ekspresyonlarının düzenlenmesinde rol oynayan spesifik sigma ( $\sigma$ ) faktörlerinin bulunması *C. perfringens*'in bazı regülatör mekanizmalar kullanarak virülens gen ekspresyonlarını nispeten alışılmadık şekilde düzenleyebildiğini göstermektedir (25).

**Tablo 6.** Kromozomal ve plazmidal kaynaklı *cpe* (+) *C. perfringens* suşlarının yüksek ve düşük sıcaklıklara karşı direnci (69)

Özellik	Kromozomal <i>cpe</i> (+)	Plazmidal <i>cpe</i> (+)	Kaynak
	suşlar	suşlar	
Zaman (dak): vejetatif hücrelerde 1 log'luk azalma için gerekli sıcaklık (55 °C)	13.1	6.7	Sarker ve ark., 2000
Zaman (dak): sporlarda 1 log'luk azalma için gerekli sıcaklık (100 °C)	60.0	1.0	Sarker ve ark., 2000
95 °C'de 30 dak. ısı uygulamasının spor sayısında meydana getirdiği azalma (log)	9 suş < 1.5	5 suş > 5.0	Grant ve ark., 2008
	2 suş 1.5-5.0	1 suş < 1.5	
Zaman (gün): vejetatif hücrelerde 1 log'luk azalma için gerekli sıcaklık (4 °C)	~13	~2	Li ve McClane, 2006
Zaman (gün): vejetatif hücrelerde 1 log'luk azalma için gerekli sıcaklık (4 °C)	~2	~1	Li ve McClane, 2006
4 °C'de 6 ay bekletmenin spor sayısında meydana getirdiği azalma (log)	0.3	~1.3	Li ve McClane, 2006
-20 °C'de 6 ay bekletmenin spor sayısında meydana getirdiği azalma (log)	~0.4	~1.6	Li ve McClane, 2006

### 3.3.1. *C. perfringens* Toksinleri

#### 3.3.1.1. Alfa ( $\alpha$ ) Toksin

Büyük bir kısmı *C. perfringens*'in A tipi tarafından üretilen  $\alpha$  toksin diğer *C. perfringens* tipleri tarafından da sentezlenebilmektedir. Alfa toksin lesitinaz ve sfingomyelinaz aktiviteli çinko içeren bir fosfolipaz C enzimidir (73). Alfa toksin kromozomda bulunan ve tek bir kopyası olan *cpa* (*plc*) geni tarafından kodlanır (74). 43 kDa moleküler ağırlığında olan toksin 1941 yılında MacFarlane ve Knight tarafından ilk kez fosfolipaz C enzimi olarak tanımlanmıştır (75). Alfa toksin, sitolitik aktiviteye sahip C-terminal ucu ile fosfolipaz aktiviteye sahip N-terminal ucu olmak üzere 2 ana kısımdan oluşur. Alfa toksin trombosit ve lökositlerde yıkımlanmalara neden olan, hemolitik özellikte, kapiller geçirgenliği arttıran ve optimal aktivite koşulları için kalsiyum ile magnezyum gibi 2 değerli katyonlara ihtiyaç duyan bir toksindir (76).

Yapılan fare model çalışmalarında gazlı gangrene neden olan alfa toksinin *C. perfringens* toksinleri arasında bulunan perfringolysin O toksini ile birlikte sinerjistik bir etki gösterdiği belirlenmiştir (77). Mutant alfa toksin kullanılarak yapılan bir araştırmada tavuk nekrotik enteritisinin önemli virülens faktörü olarak bilinen alfa toksinin (78, 79) hastalığın patogenezi için gerekli olmadığı tespit edilmiştir (80).

#### 3.3.1.2. Beta ( $\beta$ ) toksin

*C. perfringens* B ve C tipleri tarafından üretilen beta toksin 336 aminoasitli tek polipeptid zincirden oluşan, yaklaşık 34.9 kDa moleküler ağırlığa sahiptir (76,81). Toksin üretimi için optimal pH yaklaşık 7 olup bu değer ince bağırsak pH'sına yakındır. Fareler de letal dozu ( $DL_{50}$ ) 1.87  $\mu$ g'dır (49). Plazmit üzerinde

bulunan *cpb* geni tarafından kodlanan  $\beta$  toksinin izoelektrik noktası 5.4-5.5 kadardır (82). 50 °C'nin üzerindeki sıcaklık değerlerinde veya tripsine maruz bırakıldığında toksin inaktive olur ve bu uygulamaların devam etmesi durumunda toksin 13 kDa ve 15 kDa ağırlığında iki fragmente hidrolize olur (82). Koyun, kuzu ve kuş gibi birçok hayvan türünde enterotoksemi ve nekrotik enteritisin önemli virülens faktörü olan beta toksin insanlarda “enteritis nekrotikans” olarak bilinen gıda kaynaklı zehirlenmelerin de nedenidir (76, 83). Tatlı patatesin kontamine gıdalar ile tüketilmesinin hastalığın görülme sıklığını arttırdığı, bu durumun da tatlı patates içerisinde bulunan tripsin inhibitörlerinin toksinin parçalanmasını engellemesinden kaynaklandığı bildirilmiştir (83). Hastalık erken tedavi edilmediği durumlarda ölümlerle sonuçlanabilmektedir. Ancak ölümcül bir hastalık olarak bilinen insan nekrotik enteritisi erken tedavi edildiğinde hayat kurtarıcı olabilmektedir.

### 3.3.1.3. Epsilon ( $\epsilon$ ) Toksin

Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezi (CDC) listesinde B (biyoterörist ajan) kategorisinde olan toksin, botulinal ve tetanoz toksininden sonra bilinen en güçlü clostridial toksindir (76). Büyük bir plazmit üzerinde bulunan *etx* geni tarafından kodlanan epsilon toksin yaklaşık 32.7 kDa moleküler ağırlığa sahip inaktif bir protoksin olarak üretilir (28, 85). Bağırsak lumeninde bulunan tripsin ve kimotripsin kombinasyonu epsilon toksinin toksitesini indükleyerek en az 1000 kat daha artmasına neden olur. *C. perfringens* B ve D tipleri tarafından sentezlenen toksin, sığır, koyun, keçi ve kuzularda hastalık oluşturur (86). *C. perfringens* tip B yeni doğan kuzu dizanterisine, tip D ise çoğunlukla koyunlarda enterotoksemilere neden olur.

**Tablo 7. *C. perfringens* enzim ve toksinlerinin biyolojik aktivite özellikleri ile toksin genleri (84)**

<b>Toksin/enzim</b>	<b>Gen</b>	<b>Genetik lokalizasyonu</b>	<b>Etki şekli</b>	<b>Biyolojik aktivitesi</b>
<b><math>\alpha</math></b>	<i>cpa</i> veya <i>plc</i>	Kromozom	Fosfolipaz C/ sfingomiyelinaz	Sitolitik, hemolitik, dermonekrotik, letal
<b><math>\beta_1</math></b>	<i>cpb1</i>	Plazmit	Hücre membrane geçirgenliğinde değişiklik? Hücre membrane geçirgenliğinde değişiklik?	Sitolitik, dermonekrotik, letal İntestinal mukozada hemorojik nekrozis
<b><math>\beta_2</math></b>	<i>cpb2</i>	Plazmit	Hücre membrane geçirgenliğinde değişiklik?	Sitolitik, letal İntestinal mukozada hemorojik nekrozis
<b>E</b>	<i>etx</i>	Plazmit	Hücre membrane geçirgenliğinde değişiklik	Çeşitli organlarda ödem: Karaciğer, böbrek, merkezi sinir sistemi dermonekrotik, letal etki
<b>I (Ia)</b>	<i>iap</i>	Plazmit	Aktinin ADP-ribozilasyonu	Aktin hücre iskeleti yapısında bozulma,
<b>I (Ib)</b>	<i>ibp</i>	Plazmit	Ia'ya	Hücre bariyer yapısında bozulma, dermonekrotik, letal
<b>Enterotoksin</b>	<i>cpe</i>	Kromozom	Hücre membrane geçirgenliğinde değişiklik	Sitotoksik, eritematöz, letal
<b>Enterotoksin</b>	<i>cpe</i>	Plazmit		Diyare
<b><math>\delta</math></b>	?	?	Hemolizin	İlave virülens faktör
<b><math>\theta</math> (PfoA)</b>	<i>pfoA</i>	Kromozom	Hemolizin, kolesterole spesifik	İlave virülens faktör
<b><math>\kappa</math></b>	<i>colA</i>	Kromozom	Kollajinaz, jelatinaz	İlave virülens faktör
<b><math>\lambda</math></b>	<i>lam</i>	Plazmit	Proteaz	İlave virülens faktör
<b><math>\mu</math></b>	<i>nagH</i>	Kromozom	Hiyaluronidaz	İlave virülens faktör
<b><math>\nu</math></b>	?	?	DNAase	İlave virülens faktör
<b>Nöraminidaz</b>	<i>nanH,I</i>	Kromozom	Nöraminidaz	İlave virülens faktör
<b>Üreaz</b>	<i>urea-C</i>	Plazmit	Üreaz	İlave virülens faktör

#### 3.3.1.4. İota (ι) Toksin

İota toksin *C. perfringens* tip E'nin majör toksini olup letal ve dermonekrotik özelliktedir. İota toksin; *Clostridium spiroforme*, *Clostridium botulinum* C2 toksin ve *Clostridium difficile* ADP-ribosiltransferaz'ın dahil olduğu clostridial binary toksin grubunun bir üyesidir (87).

İota toksin aynı plazmitte bulunan iki farklı gen tarafından kodlanan iki bağımsız polipeptitten oluşur (*C. perfringens* Iota-Toksin: Yapı ve Fonksiyon). Bunlar; yaklaşık 47.5 kDa moleküler ağırlığındaki iota toksin a (Ia) ile moleküler ağırlığı 71.5 kDa olan toksinin hücreye bağlanmasında ve hücre içine girmesinde rol oynayan iota toksin b (Ib)'dir (88, 89). *C. perfringens* tip E hayvanlarda özellikle de çiftlik hayvanlarında diyarelere neden olmaktadır (76).

#### 3.3.1.5. *C. perfringens* β<sub>2</sub> Toksini (CPB2)

Gilbert ve ark. (90) tarafından ilk kez tanımlanan CPB2 toksini plazmit üzerinde bulunan *cpb2* geni tarafından kodlanır. Molekül ağırlığı 28 kDa olan β<sub>2</sub> toksin *C. perfringens* tip C izolatlarından saflaştırılarak elde edilen 34.9 kDa ağırlığındaki β toksininden farklıdır ve bu farklılık kısmen β toksinin proteolitik duyarlılığına bağlanmaktadır (91).

β<sub>2</sub> toksin sekansının β toksin veya bilinen diğer *C. perfringens* toksinleri ile herhangi bir homoloji göstermediği ancak β toksin ile benzer bir biyolojik aktivitede olan β<sub>2</sub> toksinin, fare bağırsak hücreleri üzerine sitotoksik etkili ve öldürücü olduğu bildirilmektedir (91).

β<sub>2</sub> toksin üreten *C. perfringens* türleri domuzlarda nekrotik enteritis, atlarda ise enterokolitis gibi hastalıklara neden olmaktadır. İnsanlarda antibiyotik ilişkili diyare (AAD) ve sporadik diyare (SD) vakalarından elde edilen bazı

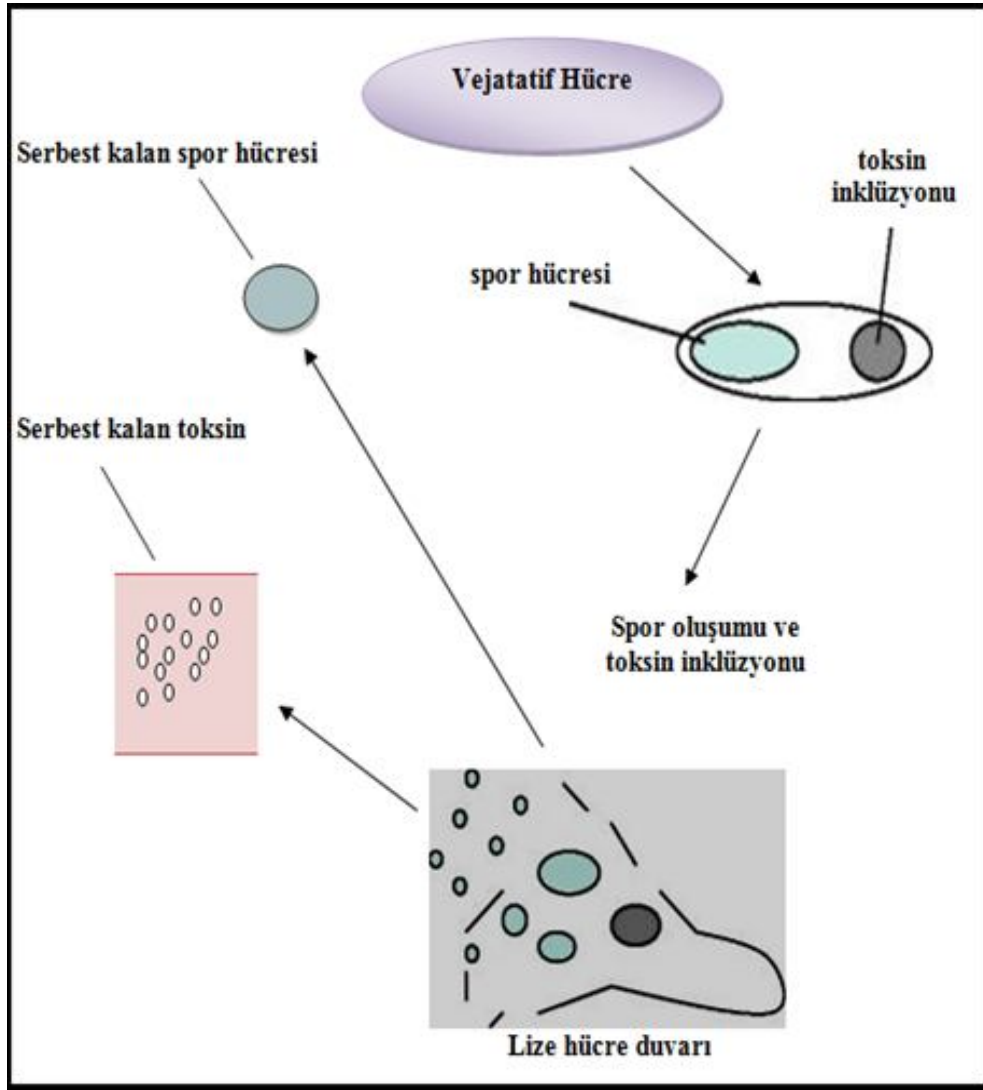
plazmidal kaynaklı *cpe* (+) *C. perfringens* izolatlarının *cpb2* geni taşıdığı ve bunun CPE toksinine yardımcı toksin olarak görev yaptığı, böylece enterotoksinin patojenik etkinliğinde rol aldığı düşünülmektedir (69).

### **3.3.1.6. *C. perfringens* Enterotoksini (CPE)**

İnsanlarda *C. perfringens* tip A gıda kaynaklı gastroenteritle seyreden zehirlenmelerin nedeni *C. perfringens* enterotoksin (CPE)'dir. CPE'nin enterik patojenitesinin belirlenmesi üzerine yapılan bir çalışmada gönüllülere toksinin oral yolla verilmesi sonrası ishal ve abdominal krampların görüldüğü bildirilmiştir (92). CPE, 319 aminoasitten oluşan polipeptid yapıda, 3.5 kDA ağırlığında ve izoelektrik noktası 4.3 olan sadece *C. botulinum* protein kompleksi ile homolog olduğu bildirilen bir enterotoksindir (93, 94). Enterotoksin aminoasitlerinin % 43'ü hidrofobik karakterde ve polipeptid zincir boyunca dağılmış durumdadır (95). Enterotoksinin % 80'i P-yapısında olup geriye kalan % 20'si ise rastgele sarmal yapıdadır. "C" ve "N" olmak üzere iki ana parçadan oluşan CPE proteininin C terminal ucu bağırsaklardaki protein reseptörlerine bağlanma bölgesini içerir. Bu reseptörler birçok hücrenin bağlanma bölgelerinde yerleşmiş olan 22 kDa'lık claudin proteinleridir (96, 97). Bu parçanın sitotoksik özellikte olmadığı ifade edilmektedir (49). N-terminal ucun ilk 44 aminoasit ve C-terminal ucun 3 aminoasitlik kısmının çıkarılmasıyla herhangi bir aktivasyon kaybının gözlenmediği bildirilmektedir (94). CPE'nin ilk 25-34 aminoasitlik kısmı ise bağırsaklarda tripsinasyon özelliği taşır (98). CPE'de 44-171 aminoasitler arasında kalan bölgenin sitotoksite ve içine yerleşme özelliği gösterdiği bildirilmektedir (99).

Farklı izolatlar tarafından üretilen CPE'ler karşılaştırıldığında sekans görünümlerinin yüksek düzeyde korunmuş olduğu görülmektedir. Isıya duyarlı protein yapısındaki toksin ekstrem pH değerlerine karşı duyarlı olup 60 °C'de 10 dakikada biyolojik aktivitesini kaybetmektedir. Ancak tripsin, kimotripsin veya papain gibi bazı proteolitik uygulamalara karşı dirençlidir. Sınırlı tripsinizasyon veya kimotripsinizasyon işleminin enterotoksin aktivitesini 2-3 kat arttırdığı ve bu intestinal proteazların gıda zehirlenmesi sırasında CPE'nin aktivasyonunda rol oynadığı bilinmektedir (100). Toksinin serolojik aktivitesinin 55 °C'de 38 dakikada, 57 °C'de 37 dakikada ve 60 °C'de 4 dakikada 1 desimal azalmaya neden olduğu belirtilmektedir (101). CPE'nin -20 °C'de 20 gün veya 37 °C'de 7 gün muhafaza edildiğinde serolojik aktivitesini koruduğu, ancak biyolojik etkisini kaybettiği saptanmıştır (33).

*C. perfringens*'de genetik düzeyde sporlanmanın başlaması sporlanma transkripsiyon faktörü olarak bilinen *spo0A* tarafından kontrol edilir (102, 103). Sporlanma ile direk ilişkili olan CPE biyosentezi sporlanmanın uyarılması ile başlar ve en az 6-8 saat içinde miktarı giderek artış gösterir. Bağırsak lumenindeki sporlanma süreci tamamlandığında ana (mature) spor hücresi lize olur ve olgun spor ile birlikte CPE toksini de serbest kalır (Şekil 3). Yapılan bir araştırmada *cpe* (+) *C. perfringens* tip A suşunda sporlanma transkripsiyon faktörü (*spo0A*)'nın bloke edilmesinin hem sporlanmanın hem de CPE üretimini önlediği bunun da sporlanma ile CPE üretimi arasındaki ilişkinin önemli bir kanıtı olduğu ifade edilmektedir (103).



Şekil 3. *C. perfringens*'in bağırsak lümeninde sporlanması ve toksin üretimi

### 3.3.1.7. *C. perfringens* Genomu ve *cpe* Geni

Günümüze kadar *C. perfringens* 13, ATCC 13124 ve SM101 olmak üzere *C. perfringens* tip A'ya ait üç farklı patojen suşun genom sekansları tamamlanmış olup hayvanlarda hastalık oluşturan toksijenik suşların (B, C, D ve E) gen sekanslarının belirlenmesine devam edilmektedir (30, 102). Tamamlanan genom analizleri *C. perfringens* türüne ait üç farklı suş arasında değişik derecelerde

farklılıkların olduğunu bu durumda suşların virülens özelliklerinde değişikliğe ve farklı hastalık fenotiplerin oluşmasına neden olduğu yönündedir (30).

Bir toprak izolatu olan *C. perfringens* 13 suşuna ait genom sekansı analizleri bu suşun enterotoksin negatif tip A olduğu ve diğer suşlara göre transformasyon yeteneğinin kolay olması gangren ile ilişkili araştırmalarda yaygın bir şekilde kullanılmasına neden olmuştur (104, 105). Ancak sporlanma besiyerinde zayıf sporlanan, hayvan gangren modellerinde orta düzeyde virülens gösteren ve daha küçük bir genoma sahip olan suşun diğer gangren izolatları ile karşılaştırıldığında bu özellikleri bakımından atipik bir karakterde, 2.660 protein kodlayan bölgeye ve düşük G+C (% 28.6) içeriğine sahip olup genom büyüklüğü 3.031.430 bp (base pair = baz çifti) ve yaklaşık 2700 ORF kodlanır (102, 106, 107, 108).

Gazlı gangrenli bir hastadan izole edilen ATCC 13124 suşunun yüksek miktarda gangren ile ilişkili toksin ürettiği tespit edilmiştir (109). ATCC 13124 suş genomu tekli dairesel bir kromozoma sahip, 3.256.682 bp büyüklüğünde ve toplam 3040 putative protein kodlayan diziye (CDSs) sahip olup 8 rRNA operon kodlanır (30).

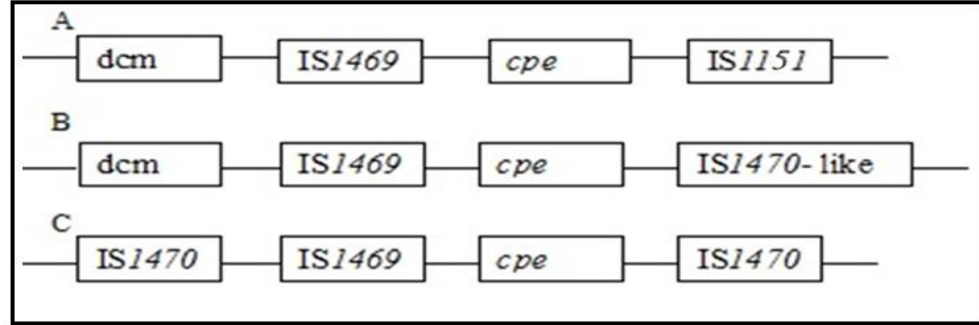
Enterotoksin üreten (CPE) gıda kaynaklı zehirlenme suşu olan *C. perfringens* NCTC 8798'in transforme derivatifi olan SM101 suşunun (electroporatable derivative) 2.897.392 bp büyüklüğünde tekli dairesel bir kromozomu vardır. Aynı suş 38.092 bp büyüklüğünde epizomal bakteriyofaja (*C. perfringens*  $\phi$ SM101) ve 12.397 bp (pSM101A) ile 12.026 bp (pSM101A) boyutunda iki plazmide sahiptir. Ayrıca bu suşta 2.584 putative protein kodlayan dizi (CDSs) tanımlanmış olup 10 rRNA operonu kodlanır (30).

*C. perfringens* enterotoksininin tek bir *cpe* geni tarafından kodlandığı *cpe* (+) *C. perfringens* suşlarında *cpe* geninin homolog olduğu ancak bazı suşlarda *cpe* promotor bölgesinde 45 bp'lik insersiyonların bulunduğu ancak bunun diğer mikroorganizmalarla önemli bir DNA sekans homolojisi göstermediği bildirilmiştir (110, 111). CPE ilişkili hastalık durumları yalnızca *C. perfringens* tip A kaynaklı olarak bilinmesiyle birlikte *cpe* geni herhangi bir *C. perfringens* tipinde (A-E) de bulunabilmektedir. *C. perfringens* tip E izolatlarında yapılan araştırmalarda bu izolatların *cpe* genini taşımasına rağmen amino asitleri kodlayan ve proteinleri oluşturan kodonlar (tripletler) serisi olarak bilinen açık okuma alanı (open reading frame, ORF) veya *cpe* sekanslarındaki ribozom bağlanma bölgelerindeki mutasyonların CPE'yi üretebilme yeteneğini kaybetmesine neden olduğu ifade edilmiştir (112).

*C. perfringens* tip A suşlarında *cpe* geni kromozom da veya büyük bir plazmit üzerinde bulunabilmektedir (110). Kromozomal *cpe* içeren izolatların hem vejetatif hem de spor formlarının ısıya dirençli oldukları bu durumun pişmiş et ve et ürünlerinden kaynaklanan A tipi gıda infeksiyonlarında en önemli rolü oynadığı bildirilmektedir (113).

Kromozomal *cpe* ile ilgili yapılan araştırmalarda *cpe*'nin, bir hücrenin genomunda farklı yerlere, transpozisyon olarak adlandırılan bir süreçle hareket edebilen 6.3 kilobase (kb) ağırlığındaki Tn5565 transpozon üzerinde yer aldığı, transpozonun çıkarılmasıyla enterotoksin üretiminin durduğu belirlenmiştir (25, 114). DNA transpozonları ikiye ayrılır ve bunlardan biri olan birleşik transpozonların (örneğin bakterilerdeki Tn5, 9, 10, 903 ve 1681) iki ucunda birbirine çok benzer ama ters yönlü (evrik) diziler, "insersiyon dizileri" (*insertion*

*sequence*; IS) bulunur. Transpozisyon için gerekli olan tranpozaz ve entegraz enzim genlerini kodlayan IS dizileri oldukça uzundurlar. Southern blot çalışmaları ile kromozom üzerinde yer alan *cpe*'nin IS 1470 (A.B) ve IS 1469 insersiyon sekansları ile bağlantılı olduğu belirlenmiştir (74, 110, 115).



**Şekil 4.** *cpe* (+) *C. perfringens* tip A izolatlarında *cpe* geninin genetik lokalizasyonu ve insersiyon sekansları (IS) ile ilişkisi. A, plazmit kaynaklı *cpe* tip IS1151-*cpe*; B, plazmit kaynaklı *cpe* tip IS1470-like-*cpe*; C, kromozomal tip IS1470-*cpe*

Moleküler araştırmalar; gıda kaynaklı zehirlenmelerden, gıda kaynaklı olmayan (antibiyotiğe bağlı ve sporadik) diyare ve hayvanlardan elde edilen *C. perfringens* tip A izolatlarında *cpe* geninin yaklaşık 100 kb ağırlığında büyük bir plazmidin üzerinde yer aldığını göstermektedir (116, 117). Plazmit kaynaklı *cpe* (+) *C. perfringens* tip A izolatlarında da *cpe* IS elementleriyle yakın ilişkilidir (118). Bazı plazmidal *cpe*'lerin, *cpe*'nin altında bulunan IS1470 ile homolog dizilere sahip olduğu ve aynı pozisyonda yer alan bu dizilerin, kromozomal *cpe*'de bulunan IS1470'e göre defektif özellikte ve zıt yönlü olduğu belirtilmektedir (118). Diğer plazmit kaynaklı *cpe* suşları ise *cpe*'nin alt kısmında IS1151'i bulundurlar (119). Kromozomal *cpe*'den farklı olarak plazmidal

*cpe*'nin üstünde 1.2 kb'lik diziye sahip IS1469 bulunur ve IS1469'un da üstünde sitozin metilaz (*dcm*)'ı kodlayan ORF'ye sahiptir (119).

### **3.3.1.8. Biyolojik Silah Olarak *C. perfringens***

*C. perfringens* epsilon toksin CDC tarafından potansiyel biyolojik silah veya biyoterörizm ajanı olarak kabul edilmektedir (30). CDC'nin kategori B listesinde yer alan toksinin farelerdeki % 50 letal dozu (LD<sub>50</sub>) 100 ng/kg kadardır (120).

### **3.4. *C. perfringens*'in İnsanlarda Oluşturduğu Hastalıklar**

*C. perfringens* insanlarda ölümlerle sonuçlanabilen farklı hastalık durumlarına neden olmaktadır. İnsanlarda gıda kaynaklı hastalıklara *C. perfringens* tip A ve C suşları neden olmakla beraber özellikle kromozomal *cpe* (+) *C. perfringens* tip A'lar hastalığın etiyolojisinde önemli bir rol oynar. Ancak gıda maddelerinden de tespit edilebilen ve insanlarda antibiyotik ilişkili diyare (AAD) ve sporadik diyare (SD)'lere neden olan plazmidal *cpe* (+) *C. perfringens* tip A'lar da gıda kaynaklı hastalıklara yol açabilmektedir (68).

#### **3.4.1. *C. perfringens* tip A'nın Sebep Olduğu Gıda Zehirlenmesi**

*C. perfringens* tip A sanayileşmiş ülkelerde gıda kaynaklı zehirlenmelerin en yaygın nedenleri arasındadır (121, 122). 2000'li yılların başlarına kadar *C. perfringens* tip A gıda kaynaklı zehirlenmelerin yalnızca kromozomal *cpe* (+) olan suşları tarafından olduğu bildirilmiştir (84). Ancak Finlandiya ve Almanya'da yapılan salgın araştırmaları zehirlenme vakalarına ait izolatlarda plazmidal kaynaklı *cpe* (+) suşların bulunabileceğini göstermesi bu durumu tersine çevirmiştir ve araştırmacıların plazmidal kaynaklı *cpe* (+) *C. perfringens*

izolatlarına yoğunlaşmasını neden olmuştur (69). Japonya ve Avrupa'da plazmidal kaynaklı *cpe* (+) *C. perfringens* tip A varlığının perakende olarak satışa sunulan gıdalarda ve zehirlenen insan izolatlarında tespit edilmesi plazmidal kaynaklı *cpe* (+) izolatlarının gıda zehirlenmelerindeki rolünün desteklenmesi açısından önemini arttırmıştır (123, 124, 125).

*C. perfringens* tip A gıda zehirlenmeleri genellikle toplu yemek pişiren yerlerde yüksek sayıda insanın etkilendiği salgınlar şeklinde ortaya çıkar (126). Okul, hastane, kantin, yemekhane vb. gibi çok fazla kişiye sunulmak üzere büyük miktarlarda hazırlanan veya büyük parçalar halinde pişirilen et ve kanatlı etleri bu tip bir zehirlenmenin oluşumuna önemli bir kaynak teşkil etmektedir (33). *cpe* (+) *C. perfringens* tip A ile kontamine olan gıda maddelerinin 10-54 °C arasında tutulması veya servis edilmesi bu mikroorganizmanın gelişmesi için uygun bir ortam oluşturur ve zehirlenmelerin ortaya çıkmasında ciddi bir katkı sunar (127). Yüksek miktarlarda alınan vejetatif hücre mide bariyerinin geçtikten sonra bağırsaklarda sporlanma sırasında CPE toksinini üreterek bağırsak lumenine bırakır. Semptomlar 8-12 saat içinde abdominal kramplar ve diyare şeklinde görülür. Genellikle semptomların 24 saat içinde ortadan kalktığı zehirlenme durumlarında risk grubunda bulunan yaşlı bireylerde bazen ölümlerle sonuçlanabilmektedir (105).

#### **3.4.2. Antibiyotik İlişkili Diyare ve Sporadik Diyare**

Gıda kaynaklı olmayan plazmidal *cpe* (+) *C. perfringens* tip A'lar tarafından oluşturulan antibiyotik kullanımıyla ilişkili hastalık durumudur. Bu tip ve özellikteki izolatlar insanlarda antibiyotik ilişkili diyarelere (AAD) ve sporadik diyarelere (SD) neden olurlar (25). Antibiyotik ilişkili diyareler (AAD); penisilin,

trimethoprim ya da sefalosporin gibi antibiyotiklerin alınmasından sonra gelişirken sporadik diyareler ise herhangi bir antibiyotiğin kullanımı sonrası oluşabilmektedir (128). Oluşan hastalık birkaç hafta veya aylarca sürebilen sulu ve/veya kanlı diyare şeklindeki semptomlar ile seyreder (129).

Plazmidal *cpe* (+) *C. perfringens* tip A normal bağırsak florasında bulunan *cpe* (-) *C. perfringens* tip A türlerine konjugasyon yolu ile plazmidal *cpe*'yi aktararak normal bağırsak florasına adapte olabilirler. AAD ve SD vakalarından elde edilen izolatların plazmidal *cpe* (+) *C. perfringens* olduğu ve bu izolatların bir kısmının  $\beta_2$  toksinini kodlayan *cpb2* gen bölgesini içerdiği, bununda hastalığın patogeneziğine katkı sağlayabileceği belirtilmektedir (130).

### 3.4.3. Ani Bebek Ölümü Sendromu

Etiyolojik nedenleri kalıtsal, gelişimsel veya çevresel faktörler gibi birden fazla faktöre bağlı olarak gelişen ani bebek ölümü sendromu yüksek oranda bebek ölümlerine neden olan hastalıklar arasındadır. *C. perfringens* enterotoksini (CPE) gibi bakteriyal toksinler ani bebek ölümü sendromunun etiyojisinde rol oynayabilmektedir. CPE üreten *C. perfringens* tip A türlerinin bebek bağırsaklarında yaygın bulunduğu ve bu toksinin bağırsaklarda üretimi ve sistemik emiliminin ani bebek ölümü sendromuna bağlı hızlı ölümlerin ortaya çıkmasında önemli olduğu vurgulanmaktadır (69).

Ani bebek ölümü sendromu ile CPE üreten *C. perfringens* tip A arasındaki bağlantı bilinmesine rağmen ani bebek ölümü sendromu ile *cpe* suşlarının ilişkisi ile ilgili pek çalışma bulunmamaktadır. Finlandiya'da yapılan bir araştırmada % 24 oranında ani bebek ölümü sendromuna bağlı ölen bebeklerin bağırsaklarında plazmidal *cpe* (+) *C. perfringens* tip A tespit edildiği bildirilmiştir (69). Aynı

araştırmada sağlıklı bebeklerin dışkılarında herhangi bir *cpe* (+) *C. perfringens* izolatına rastlanmadığı, bunun da plazmidal *cpe* (+) *C. perfringens* tip A'nın hastalığın etiolojisindeki rolünün açıklanmasına önemli bir katkı sağladığı belirtilmiştir.

#### **3.4.4. *C. perfringens* tip C'nin Sebep Olduğu Gıda Zehirlenmesi**

*C. perfringens* tip C tarafından sentezlenen beta ( $\beta$ ) toksin, “enteritis nekrotikans” veya “pigbel” olarak adlandırılan çoğunlukla ölümcül olan bir gıda zehirlenmesine neden olur. Gelişmekte olan bazı ülkeler de görülmekle birlikte II. Dünya Savaşı sonunda Almanya'da zehirlenmelere neden olduğu bildirilmiştir (33). Yeni Gine'de geleneksel domuz eti yeme festivali sonrası genç ve yetişkin insanlarda görülen bu hastalık pigbel olarak da adlandırılır. Normalde proteolitik enzimler veya pişirme ile inaktif hale gelen toksin bu koşulların engellendiği veya yetersiz kaldığı durumlarda hastalık oluşturur. Bu hastalık çoğunlukla  $\beta$  toksin üretiminden kaynaklanmakta olup  $\delta$  toksin ve  $\theta$  toksinin de katkı da bulunduğu bildirilmektedir (98). Söz konusu toksinler *C. perfringens* tip C'nin vejetatif forma geçmesi ile birlikte salgılanır. Zehirlenmenin oluşmasında yetersiz hijyen, düşük düzeyli proteinli gıdaların alınması sonucu ince bağırsakda proteolitik enzimlerin düşük yoğunlukta bulunması (tripsin gibi pankreatik enzimlerin miktarını düşürerek) veya tripsin inhibitörü salgılayan askaris enfestasyonları gibi birden fazla faktör rol oynar. Toksin bağırsak villuslarının yıkılmasına neden olur ve hemorajik nekroza bağlı ani başlayan şiddetli abdominal sancı, kanlı ishal, kusma ve bazen 24 saat içinde ölümlerle seyreder (131).

### 3.5. *C. perfringens*'in Epidemiyolojisi

#### 3.5.1. *C. perfringens*'in İnsidansı

*C. perfringens* dünyada önemli bakteriyal nedenli gıda kaynaklı zehirlenmeler arasında yer alır ve birçok salgın restaurant gibi toplu yemek tüketiminin yapıldığı yerlerde oluşur.

Etkene bağlı gıda zehirlenme salgınlarının başında ısıya dirençli *C. perfringens* sporlar yer alır (20). Ancak ısıya duyarlı sporlarında gıdaların pişirilmesi sırasında canlı kalabildiği ve gıda zehirlenmelerine neden olabileceği belirtilmektedir (132,133,134). Gıda kaynaklı zehirlenmelere neden olan gıdalarda *C. perfringens*'in sayılabilir düzeyi ortalama  $10^5$  kob/g ( $10^3$ - $10^8$  kob/g) olup *C. perfringens*'den kaynaklanan gıda zehirlenmesinin en sık görülen semptomu diyaredir (135,136,137). *C. perfringens* zehirlenmelerinden çoğunlukla 65 (% 70) yaş ve üstündeki kişiler etkilenirken 15-64 yaş arasında bu oran % 20 kadardır.

*C. perfringens* 1990 yılında bir hapisanede “taco” olarak adlandırılan meksika yemeğinin tüketilmesi sonrası 700 kişinin zehirlenmesi ile sonuçlanan önemli bir salgınla dikkati çekmiştir (138). ABD’de 1983-1997 yılları arasında 121 salgına bağlı 9316 vakada toplam 13 kişinin öldüğü, 1993 yılında “Saint Patric’s Günü” (Saint Patrick’i onurlandırmak için kutlanan bir İrlanda bayramı) kutlamaları sırasında ısıtılmış sığır konservelerinin tüketilmesine bağlı toplam 242 kişinin zehirlendiği bildirilmiştir (139, 140). Ayrıca CDC istatistikleri 1998’den 2002’ye kadar olan süre içinde 4 ölümlü sonuçlanan 6.742 *C. perfringens* kaynaklı zehirlenme vakasının meydana geldiğini bildirmiştir (141). Doğrulanmış salgınlar bakımından *C. perfringens*; *Salmonella* ve *Staphylococcus aureus*’tan sonra üçüncü, vakalar açısından ise ikinci sırada yer

almaktadır. Bununla birlikte vakaların önemli bir kısmının rapor edilmediği göz önünde bulundurulduğunda gerçek vaka sayısının tahmin edilenden daha yüksek olduğu söylenebilir. Yalnızca Amerika’da her yıl tahminen 250.000-625.000 arasında *C. perfringens* tip A gıda kaynaklı zehirlenmenin meydana geldiği ve bunun yaklaşık maliyetinin 123 milyon dolar olduğu belirtilmektedir (142).

*C. perfringens*’in orta şiddette, kendini sınırlayan bir hastalığa yol açması ve ülkeler arasındaki izleme programlarının farklılık göstermesi bildirilen vaka sayısının beklenenden daha düşük olmasına, bunun da etkenin hem ülkeler bazında hem de dünyada gerçek insidans düzeyinin bilinmesini engelleyen bir faktör olduğu göz önünde bulundurulmalıdır (142). Örneğin, İngiltere ve Galler’de bildiri zorunlu bir hastalık olan *C. perfringens*’e bağlı 1983-1993 tarihleri arasında ortalama her yıl 53 salgın (1156 vaka) rapor edilirken ABD’de neredeyse bunun 5 katı olmasına rağmen bildiri zorunlu bir hastalık olarak kabul edilmemektedir (142).

### **3.5.2. Çevre, İnsan ve Gıdalarda Varlığı**

Ubiquiter özellikte olan *C. perfringens*’in sporlu bir mikorganizma olması çevresel koşulların uygun olmadığı durumlarda dahi varlığını devam ettirebilmesine imkan verir. Etkenin birçok hayvan türü ile insan bağırsak florasının bir parçası olması dağılımı açısından önemlidir. *C. perfringens* yönünden favori gıdalar özellikle protein bakımından zengin kırmızı et ve ürünleri ile kanatlı eti ve ürünleridir. Ancak etken deniz ürünlerinde, baharatlarda, süt ve süt ürünleri, dehidre gıdalar (çorba) ile salatalarda da bulunabilmektedir (143). Ayrıca sucuk, sosis, salam gibi kürlenmiş veya ısı işlem görmüş baharatlı et ürünleri de bu etkeni içerebilmektedir (144, 145).

### 3.5.2.1. Çevrede Varlığı

Toprak florasının bir parçası olan *C. perfringens* tip A hemen hemen incelenen her gram toprak örneğinin tamamına yakınında ve yaklaşık  $10^3$  kob/g düzeyinde bulunmakta (146). *C. perfringens* B, C, D ve E tipleri obligat özellikte olup çoğunlukla evcil hayvanlarda bulunmakla birlikte bu tip *C. perfringens*'lerin rekabetçi yeteneklerinin az olmasından dolayı toprakta bulunmaları küçük bir olasılıktır. Ayrıca etken deniz sedimentlerinin bir parçası olmamakla birlikte düşük miktarlarda dahi olsa tespit edilebilmekte ve bu durum muhtemel fekal kaynaklı kirliliğin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (146). Japonya'nın Aichi kentindeki deniz ve nehir sularında yapılan bir çalışmada 15 deniz suyu örneğinin 14 (% 93)'ünde ve 5 nehir suyu örneğinin tamamında (% 100) *C. perfringens* saptanmıştır (147).

Aschfalk and Muller (148), Norveç'in kuzey kıyısı boyunca inceledikleri Atlantik morina balığına ait 97 dışkı örneğinin 37 (% 38.9)'sinde *C. perfringens* varlığına, PCR ile *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA*, *cpb2*, *cpe* genleri yönünden inceledikleri izolatların tamamının tip A ve *cpa* genine sahip olduğu, yalnızca ikisinde *cpb2* genini tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar *cpb2* gen varlığının bulunmasını domuz çiftliklerine ait kanalizasyon sistemlerinin suya karışmasından dolayı kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir.

McKillop (149), hastane mutfak tozu örneklerinde *C. perfringens* varlığını tespit etmek için yaptıkları araştırmalarında etkenin % 90'lar düzeyinde bulunabileceğini bildirmiştir.

Hobbs ve ark. (150), gıdaların hazırlandığı farklı alanlarda bulunan et sineklerinde *C. perfringens*'i izole ettiklerini bunun da *C. perfringens* için sineklerin potansiyel bir vektör olabileceğini bildirmişlerdir.

### 3.5.2.2. İnsanlarda Varlığı

Hayvan ve insanların normal bağırsak florasının bir parçası olan *C. perfringens* hemen hemen incelenen her hayvan barsağında bulunmakla beraber miktarı tür içinde veya türler arasında değişiklik gösterebilmektedir. Sağlıklı insanlarda *C. perfringens* düzeyi diğer anaerop mikroorganizmalara göre düşük olmakla birlikte incelenen insan bağırsak örneklerinin tamamına yakınından izole edilebilmektedir (151). Bebeklerde ise *C. perfringens* düzeyi ancak 6 aylık olduklarında erişkin insan seviyesine ulaşır. *C. perfringens* sayısı insan dışkılarında geniş bir varyasyon gösterir. Sağlıklı bir insanda her gram dışkıda  $10^3$ - $10^5$  spor iken *C. perfringens*'e bağlı zehirlenme durumlarında bu sayı  $10^6$ - $10^8$  spora kadar ulaşabilmektedir (151).

Tayvan'da yapılan bir araştırmada herhangi bir gastrointestinal sistem hastalık belirtisi göstermeyen 50 kişiden alınan dışkı örneğinin 30 (% 60)'unda *C. perfringens* tespit edildiği ve spor sayısının  $5 \times 10^1$  ile  $2.5 \times 10^8$  kob/g arasında değiştiği, yalnızca üç *C. perfringens* izolatının *cpe* (+) olduğu bildirilmektedir (152).

Heikinheimo ve ark. (153), gıda işletmesinde çalışan 136 sağlıklı personelin dışkısından % 18 oranında tespit ettikleri *cpe* (+) *C. perfringens*'lerin % 3.7'sinin plazmidal IS1151-*cpe*, % 2.9 plazmidal IS1470 benzeri *cpe*, % 0.7 kromozomal IS1470-*cpe* ve % 1.5 ise bilinmeyen *cpe* genotipi olduğunu bildirmişlerdir.

Sparks ve ark. (117), Kuzey Amerika’da antibiyotik ilişkili diyare ve gıda zehirlenmesi sonucu hastalanan kişilere ait dışkılarından izole ettiği 34 *cpe* (+) *C. perfringens*’in antibiyotik ilişkili diyare ile ilgili olan izolatların tamamının plazmidal *cpe*, gıda zehirlenmeleri ilişkili izolatların ise kromozomal *cpe*’ye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

### 3.5.2.3. Kırmızı Etlerde Varlığı

Özellikle kesim aşamasındaki hijyenik koşulların yeterli olmayışına bağlı olarak dışkı veya bağırsak içeriğinin neden olduğu kontaminasyonlarda kırmızı et ve ürünlerinin önemli bölümü yüksek düzeyde *C. perfringens* ile kontamine olabilmektedir. Miwa ve ark. (154), sığır, domuz ve tavuk bağırsak içeriklerinde yaptıkları bir çalışmada 50 sığır örneğinin 38’inden (% 76.0), 50 domuz örneğinin 22’sinden (% 44.0) ve 50 tavuk örneğinin 40’ından (% 80.0) *C. perfringens* izole etmişlerdir. Miki ve ark. (155), Japonya’da satışa sunulan 35 adet sığır etinin % 54.3 (19)’ünde ve 22 sığır kıymasının % 86.4 (19)’ünde *C. perfringens* saptamışlardır.

Türkiye’de yapılan bir çalışmada, Ankara ilinin değişik semtlerindeki market ve kasaplardan toplanan 80 sığır kıymasının 52 (% 65.0)’sinin  $0.30-1.5 \times 10^1$  EMS/g arasında *C. perfringens* ile kontamine olduğu saptanmıştır (156).

İngiltere Gıda Standartları Ajansı (Food Standarts Agency) sığır, kuzu ve domuz etinde yüzey kontaminasyon düzeyinin belirlenmesi amacıyla Mart 2006-Haziran 2007 tarihleri arasında yaptıkları analizlerde toplam 3.249 sığır eti yüzey örneğinin 489 (% 15.1)’unda, 1.693 domuz eti yüzey örneğinin 61 (% 3.34)’inde ve 1.056 kuzu eti yüzey örneğinin 55 (% 5.20)’inde *C. perfringens* tespit edildiği

ve örneklerin hiçbirinin  $10^4$  kob/et örneğini geçmediği yalnızca birinin  $10^3$  ile  $10^4$  kob/et arasında olduğunu bildirmiştir (157).

#### **3.5.2.4. İşlem Görmüş ve Kürlenmiş Et Ürünlerinde Varlığı**

Salam, sosis gibi işlenmiş et ürünlerinde *C. perfringens* izolasyonu işlenmemiş etlere göre çoğunlukla daha yüksek olabilmektedir. Bunun nedeni işlenmiş et ürünlerinde kullanılan baharat gibi gıda katkı maddeleri ile işleme sürecine bağlı muhtemel çapraz kontaminasyonların meydana gelmesi ve bunun sonucunda mikroorganizmalar ile daha fazla kontamine olabilmelerinden kaynaklanmaktadır.

Bauer ve ark. (158), süper marketlerde satışa sunulan 18 domuz sosisinin 7 (% 38.9)'sinde, Taormina ve ark. (159), 152 kürlenmiş veya önceden dilimlenmiş emülsifiye et örneğinin 74 (% 48.7)'ünde vejetatif *C. perfringens* tespit ederken 152 örneğin sadece 8 (% 5.2)'inde  $2 \log_{10}$  kob/g düzeyinde *C. perfringens* sporu tespit etmişlerdir.

Atwa ve Abou EI-Roos (160), Mısır'da satışa sunulan sığır etinden yapılmış 25 sosisin 17 (% 68)'sinin, 25 et köftenin 13 (% 52)'ünün ve 25 sığır hamburger etinin 15 (% 60)'inin *C. perfringens* ile farklı düzeylerde kontamine olduğunu ve bunlardan elde edilen 6 izolatin fare testlerine göre enterotoksin (CPE) üretebilme yeteneğinde olduğunu belirlemişlerdir.

#### **3.5.2.5. Kanatlı Eti ve Ürünlerinde Varlığı**

Değişik araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda kanatlı eti ve ürünlerinin *C. perfringens* ile önemli düzeyde kontamine olabileceği belirtilmiştir. Nasr ve ark. (161), Mısır'da bakkal ve büyük marketlerde topladığı 113 tavuk eti

ve ürününün 31 (% 27.4)'inde, Saito (147), 68 tavuk eti örneğinin 16 (% 24)'sında, Fukushima ve ark. (162), 120 tavuk etinin 13 (% 10.8)'ünde *C. perfringens* saptamıştır.

ABD Tarım Bakanlığı Gıda Güvenliği ve Kontrolü Servisi (USDA/FSIS) tarafından yapılan bir araştırmada, Ocak-Mart 1995 ve Eylül-Kasım 1995 tarihlerini kapsayan soğuk aylarda hindi kıymalarında yapılan örneklemelede 296 örneğin 82 (% 28.1)'sinde *C. perfringens* izole edildiği bildirilmiştir (163).

Guang-Hua ve Xia-Ling (164) yaptıkları bir araştırmada, Pekin'de tüketime sunulan 16 piliç karkasının 14 (% 88)'ünde ve 10 kızartılmış tavuk örneğinin 2 (% 20)'sinde *C. perfringens*'i izole etmişlerdir.

ABD'nin Massachusetts eyaletinde yapılan bir çalışmada marketlerde satışa sunulan kanatlı etlerinden alınan örneklerde % 26 oranında *C. perfringens*'in izole edildiği ve hindi etlerininin 42.7 EMS/g düzeyinde *C. perfringens* ile kontamine olduğu bildirilmiştir (165). ABD'nin Pittsburgh kentinde kasap ve marketlerde satışa sunulan hindi etlerinin % 28'inde ve tavuk etlerinin % 38'inde *C. perfringens* saptanmıştır (166).

### **3.5.2.6. Gıdalarda *C. perfringens* Toksin Gen Varlığı**

Erol ve ark. (167), hindi eti örneklerinden izole ettikleri 22 *C. perfringens* izolatını *cpa*, *cpb*, *cpb2*, *etx*, *iA* ve *cpe* toksin genleri yönünden multipleks PCR ile incelemişlerdir. İzolatlarda *cpa* dışında diğer toksin genlerinin bulunmadığını bildirmişlerdir.

Miki ve ark. (155), Japonya'da satışa sunulan 142 et örneğinin % 71'inin *C. perfringens* ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir. Et örneklerinden elde edilen toplam 212 *C. perfringens* izolatının tamamının tip A ve *cpa* pozitif,

% 2'sinin ise *cpe* (+) olduğu, *cpe* (+) olan izolatlarda *cpe*'nin plazmit üzerinde bulunduğu tespit etmişlerdir.

Arjantin'de yapılan bir araştırmada, 515 et örneğinden (315 taze sosis, 100 hamburger ve 100 kıyma) elde edilen 126 *C. perfringens* izolatının 123 (% 97.2)'ünün tip A, 2 (% 1.6)'sının tip C, 1 (% 0.79)'inin tip E, 9 (% 7.1)'unun enterotoksijenik tip A olduğu saptanmıştır (168).

Lin ve Labbe (165), ABD'de satışa sunulan 131 gıda örneğinin 40 (% 30.5)'inde *C. perfringens* tespit ettikleri çalışmalarında 40 izolatın *cpe* ve *cpa* genleri yönünden pozitif olduğunu bildirmiştir (165).

Singh, Bhilegaonkar ve Agarwal (169), 70 buffalo, 70 keçi ve 71 kanatlı eti olmak üzere farklı hayvan türlerine ait toplam 211 et örneğinin sırasıyla 46 (% 65.7), 64 (% 91.4) ve 50 (% 70.4)'sinin *C. perfringens* ile kontamine olduğunu ve 32 buffalo, 37 keçi ve 45 kanatlı etinde tespit edilen toplam 114 izolatın *cpe* gen varlığı yönünden 364 bp'lik primer çifti kullanılarak yapılan PCR analizlerine göre % 9.3, % 32.4 ve % 15.5 oranında pozitif olduğunu bildirmişlerdir.

### **3.6. *C. perfringens*'in Tespiti**

#### **3.6.1. Kültür Yöntemi ile Tespiti ve İdentifikasyonu**

*C. perfringens*'in gıda kaynaklı zehirlenmelere neden olabilmesi için gıda içerisinde yüksek sayıda bulunma zorunluluğu zehirlenme vakalarında şüpheli gıda veya dışkı materyallerine zenginleştirme (enrichment) işleminin uygulanmasını gereksiz hale getirmektedir. Bundan dolayı *C. perfringens*'e bağlı salgınlarda yüksek etken sayısı iyi bir indikatör olmakla birlikte kantitatif sayım epidemiyolojik bir değerlendirme için yeterli değildir. Dışkıda enterotoksin varlığı veya şüpheli gıda ve dışkı materyallerinde *cpe* (+) *C. perfringens* tip A tespitinin

toplam *C. perfringens* sayısının tespitinden daha değerli olacağı göz önünde bulundurulmalıdır. *C. perfringens* sayısının düşük olduğu şüpheli materyallerde Rapid Perfringens Medium (RPM), Perfringens Enrichment Medium (PEM) gibi zenginleştirme sıvı besiyerlerinden yararlanılır (170, 171). Bu besiyerleri aynı zamanda en muhtemel sayı (EMS) yöntemine göre yapılacak analizler içinde ideal ortam sağlar. Etkenin soğuga ve dondurma işlemine karşı duyarlılığından dolayı analizi yapılacak materyallerin uzun süre bu tip ortamlarda bekletilmesi uygun değildir. Şayet örnekler böyle ortamlarda bekletilecek ise gliserol ile muamele edilmesi önerilir (172).

*C. perfringens*'in gıda, çevre ve insan örneklerinden izolasyon ve identifikasyonu amacıyla birçok kültür ortamı kullanılabilir. Gıda veya dışkıdan *C. perfringens*'in direk sayımı için katı besiyerine göre ekim yöntemi gerçekleştirilir. Sülfid indirgeyen clostridiaların tespitinde kullanılan katı besiyerleri sülfid sülfide indirgeyerek siyah koloniler olarak görünen demir sülfid presipitatların oluşmasına göre tasarlanmıştır (171). Bu siyah renkli koloniler yalnızca *Clostridium*'lara özel olmayıp *Salmonellae*, *Proteus*, *Escherichia freundii*, *Citrobacter* spp., *Erwinia*, *Flavobacterium* ve *Achromobacter* gibi bakteriler tarafından da oluşturulabilir (173). Ancak *C. perfringens* için kullanılan besiyerlerine ilave edilen antibiyotikler diğer sülfid indirgeyen ve indirgemeyen anaerobik mikroorganizmaların gelişimini baskılayarak *C. perfringens*'in gelişimini destekler. Bundan dolayı birçok besiyeri siyah koloni oluşturabilme ve seçicilik özelliğine göre değerlendirilerek kullanılmaktadır. Kullanılan besiyerlerinin çoğu benzer içeriğe sahip olup farklı antibiyotik tipleri (sulfadiazine, polymyxin, kanamycin veya cycloserine vb.) ilave edilerek

kullanılır (171). Ancak yapılan araştırmalar bu besiyerlerinin *C. perfringens* dışında diğer sülfit indirgeyen mikroorganizmaların da gelişimini destekleyebilecek nitelikte olduğunu göstermektedir. Bundan dolayı bu tip besiyerlerinde üreyen siyah kolonilerin *C. perfringens* yönünden doğrulanması gerekir.

Günümüzde *C. perfringens* tespiti ve sayımı için en yaygın kullanılan metotlar; Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Uluslararası Standartlar Örgütü (International Organization for Standardization; ISO), ABD Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration; FDA/BAM) veya İskandinav Gıda Analizleri Komitesi (Nordic Committee on Food Analysis; NMKL) tarafından önerilen yöntemlerdir (174-177). Bu standartlardan İskandinav Gıda Analizleri Komitesi (NMKL) *C. perfringens* tespiti için TSC agarda üreyen şüpheli kolonilere Gram boyama, kanlı agarda hemoliz oluşturma, laktozu fermente etme ve hareket testlerinin uygulanmasını önermektedir (177). Ticari bir biyokimsal test kiti olan API sistemi ile *C. perfringens*'in identifikasyonu hızlı, güvenilir ve pratik bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir (26). *C. perfringens* tarafından üretilen toksinlerin geleneksel metotlarla tespitinde spesifik antiserumlar ile şüpheli toksinin nötralizasyonu veya toksin-antiserum karışımının enjeksiyon ile laboratuvar hayvanlarına verilmesiyle gerçekleştirilmektedir. Bunların dışında *C. perfringens* toksinlerinin tespitinde ELISA veya RPLA gibi serolojik testlerden de faydalanılabilmektedir (137, 168).

### 3.6.2. *C. perfringens*'in Moleküler Yöntemlerle Tespiti

#### 3.6.2.1. PCR ile Tespiti

PCR, DNA'nın bir bölümünün in vitro koşullarda çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir. PCR ile klinik, gıda veya çevre materyallerinden elde edilen *C. perfringens* izolatlarının kesin tespiti hızlı ve güvenilir bir şekilde yapılabilmektedir (178). Bir izolatın *C. perfringens* olup olmadığının belirlenmesi tüm *C. perfringens* (A-E) tiplerinde ortak gen olan *cpa* varlığına göre yapılmaktadır. Ancak ubiquiter özellikte olan *C. perfringens*'in yalnız *cpa* gen varlığına göre değerlendirilmesi yeterli değildir ve diğer toksin genleri (*cpa*, *cpb*, *etx*, *iA*, *cpe* ve *cpb2*) yönünden incelenmesi gereklidir. Bu amaçla günümüzde *C. perfringens* toksin genlerine (*cpa*, *cpb*, *etx*, *iA*, *cpe* ve *cpb2*) özgü birçok PCR protokolü bulunmaktadır.

Fach ve Popoff (179), gıda ve biyolojik materyallerde enterotoksijenik *C. perfringens* türlerinin tespiti amacıyla geliştirdikleri dubleks PCR protokolünde *cpa* gen bölgesi için 283 bp, *cpe* gen bölgesi için ise 426 bp'lik bir bölgeyi çoğaltmışlardır. Aynı çalışmada, gıda kaynaklı salgınlardan izole edilen 24 *C. perfringens* izolatının tamamında *cpa*, 7'sinde ise *cpe* genini saptamışlardır.

Et örneklerinde *cpe* (+) *C. perfringens* tespiti için en muhtemel sayı yöntemi (EMS) ile nested PCR yöntemini kombine ederek analiz eden Miwa ve ark. (154) katı besiyerindeki mikroorganizma sayısı (kob/g) ile metot arasında yakın bir ilişkinin olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı araştırmada analiz edilen 50 tavuk eti ve 50 kırmızı etin sırasıyla % 12 ve % 2 *cpe* (+) *C. perfringens* ile kontamine olduğunu tespit edilmiştir.

Meer ve Songer (180), *C. perfringens*'in toksin genlerine göre tiplendirilmesi için birden fazla primer çiftinin kullanılarak tek reaksiyonda birçok hedef bölgenin aynı anda çoğaltılması işlemi olarak bilinen bir multipleks PCR protokolü geliştirmiştir. Bu protokole göre *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA*, ve *cpe* genlerine spesifik primerleri kullanarak tek bir reaksiyonda *C. perfringens*'i A'dan E'ye kadar tiplendirdiklerini bildirmişlerdir.

Daha sonra *C. perfringens cpb2* geni için tasarlanan primerlerin eklenmesiyle etkenin multipleks PCR yöntemi ile laboratuvar tespitini ve toksin tiplendirilmesi kolaylaştırmıştır (181). Garmory ve ark. (181), tay, kuzu ve domuz yavruları gibi farklı hayvan türlerinden elde ettikleri *C. perfringens* izolatlarını farklı primerler kullanarak alfa, beta, epsilon ve iota toksin genleri ile *cpb2* ve *cpe* genlerinin tespitini amaçlayan araştırmalarında multipleks PCR protokolü ile başarılı bir şekilde elde edilen izolatları tiplendirdiklerini bildirmişlerdir.

Augustynowicz ve ark. (182), Polonya'da izole ettikleri *C. perfringens* türlerinin genotipik profillerinin belirlenmesi amacıyla kullandıkları multipleks PCR protokolünde alfa, beta, epsilon ve iota toksinleri için yeni primerler dizayn etmişlerdir. Protokolün duyarlılığı saf kültürden elde edilen DNA için 200 fg (femtogram,  $10^{-15}$  g), toksinin fenotipik ve genotipik profilinin % 94 oranında benzer olduğunu bildirmişlerdir.

Baums ve ark. (183), kaynatma yöntemine göre ekstrakte ettikleri *C. perfringens* izolatlarına ait DNA'ların, *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA*, *cpe* ve *cpb2* genlerinin belirlenmesi amacıyla multipleks PCR için kullanılabileceğini ve etkin, hızlı bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir.

Heikinheimo ve Korkeala (184), broiler tavuklarda *C. perfringens*'i *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA*, ve *cpe* toksin genleri yönünden incelemek için kullandıkları multipleks PCR yönteminde 118 izolatın tamamında *cpa* pozitif iken hiçbirinde *cpb*, *etx*, *iA* ya da *cpe* genlerini tespit edememişlerdir.

Schoepe ve ark. (185) et örneklerinde enterotoksijenik *C. perfringens*'in multipleks PCR ile belirlenmesi amacıyla geliştirdikleri protokolde *cpe* geni için 329 bp ve 421 bp olmak üzere iki farklı primer çifti ile *cpa* geni için 775 bp uzunluğunda primer çiftini internal kontrol olarak kullanmışlardır. Protokolün zenginleştirme işlemi uygulanmayan et örneklerinde tespit limitinin  $3 \times 10^5$  kob/g düzeyinde olduğunu ifade etmişlerdir.

### 3.6.2.2. Real Time PCR ve Mikroarray Teknolojileri

PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemi olan real time PCR günümüzde patojenlerin tespitinde, gen ekspresyonu, mutasyon analizi, miktarsal gen analizi gibi çok farklı amaçlar için kullanılabilir.

*C. perfringens* toksin tiplerinin tanımlanması için geliştirilen real-time multipleks PCR yöntemi ile kromozom kaynaklı alfa toksin ve plazmit kaynaklı toksin genlerin kopya sayısının miktarı belirlenebilmektedir. *C. perfringens*'in diagnostik açıdan daha hızlı tespiti amacıyla Albini ve ark. (186), üç real time fluorojenik boya kullanarak (TaqMan®) *C. perfringens* alfa, beta, beta2, epsilon, entero ve iota toksin genlerini hızlı, doğru ve gerçek zamanlı olarak real time multipleks PCR yöntemi ile tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarında prob boyası olarak FAM/TAMRA, Cy-5/ BHQ-2 ve VIC/TAMRA

kombinasyonu, internal pozitif kontrol olarak da kromozom kaynaklı alfa toksin genini kullanmışlardır.

Gurjar ve ark. (187), *C. perfringens* alfa (*cpa*), beta (*cpb*), iota (*iA*), epsilon (*etx*), beta2 (*cpb2*) ve enterotoksin (*cpe*) genlerini çift işaretli flüoresan hibridizasyon probu (TaqMan®) ile real-time multipleks PCR yöntemini kullanarak başarılı bir şekilde belirlediklerini ve altı toksin genine göre yöntemin tespit sınırının 5-70 pg DNA kadar olduğunu bildirmişlerdir.

Mikroarray yöntemi, binlerce spesifik DNA ve RNA sekansını eş zamanlı olarak ve 1-2 santimetrekarelik küçük bir cam ya da silika lam üzerinde incelemeye yarar. Çok hızlı bir analiz yöntemi olmasına karşın bir takım dezavantajları vardır. Kullanılan malzemelerin pahalı ve özel donanım gerektirmekte ayrıca uzmanlık isteyen bir teknolojidir. Günümüzde yeni gelişmekte olan mikroarray'in araştırma ve tanısal amaçlı kullanımı gittikçe yaygınlaşmaktadır (188).

Al-Khaldi ve ark. (189), 17 *C. perfringens* izolatının toksin tiplendirilmesi amacıyla kullandıkları çoklu mikroarray yönteminde, bu izolatların 16'sını *cpa* ve *cpe* genleri yönünden pozitif bulmuşlardır. Araştırmacılar *C. perfringens*'in toksin tiplendirilmesinde bu yöntemin spesifik ve duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

### **3.6.2.3. *C. perfringens*'in Genotipik Tiplendirilmesinde Kullanılan Yöntemler**

Mikrobiyal epidemiyolojik çalışmalarda izolatlar arasındaki yakınlık derecesini belirlemek önemli bir temel amaçtır. Tek bir türe ait izolatların yakınlık derecelerinin belirlenmesi amacıyla takip edilen prosese altiplendirme (subtyping) denir ve çoğunlukla tiplendirme (typing) olarak ifade edilmektedir.

Değişik kaynaklardan veya aynı kaynaktan değişik zamanlarda elde edilen aynı türden izolatları karşılaştırarak farklı kaynaklardan köken alan genomik olarak ilişkisiz izolatların birbirinden ayrılmasını veya ortak bir atadan köken alan izolatlar arasındaki ilişkinin ortaya çıkarılması amacıyla kullanılan yöntemlerdir. Nükleik aside dayalı moleküler tiplendirmeler günümüzde en çok kabul gören metot olup DNA parmak izi (DNA fingerprinting), DNA'ya bağlı tiplendirme (DNA-based typing), genomik parmak izi (genomic fingerprinting), genotiplendirme (genotyping) veya DNA tiplendirilmesi (DNA typing) gibi değişik ifadelerle adlandırılmaktadır. Çoğu bakteriyal epidemiyolojik çalışmada bu yöntemeye dayalı bir yol izlenmektedir.

*C. perfringens* tip A tarafından oluşturulan gıda kaynaklı salgınlarda etkenin muhtemel kaynaklarının tespiti, hastalığın kontrol altına alınması ile hastalığın önlenmesi açısından hayati bir öneme sahiptir. Fenotipik ilişkiye bağlı tiplendirme metotlarının, etkenin benzer biyokimyasal özellikleri ve toksin tipinin tespit edilememesi gibi nedenlerden dolayı yetersiz kalması günümüzde yerini daha hassas ve güvenilir olan genetik tiplendirme metotlarına bırakmıştır. Epidemiyolojik çalışmalar için salgınlarda ve şüpheli materyallerde *C. perfringens* ayrımı için birçok moleküler teknik kullanılmaktadır. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), Restricted Fragment Length Polymorphism (RFLP), ribotiplendirme ve plazmit profil analizi gibi yöntemler amplifiye olmayan prosedürler içinde yer alırken, PCR, Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) ise amplifikasyon gerektiren yöntemler arasındadır (190).

Prob hibridizasyon yöntemleri kullanılmadan genomik restriksiyon fragmentlerinin basit bir şekilde gösterilmesi esasına dayanan PFGE genomik

DNA'nın çok büyük moleküler uzunluklara sahip parçalarının separasyonuna imkan sağlar. PFGE yöntemi, önceden restriksiyon enzimleri ile kesilen *C. perfringens* izolatlarına ait genomik DNA'ların jel elektroforez sisteminde yürütülerek her izolat için oluşan farklı parmak izi desenlerinin (5 fragmentten 15 fragmente kadar ve 10 kb'den 1000 kb'ye ulaşan büyüklükte) değerlendirilmesi esasına dayanır (190).

Malanska ve ark. (191), *SmaI* restriksiyon enzimini kullanarak *C. perfringens*'i PFGE yöntemine göre genotiplendirdikleri çalışmalarında 40-1.100 kb büyüklüğünde ve oldukça iyi dağılmış 11-13 kaliteli bant görüntüsü elde ettiklerini bu bakımdan *SmaI* restriksiyon enziminin ayırım gücünün tatmin edici düzeyde olduğunu bildirmişlerdir. Yazarlar aynı çalışmada yedi salgın ile kontrol suçundan oluşan toplam 62 izolatın 17'sinin farklı pattern oluşturduğunu, kendine özgü patternların epidemiyolojik açıdan ilişkisiz, aynı salgından etkilenen farklı bireylerin ise benzer ancak identik olmayan desenler (patternlar) oluşturduğunu saptamışlardır. Lukinmaa ve ark. (192), Finlandiya'da 1984-1999 yılları arasında meydana gelen 7 gıda kaynaklı *C. perfringens* salgınından elde edilen 47 izolatı *SmaI* ve *Apal* restriksiyon enzimlerini kullanarak PFGE yöntemine göre başarılı bir şekilde genotiplendirdiklerini bildirmişlerdir.

Birçok bakteride olduğu gibi yapısında plazmitleri bulunduran *C. perfringens*'in genetik tiplendirilmesinde plazmit profil analizinden yararlanılabilmektedir. Yöntem; *C. perfringens* izolatından plazmit DNA'sının ekstrakte edilmesi, restriksiyon enzimleri ile kesilmesi elektroforez ile görüntülenmesi ve sonra elektroforezde yürütülerek görüntülenmesi esasına dayanır. Eisgruber ve ark. (193), *C. perfringens* kaynaklı üç gıda zehirlenme

vakasından elde edilen gıda ve klinik izolatların plazmit profillerin identik olduğunu bildirmişlerdir. Schalch ve ark. (194), plazmit profil analizi, PFGE ve ribotiplendirme yöntemlerini karşılaştırmak amacıyla 10 gıda salgını (34 gıda ve dışkı izolatu) ile 121 et ve gıdadan olmak üzere toplam 155 *C. perfringens* izolatının genotiplendirilmesinde üç yöntemde uygun olduğunu belirtmişlerdir. Ancak aynı araştırmacılar ribotiplendirme ile PFGE'nin yorumlanmasının plazmit profil analizine göre daha kolay olduğunu bildirmişlerdir.

RFLP'nin bir türevi olan ribotiplendirme, restriksiyon enzimleri ile kesilen *C. perfringens*'e ait kromozom DNA'sının ribozomal DNA (rDNA) problemleri kullanılarak restriksiyon fragment pattern'ların daha kolay ve daha tutarlı tespit edilmesidir. Schalch ve ark. (195), yedi yıllık bir süreyi kapsayan 10 gıda zehirlenme vakası ve salgınına ait 34 *C. perfringens* izolatının *EcoRI* ile muamelesinde 12 ribopattern belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar sekiz gıda zehirlenme vakası ve salgınında hem gıdadan hem de dışkı izolatlarından elde edilen ribotiplerin tamamının identik olduğunu bildirmişlerdir.

Kilic, Schalch ve Stolle (196), ticari olarak üretilen kıymadan izole edilen 111 *C. perfringens* izolatının ribotiplendirildiği çalışmalarında 107 farklı ribopattern belirlemişlerdir. Aynı çalışmada ayırım gücü indeksinin 0.99 olduğu ve sadece iki izolatın identik ribopattern oluşturduğu bildirilmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada; Almanya'da bir bakım evinde kıyma haline getirilmiş kalp etinin tüketilmesine bağlı 21 kişinin etkilendiği ve 2 kişinin öldüğu salgından elde edilen 17 *C. perfringens* izolatu *SmaI* enzimi kullanılarak PFGE yöntemine göre tiplendirilmiştir (197). Muhtemel DNase aktivitesinden dolayı

izolatların PFGE yöntemi ile tiplendirilemediği ancak ribotiplendirme yöntemi ile izolatların dört farklı grup içinde tiplendirildiği bildirilmiştir.

AFLP; genomik DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilerek bölge spesifik adaptörlerin bağlanması sonrası PCR'da restriksiyon fragmentlerinin amplifikasyonu ve amplifiye edilen fragmentlerin jel elektroforezinde görüntülenmesidir. McLauchlin ve ark. (198), inceledikleri yedi salgına ait 35 *C. perfringens* klinik ve gıda izolatının genotiplendirilmesinde AFLP'nin hızlı, duyarlı, tekrarlanabilirliği yüksek ve ayırım gücünün iyi olduğunu ifade etmişlerdir.

Sawires ve Songer (199), *C. perfringens* izolatlarının genotiplendirilmesinde Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat (MLVNTR) yöntemini kullanmışlardır. Araştırmacılar kullandıkları beş lokusun dördünü protein kodlayan gen bölgesinden oluşturmuşlardır. Kollajen benzeri proteini (collagen like protein) kodlayan gen bölgesine ait lokus için 507 bp, hyaluronidaz üretimini kodlayan *nagK* gen bölgesine ait lokus için yaklaşık 262 bp, ORF içinde yer alan *parB* lokusu için 433 bp, ferröz iyon transport protein B geni lokusu için 481 bp, beta alt ünitesinde riboflavin sentezleyen lokus için yaklaşık 200 bp'lik primerler kullanarak tekrarlayan lokusların haritalanması işlemini gerçekleştirmişlerdir. Toplam 112 *C. perfringens* izolatın MLVA genotiplendirme sistemine göre değerlendirildiği bu çalışmada beş VNTR lokusu için ayırım gücü indeks sayısının 0.995 olduğu bildirilmiştir (199).

Chalmers ve ark. (200), 11 farklı hayvan türünden izole edilen ve epidemiyolojik bakımdan ilişkisiz 54 *C. perfringens* izolatı ile önceden PFGE ile tiplendirilmiş 27 *C. perfringens* izolatına MLVT yöntemini uygulamışlardır.

Kromozomal DNA'nın kodlanmayan bölgelerindeki altı lokus için altı primer çifti kullanılan yöntemde 54 epidemiyolojik açıdan ilişkisiz izolatin 35'inde farklı MLVA tipi belirlenmiştir. PFGE ile daha önceden tiplendirilen 1 izolat dışında diğer PFGE tiplerinin MLVT sonuçları aynı olduğu bildirilmiştir. Nükleazların varlığı ve DNA degradasyonuna bağlı nedenlerden dolayı tiplendirilemeyen izolatların PFGE ile benzer ayırım gücüne sahip olan MLVT ile başarılı bir şekilde tiplendirilebileceği vurgulanmıştır.

### **3.7. Koruma-Kontrol**

Ubiquiter özellikte olan *C. perfringens*'in gıda zincirine birçok aşamada girebilmesinden dolayı çiflikten sofraya gıda güvenliği kapsamında gerekli tüm koşulların sağlanması diğer patojenlerde olduğu gibi bu patojen içinde hayati bir öneme sahiptir. *C. perfringens* kaynaklı gıda zehirlenmelerinin kontrolünde en önemli noktayı gıdaların hızlı bir şekilde soğutulması ve gıdaların ısıtılması sırasında gıdanın tamamında etkin bir ısıtma işleminin uygulanması oluşturur. Pişirme işlemi vejetatif *C. perfringens*'leri yıkımlarken sporlarını yıkımlayamaz ve yıkımlanabilmesi için konserve gıdalar için uygulanan sterilizasyon ısısına eş değer bir ısı gereklidir. Bundan dolayı gıda maddelerinin uygun bir şekilde soğutulma işlemi sporların jermantasyonu ve daha sonra hızla çoğalmasını önlemek için kritik bir öneme sahiptir. Özellikle gıdalarda tehlike zonu olarak bilinen 4-60 °C arasında soğutma işleminin hızla yapılmasına dikkat edilmelidir (201). Şayet yeterli bir soğutma işlemi gerçekleştirilememiş ise ürün tüketilmeden önce 70 °C ve üstünde bir sıcaklıkta tekrar ısıtılarak yüksek miktarlara ulaşan vejetatif *C. perfringens*'lerin yıkımlanması sağlanmalıdır. Yeniden ısıtma işleminde uygulanacak sıcaklık *C. perfringens* sayısını en aza (>10 hücre) indirecek düzeyde olmasına dikkat edilmelidir (202).

USDA/FSIS tarafından et ve tavuk ürünleri performans standartları rehberinde (letalite ve stabilizasyon için) işlenmiş et ve tavuk ürünlerinin 54.5 °C'den 26.6 °C'ye 1.5 saat içinde ve 26.6 °C'den 4.4 °C'ye 5 saat, kürlenmiş ürünlerde ise 54.5 °C'den 26.6 °C'ye 5 saat ve 26.6 °C'den 4.4 °C'ye 10 saat içinde soğutma sürecinin tamamlanması gerektiği belirtilmiştir (203, 204).

ABD Gıda ve İlaç Dairesi Perakende Koruma Bölümü (Division of Retail Food Protection) tüm gıdalar için 60 °C'den 21 °C'ye 2 saat ve 21 °C'den 5 °C'ye 4 saat olacak şekilde soğutma işleminin yapılmasını önermektedir. Servise hazır gıdalarda *C. perfringens* gelişimini engellemek amacıyla sıcak gıdaların 57 °C'nin üstündeki ısılarda bekletilmesi tavsiye edilmektedir (205).

Koruyucu maddeler gıda ürünlerinin daha uzun muhafaza edilmesi ve gıda güvenliğinin sağlanması açısından günümüzde yaygın bir kullanım alanı bulmuştur. *C. perfringens* gelişimini engelleyen sodyum nitrit, sodyum klorit, potasyum sülfat ve sodyum sülfat bu maddelerdendir. SLEB olarak adlandırılan sükroz laurate (GRAS statüsünde, stabilizer ve emülsifier), ethylenediaminetetraacetate (şelatif) ve butylated hydroxyl anisole (fenolik antioksidan) *C. perfringens*'in hem vejetatif hem de spor formları üzerine inhibisyon etkisi vardır (206, 207). USDA; Et ve et ürünleri ile kanatlı ürünlerinde GRAS (Generally recognized as safe) statüsünde olan sitrat ve laktat gibi antimikrobiyal maddelerin *C. perfringens*'in kontrolünde kullanılabileceğini önermektedir (208, 209).

Gıdalarda *C. perfringens*'in gelişimini inhibe etmenin başka bir yolu da *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius* subs. *salivarius*, *Lactococcus diacetylactis* ve *Enterococcus faecalis* gibi diğer mikroorganizmaların kullanılmasıdır (210-213).

Çok sayıda tüketilebilir bitki *C. perfringens*'in gıdalarda gelişimini engellemek amacıyla kullanılabilir. *Allium sativum* (sarmısak), *Capsicum annuum* (Şili biberi), *Lycopersicon esculentum* (domates) ve *Zingiber officinale* (zencefil) ekstraktları bunlar arasındadır. Günümüzde hem doğal hem de kuvvetli inhibitörük etkiye sahip olmalarından dolayı *Cassia obtusifolia* (sickle) tohumları, *Cinnamomum cassia* (cinnamon) sapı, *Coptis japonica* (Japanese goldthread), *Corydalis turschaninvi* ve *Astragalus membranaceus* kökleri gibi tıbbi bitkiler *C. perfringens* kontrolünde kullanılmaktadır (214).

*C. perfringens*'in vejetatif formu için iradyasyon tekniğinin etkili bir yöntem olduğu farklı gıda maddelerinde farklı ısı ve ortam koşullarına göre *C. perfringens*'in D değerinin 0.342 kGy'den 0.826 kGy'e kadar değiştiği bildirilmektedir (215). Uluslararası sağlık ve güvenlik otoriteleri tüm gıda maddelerinde uygulanması gereken maksimum dozun 10 kGy kadar olması gerektiğini belirtmektedirler. Bu da *C. perfringens* açısından düşünüldüğünde yaklaşık 12-29 log'luk bir düşüşe neden olacağı anlamına gelir.

## AMAÇ

Birçok ülkede ve Türkiye’de bildiri zorunlu gıda kaynaklı hastalıklar içerisinde yer almayan, üremesi için özel koşullara ihtiyaç duyulan *C. perfringens* bakterisinin izolasyonundan moleküler toksin tiplendirmesine kadar olan süreçte gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından tespit edilmesi etkenin güncel prevalansı ve potansiyel etkilerinin belirlenmesi açısından önemli bir katma değer sağlayacaktır. *C. perfringens*’in farklı sıcaklık ve gıda matrikslerinde yaşam kabiliyetinin ve davranışlarının değişen ve gelişen bilimsel birikim ve teknolojik gerçeklikler paralelinde incelenerek değerlendirilmesi gıda muhafaza tekniklerinin daha etkin bir şekilde kullanımına ciddi katkılar sağlayacaktır. Bu kapsamda, uygun olmayan kesim, muhafaza ve taşıma koşulları ile çapraz kontaminasyon gibi nedenlere bağlı kontamine olabilen tavuk parça etlerinde *C. perfringens* varlığının geleneksel izolasyon ve identifikasyon yöntemlerine göre belirlenmesi ve *C. perfringens* olarak tespit edilen izolatların multipleks PCR metoduna göre *cpa*, *cpb*, *cpb2*, *etx*, *iA* ve *cpe* toksin genleri yönünden moleküler tiplendirilmesi bu çalışmanın birinci amacını oluşturmaktadır.

Tavuk kanatları kesim prosesi ve anatomik özellikleri gereği *C. perfringens* gibi gıda kaynaklı patojenler ile daha fazla kontaminasyona maruz kalarak gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından risk oluşturabilmektedir. Gıda muhafaza yöntemleri arasında önemli bir yer tutan dondurarak muhafaza metodu günümüzde yaygın bir şekilde kullanılmakta ve vazgeçilmezleri arasında yer almaktadır. Düşük sıcaklıklara karşı duyarlılığının yüksek olması ile bilinen *C. perfringens*’in farklı dondurma sıcaklıklarında tavuk kanatlarındaki yaşam kabiliyetinin araştırılması bu çalışmanın diğer bir amacını oluşturmaktadır.

## 4. GEREÇ ve YÖNTEM

### 4.1. Gereç

Tavuk parça etlerinde (bagnet, göğüs, kanat, but) *C. perfringens*'in kültür yöntemi ile tanımlanması ve multipleks PCR yöntemi ile toksin genlerine göre tiplendirilmesi için Mayıs 2011-Ağustos 2011 tarihleri arasında Elazığ ilinde çeşitli market, şarküteri ve kasaplarda satışa sunulan taze tavuk but (n: 50), göğüs (n: 50), kanat (n: 50) ve bagnet (n: 50) olmak üzere toplam 200 örnek materyal olarak kullanıldı. Örnekler aseptik koşullarda steril numune alma poşetleri içerisine alınarak en kısa sürede ortam sıcaklığında laboratuvara getirildi ve hemen analizlerine başlandı.

Farklı dondurma sıcaklıklarının *C. perfringens*'in yaşam kabiliyeti üzerine etkisinin belirlenmesi için piyasada satışa sunulan deri ve kemiklerinden ayrılmamış yaklaşık 80 g ağırlığındaki tavuk kanatları kullanıldı. Çalışma 3 tekrarlı olacak şekilde tasarlandı ve her tekrar için 24 adet olmak üzere toplam 72 tavuk kanadı kullanıldı.

### 4.2. Yöntem

#### 4.2.1. Tavuk Parça Etlerinde *C. perfringens*'in Kültür Yöntemi ile Tanımlanması ve Elde Edilen İzolatların Multipleks PCR Yöntemi ile Toksin Genlerinin Belirlenmesi

Tavuk parça etlerinde *C. perfringens* varlığının kültür yöntemi ile tespiti ve elde edilen *C. perfringens* izolatlarının toksin genleri yönünden değerlendirilerek tiplendirilmesi olmak üzere iki farklı aşamada gerçekleştirildi.

#### 4.2.1.1. Tavuk Parça Etlerinde *C. perfringens*'in Kültür Yöntemi ile İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Taze tavuk parça kısımlarında *C. perfringens* izolasyonu Baumgart J. (216), identifikasyonu ise Nordic Committee on Food Analysis (NMKL) (177) tarafından önerildiği Şekilde gerçekleştirildi. Taze but, göğüs, kanat ve bağet örneklerinden 25'er gram alınarak 225 ml Perfringens Enrichment Medium [PEM; Fluid Thioglycollate Medium + D-cycloserine] ile karıştırıcıda (Stomacher 400, France) 2 dakika homojenize edilerek anaerobik koşullarda  $46 \pm 1.0$  °C'de 20-24 saat zenginleştirme işlemi uygulandı. Zenginleştirme sonrası bir öze dolusu alınarak D-cycloserine (200mg/500ml) ilaveli TSC agara geçildi ve  $46 \pm 1.0$  °C'de 20-24 saat anaerobik koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, TSC agarda üreyen siyah renkli *C. perfringens* Şüpheli 3-5 koloni identifikasyon için kanlı agara geçilerek  $37$  °C  $\pm 1$ 'de  $24 \pm 3$  saat anaerobik koşullarda inkübe edildi. Kanlı agarda 1-6 mm çapında hemoliz oluşturan kolonilere Gram boyama, hareket ve laktoz fermentasyonu testleri uygulandı (Tablo 8).

Test sonuçlarına göre *C. perfringens* olarak tanımlanan izolatlar toksin genlerinin tespiti için kullanılmaya kadar % 40 gliserol içeren Cooked Meat Medium (CMM)'da  $-80$  °C'de bekletildi.

**Tablo 8.** *C. perfringens*'in identifikasyonunda NMKL tarafından önerilen kriterler (177)

Testler	Test Sonucu
Gram Boyama	Gram (+)
Hemoliz	+
Hareket	-
Laktoz Fermentasyonu	+

#### 4.2.1.2. Kültür Yöntemi ile İzole Edilen *C. perfringens* İzolatlarının Multipleks PCR Yöntemi ile Toksin Genlerinin Belirlenmesi

##### 4.2.1.2.1. Referans Suşlar

Bu araştırmada toksin genlerinin tespiti için pozitif kontrol olarak *C. perfringens* ATCC 13124, NCTC 13110 (ATCC 3626), NCTC 8239 ve CCUG 44727 suşları kullanıldı (Tablo 9) (184,187). Belirtilen suşlar Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü'nden temin edildi.

**Tablo 9.** Multipleks PCR'da pozitif kontrol amacıyla kullanılan *C. perfringens* referans suşlarının toksin gen içeriği

<i>C. perfringens</i> suşu	Toksin geni					
	<i>cpa</i>	<i>cpe</i>	<i>cpb</i>	<i>etx</i>	<i>cpb2</i>	<i>iA</i>
ATCC 13124	+	-	-	-	-	-
NCTC 8239	+	+	-	-	-	-
NCTC 13110	+	-	+	+	+	-
CCUG 44727	+	+	-	-	-	+

#### 4.2.1.2.2. DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu Çetinkaya ve ark. (217) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek gerçekleştirildi. Kriyovialler içinde -80 °C'de muhafaza edilen izolatlar oda ısısında çözdürüldükten sonra Cooked Meat Medium (CMM)'da anaerobik koşullarda 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 300 µl sıvı kültür 1.5 ml'lik bir eppendorf tüpüne aktarıldıktan sonra her tüpe 300 µl TNES buffer (20 mM Tris-pH: 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, % 0.2 SDS) ve 5 µl Proteinase K (20 mg/ml) eklenerek 56 °C'de 2 saat bekletildi. Süspansiyon, 10 dakika kaynatıldıktan sonra 600 µl fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) ilave edilerek dikkatli bir şekilde elle 2 dakika ters düz edilip sallandı. On dakika 13000 rpm'de santrifüj edilerek oluşan iki katmandan alt faza hiç dokunulmadan üst faz başka bir eppendorf tüpe alındı. Alınan miktarın 2,5 katı kadar % 96'lık etanol ve 1/10'u kadar 3M sodyum asetat eklenerek -20 °C'de bir gece çöktürmeye bırakıldı. On dakika 13000 rpm'de santrifüj edilen süspansiyondan elde edilen pelet sırasıyla % 96 ve % 70'lik 300 µl etanol ile iki defa yıkandı ve her yıkamadan sonra 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda alkol uzaklaştırıldı ve pelet kurumaya bırakıldı. Kuruyan pelet üzerine 100 µl steril distile su eklenerek multipleks PCR'da hedef DNA olarak kullanıldı.

#### 4.2.1.2.3. Multipleks PCR Aşaması

Reaksiyonda primer olarak büyüklüğü 196 ile 655 bp arasında değişen parçaları amplifiye eden spesifik primerler kullanıldı (Tablo 10).

Toplam 50 µl'lik hacimde hazırlanan PCR reaksiyon içeriği; 6 µl 10 x PCR buffer, 8 µl MgCl<sub>2</sub>, 9 µl dNTP karışımı, 1.0 U Taq DNA Polymerase enzimi, 1'er µl olacak şekilde 40 pmol'lük *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA*, *cpe* ve *cpb2* primerleri ile 5 µl

hedef DNA ve 6 µl distile sudan oluştu (Tablo 11). PCR karışımını içeren PCR tüpleri thermal cycler (ThermoHybaid, England) cihazına yerleştirildi.

PCR amplifikasyonu; 94 °C'de 2 dakika ön denatürasyon aşamasını takiben, toplam 30 PCR siklusu 94 °C'de 1 dakika denaturasyon, 55 °C'de 1 dakika hibridizasyon, 72 °C'de 1 dakika uzama ve 1 PCR siklusu 72 °C'de 5 dakika son uzama olacak şekilde DNA sentezi gerçekleştirildi (Tablo 12).

**Tablo 10.** *C. perfringens*'in toksin genlerinin belirlenmesinde kullanılan primerlerin dizilimi

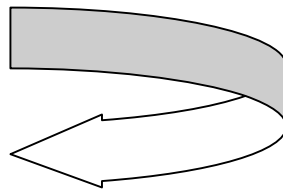
Gen	Oligonükleotid sekansı (5'–3')	Uzunluk (bp)	Kaynak
<i>cpa</i>	GCTAATGTTACTGCCGTTGA CCTCTGATACATCGTGTAAG	324	180
<i>cpb</i>	GCGAATATGCTGAATCATCTA GCAGGAACATTAGTATATCTTC	196	180
<i>etx</i>	GCGGTGATATCCATCTATTC CCACTTACTTGTCCTACTAAC	655	180
<i>iA</i>	ACTACTCTCAGACAAGACAG CTTCCTTCTATTACTATACG	446	180
<i>cpe</i>	GGAGATGGTTGGATATTAGG GGACCAGCAGTTGTAGATA	233	180
<i>cpb2</i>	AGATTTTAAATATGATCCTAACC CAATACCCTTCACCAAATACTC	567	181

**Tablo 11.** Multipleks PCR reaksiyon protokolü

<b>Reaksiyon içeriği</b>	<b>Kullanılan miktar</b>
Distile su	9 µl
PCR buffer (10x konsantrasyonda)	6 µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	8 µl
dNTPs (10 mM)	9 µl
Her bir toksin gen bölgesi için aynı miktar ve konsantrasyon da;	
Primer F (40 pmol/ µl)	1 µl (x 6)
Primer R (40 pmol/ µl)	1 µl (x 6)
Taq polimeraz enzimi (1.0 U)	1 µl
Örnek DNA	5 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>50 µl</b>

**Tablo 12.** Multipleks PCR siklus protokolü

<b>Sıcaklık</b>	<b>Zaman</b>	<b>Siklus</b>
94 °C'de	2 dk.	1 siklus
94 °C'de	1 dk.	30 siklus
55 °C'de	1 dk.	
72 °C'de	2 dk.	
72 °C'de	5 dk.	1 siklus



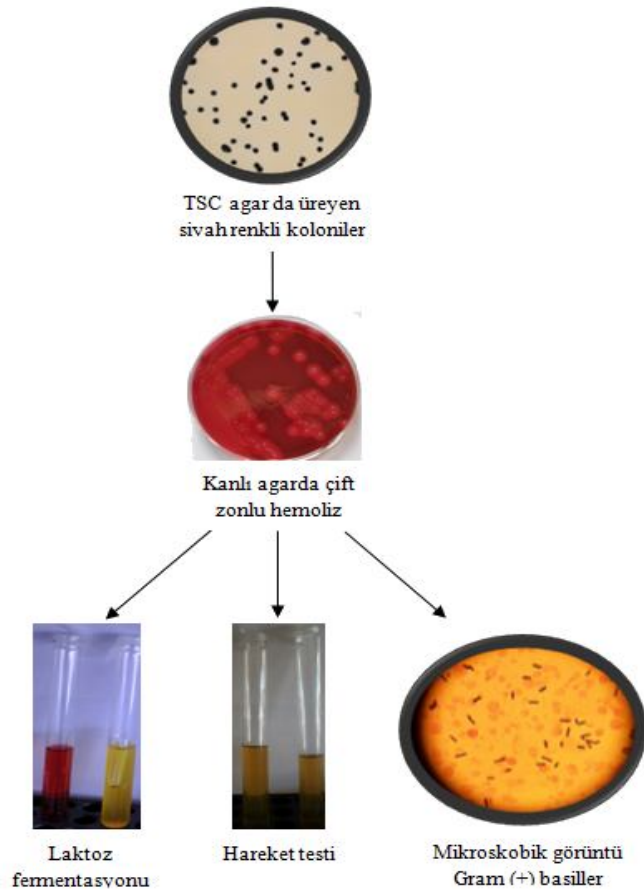
#### 4.2.1.2.4. PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi

Amplifiye edilen PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde 90 voltluk akımda elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra 300 ml distile su içine ilave edilen ethidium bromid (0.5 µg/ml) ile 30 dakika süreyle boyandı ve sonuçlar 312 nm'lik dalga boyunda UV transilüminatör (Spectroline, Model TC-312 E/F) ile gözlemlendi. Oluşan bantların moleküler ağırlığını saptamak amacıyla 100 bp'lik DNA ladder (MBI, Fermentas SM 0321)' dan yararlanıldı. Tüm PCR uygulamalarında pozitif kontrol olarak *C. perfringens* referans suşları (ATCC 13124, NCTC 13110, NCTC 8239 ve CCUG 44727) ile negatif kontrol olarak distile su kullanıldı.

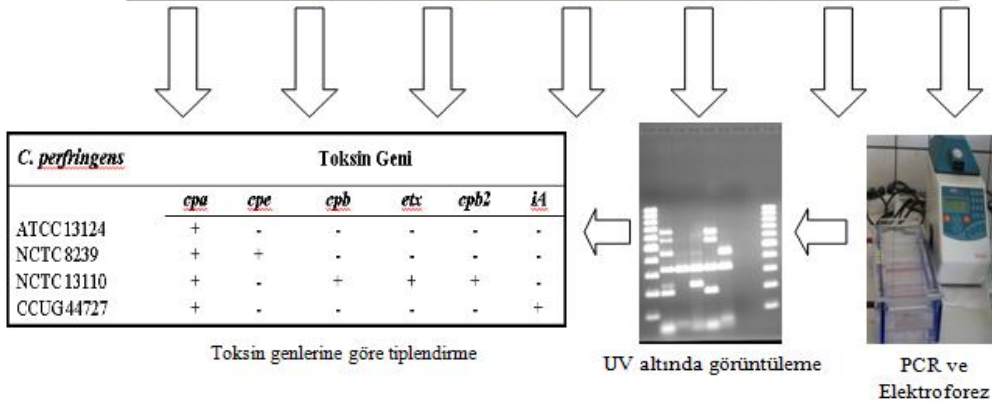
Yukarıda belirtildiği şekilde (multipleks PCR aşaması, PCR siklusları, elektroforez ile yürütme ve UV transilüminatörde görüntüleme) pozitif kontroller ile optimize edilen multipleks PCR protokolü tavuk parça etlerinden elde edilen *C. perfringens* izolatlarının toksin genlerinin belirlenmesinde kullanıldı (Şekil 5).

#### 4.2.1.2.5. İstatistiksel Analiz

Kültür sonuçları değerlendirilerek tavuk parça etlerinde *C. perfringens*'in bulunma oranları arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemliliğini ortaya koymak amacıyla SPSS 11.0 (SPSS Inc. Chicago, USA) paket programı ile Pearson  $\chi^2$  testi uygulandı. P <0.05 bulunan değerler istatistiksel açıdan önemli kabul edildi.



### Multipleks PCR ile Toksin Genotiplendirme



Şekil 5. *C. perfringens*'in tavuk parça etlerinden kültür yöntemi ile izolasyonu, identifikasyonu ve toksin genlerinin Multipleks PCR ile belirlenmesi

### **4.3. Farklı Dondurma Sıcaklıklarında *C. perfringens*'in Yaşam Kabiliyetinin Araştırılması**

#### **4.3.1. Referans Suş**

Bu çalışmada referans suş olarak Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü'nden temin edilen *C. perfringens*'e ait *cpe* (+) NCTC 8239 (Hobbs serotype 3) suşu kullanıldı.

#### **4.3.1.2. İnokülümün Hazırlanması**

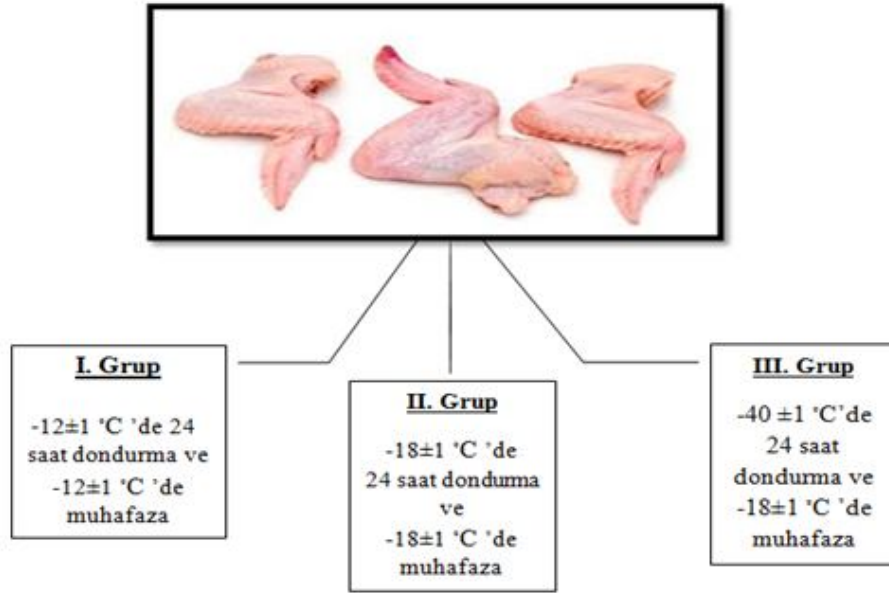
İnokülüm, Juneja ve ark. (218) tarafından önerilen 75°C'de 20 dakika ısı şoku ve sonra 37°C'de 6 saat inkübasyon işlem basamağı atlanarak, modifiye edilerek hazırlandı. CMM içinde bekletilen stok kültürden 1 ml alınıp 9 ml'lik taze hazırlanmış Fluid Thioglycollate Medium (FTM) tüplerine inoküle edilerek anaerobik koşullarda 37 °C'de 18 saat inkübe edildi. Daha sonra bu kültürden 1 ml alınarak 9 ml FTM tüpüne aktarıldı ve 37°C'de 6 saat daha inkübe edildi. Oda sıcaklığında 10 dakika 7700 x g'de santrifüj işlemi uygulandı ve üstte kalan süpernatant uzaklaştırılarak pelet steril % 0.1 peptonlu su (w/v) ile yıkandı ve bu işlem iki kez tekrar edildi. Elde edilen pelet 100 ml steril % 0.1 peptonlu su içerisinde süspanse edildikten sonra tavuk kanatlarının kontaminasyonu için kullanıldı.

#### **4.3.1.3. Kanat Örneklerinin Kontaminasyonu**

Kanat yüzeyindeki hedef kontaminasyon seviyesi 10<sup>6</sup> kob/cm<sup>2</sup> olacak şekilde 10<sup>8</sup> kob/ml vejetatif *C. perfringens* suşunu içeren kontaminasyon solüsyonu steril cam baget yardımı ile kanat yüzeyine sürüldü. Etkenin kanat yüzeyine yapışmasını sağlamak için yaklaşık 5 dk. askıda bekletildi.

#### 4.3.2. Dondurma ve Muhafaza Aşaması

Kontamine edilen kanat örnekleri farklı sıcaklıklarda dondurmanın etkisine göre üç gruba ayrıldı. I. grup için  $-12 \pm 1$  °C'de dondurma ve muhafaza, II. grup için  $-18 \pm 1$  °C'de dondurma ve muhafaza, III. grup için  $-40 \pm 1$  °C arasında 1 gün dondurma ve  $-18 \pm 1$  °C'de muhafaza işlemi uygulandı (Şekil 6).  $-40 \pm 1$  °C'de dondurma işlemi Elazığ ilinde faaliyet gösteren Öz Uğur Tavukçuluk A.Ş'nin dondurma ünitesinde yapıldı.  $-12 \pm 1$ °C ve  $-18 \pm 1$ °C'lerde dondurma ve muhafaza için Anabilim Dalı'nda bulunan derin dondurucular



kullanıldı.

**Şekil 6.** *cpe* (+) *Clostridium perfringens* ile kontamine edilen tavuk kanatları

##### 4.3.2.1. Örneklerin Hazırlanması ve Mikrobiyolojik Analizler

Tavuk kanatlarında kontaminasyon düzeyini belirlemek amacıyla mikrobiyolojik analizler yapıldı. Dondurulmuş örnekler FSIS tarafından önerildiği

şekilde buzdolabı sıcaklığında çözündürme işleminden sonra mikrobiyel sayıma geçildi (219,220). Aseptik koşullarda 4 x 2 cm<sup>2</sup> olacak şekilde ayarlanmış steril levhalar ile toplam 8 cm<sup>2</sup>'lik kanat derisi ensizyon yöntemi ile alınarak 40 ml % 0.1'lik peptonlu su ile 1 dak. karıştırıcıda (Stomacher 400, France) homojenize edildi. Homojenizattan 1ml alınarak 1/10'luk düzende 1/10<sup>6</sup>'ya kadar seyreltildi. TSC agarda plaklara çift seri ekim ile anaerobik koşullarda 18-24 saat 37 °C'de inkübe edildi. Muhafazaya bağlı tavuk kanatlarında *C. perfringens*'in sayısındaki değişimleri belirlemek için 0., 1., 7., 14., 28., 56., 98. ve 112. günlerde mikrobiyolojik analiz yapıldı.

#### **4.3.2.2. *C. perfringens* Sayısının (kob/cm<sup>2</sup>) Hesaplanması**

*C. perfringens* sayısı aşağıdaki formül kullanılarak kob/cm<sup>2</sup> çevrildi.

$$\text{Log}_{10} \text{ kob/cm}^2 = \text{log}_{10} [\text{kob/ml} \times \text{sulandırma miktarı/toplam yüzey alan (cm}^2\text{)}]$$

$$\text{Log}_{10} \text{ kob/cm}^2 = \text{log}_{10} [\text{kob/ml} \times 40/8]$$

#### **4.3.2.3. İstatistiksel Analiz**

İncelenen değerler bakımından gruplar arasındaki ve grup içi dönemler arasındaki farklılığın önem derecesini saptamak amacıyla istatistiksel analizler yapıldı. Veriler varyans analizine (ANOVA) tabi tutuldu. Ortalamalar Fisher'in en küçük kareler farkı (Fisher's Least Significant Difference-LSD) metoduna göre ayrıştırıldı. İstatistiksel önem derecesi  $\alpha = 0.05$  olarak kabul edildi. Verilerin analizleri Statistical Analysis System (SAS) paket programı kullanılarak yapıldı (221).

## 5. BULGULAR

### 5.1. Tavuk Parça Etlerinde *C. perfringens*'in Kültür Yöntemiyle Tanımlanması ve Toksin Genlerinin Multipleks PCR Yöntemi ile Belirlenmesi

#### 5.1.1. Tavuk Parça Etlerinde *C. perfringens*'in Kültür Yöntemi ile Tanımlanması

Bu çalışmada, Elazığ ilindeki çeşitli market, şarküteri ve kasaplarda satışa sunulan taze tavuk but (n: 50), göğüs (n: 50), kanat (n: 50) ve baget (n: 50) olmak üzere toplam 200 tavuk parça örneği PEM'de zenginleştirme işlemi uygulandıktan sonra TSC agar besiyerine geçildi. Bu besiyerinde üreyen siyah renkli koloniler *C. perfringens* şüpheli olarak kabul edildi ve tesadüfi seçilen 3-5 adet koloniye identifikasyon için mikroskopik muayene ve biyokimyasal testler uygulandı. Analiz bulguları sonucunda toplam 200 tavuk parça etinin 154 (% 77)'ünde siyah renkli *C. perfringens* şüpheli kolonilerin geliştiği ve elde edilen 568 şüpheli izolattan 558 (% 98.2)'inin mikroskopik muayene ve biyokimyasal testler sonucunda *C. perfringens* olduğu saptandı (Tablo 13, Tablo 14, Şekil 7, Şekil 8). *C. perfringens* prevalansının kanat-göğüs ile kanat-baget arasında istatistiksel açıdan önemli olduğu tespit edildi ( $P < 0.05$ ).

**Tablo 13.** Tavuk parça etlerinde *C. perfringens* prevalansı

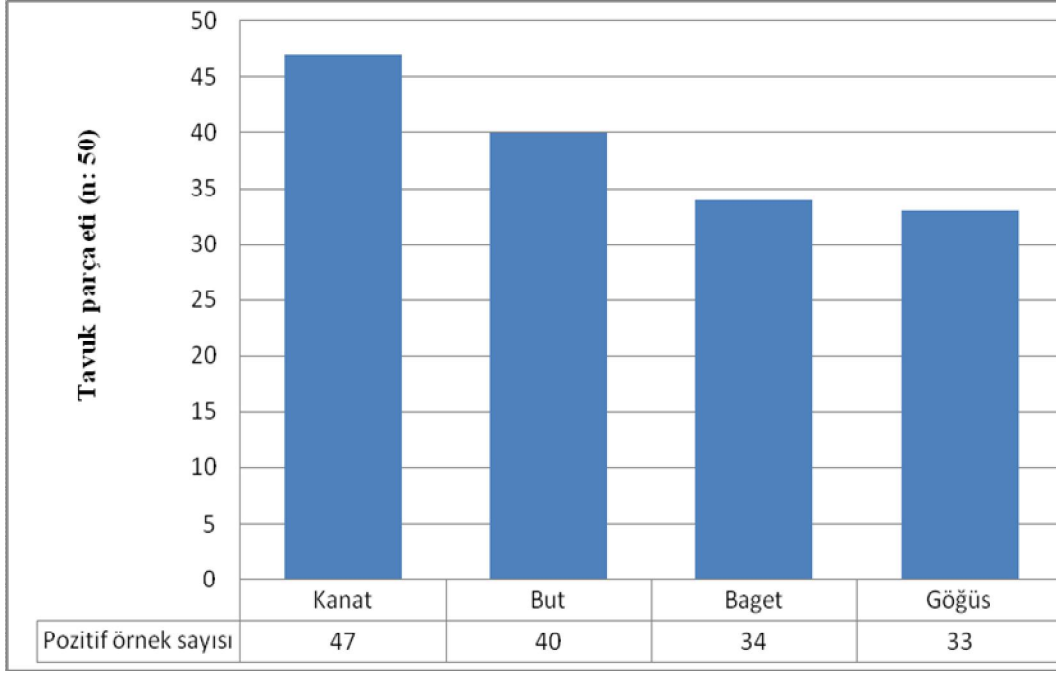
Numune	<i>C. perfringens</i> Pozitif Örnek Sayısı ve Yüzdesi		
	N	( $\chi^2$ ) *	%
But	50	40 <sup>AB</sup>	80
Göğüs	50	33 <sup>A</sup>	66
Kanat	50	47 <sup>B</sup>	94
Baget	50	34 <sup>A</sup>	68
<b>Toplam</b>	<b>200</b>	<b>154</b>	<b>77</b>

\* Pearson Ki-Kare

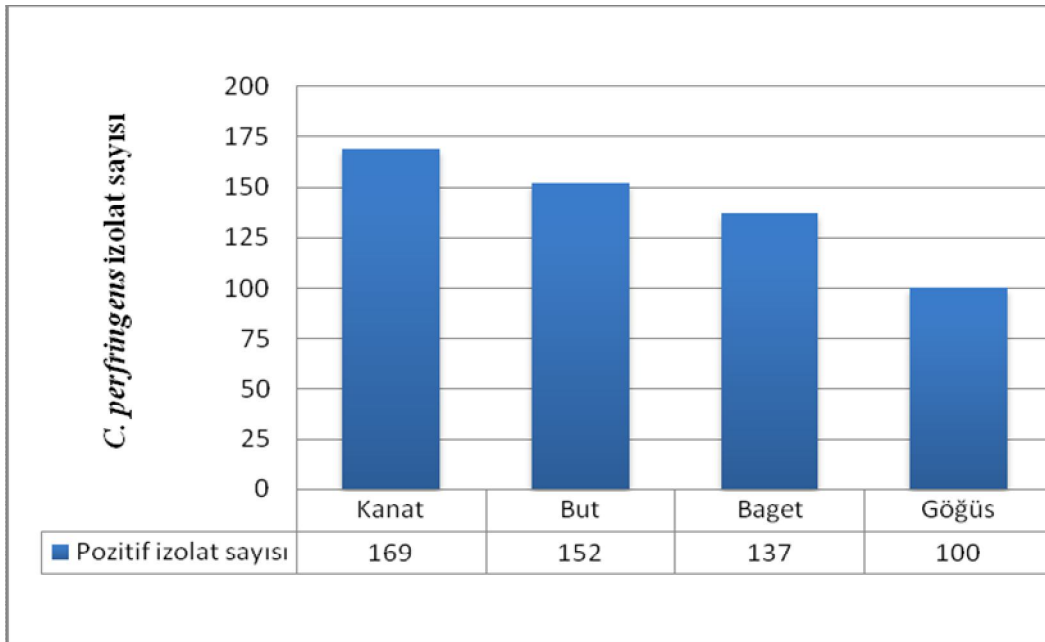
A,B: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılık önemlidir (P <0.005).

**Tablo 14.** Tavuk parça etlerine göre *C. perfringens* izolatlarının dağılımı

Numune	Toplam İzolat Sayısı (n)	Pozitif İzolat Sayısı	Negatif İzolat Sayısı	%
But	153	152	1	99.4
Göğüs	103	100	3	97.0
Kanat	174	169	5	97.1
Baget	138	137	1	99.3
<b>Toplam</b>	<b>568</b>	<b>558</b>	<b>10</b>	<b>98.2</b>



Şekil 7. Tavuk parça etlerine göre *C. perfringens*'in dağılımı



Şekil 8. Tavuk parça etlerine göre *C. perfringens* izolat sayılarının dağılımı

### 5.1.2. *C. perfringens*'in Toksin Genlerinin Multipleks PCR ile Belirlenmesi

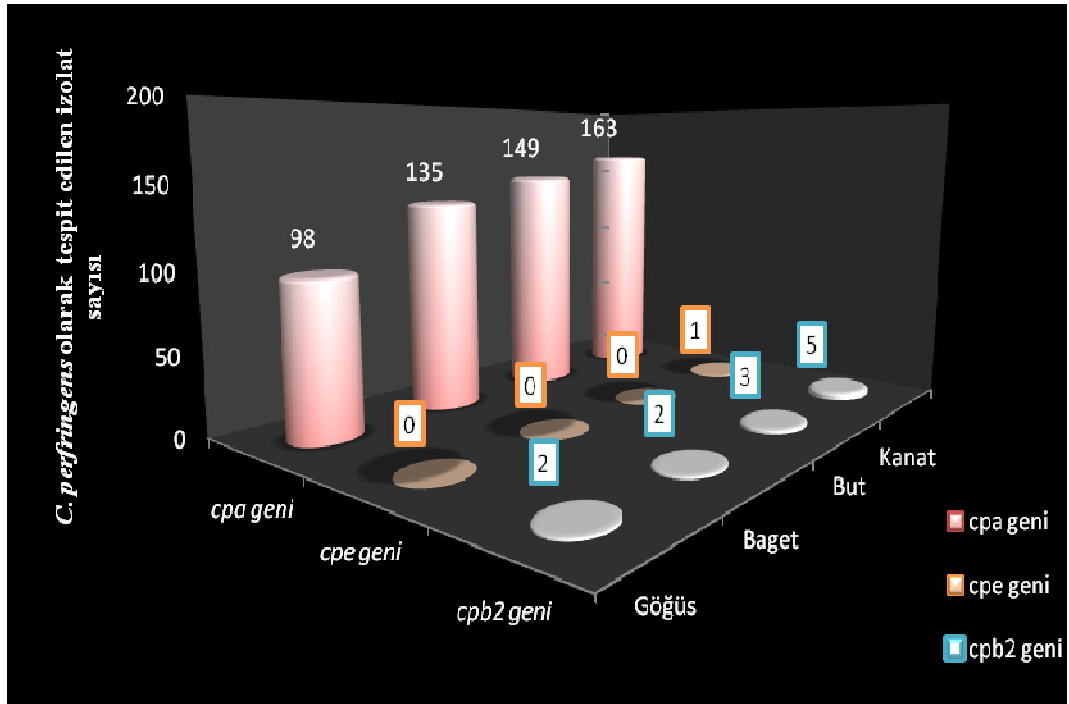
Çalışmada, kültür yöntemi ile belirlenen toplam 558 *C. perfringens* izolatından ekstrakte elde edilen DNA örneklerinde multipleks PCR reaksiyonu sonrası yapılan agaroz jel elektroforezinde *cpa* için 324 bp, *cpb* için 196 bp, *etx* için 655 bp, *iA* için 446 bp, *cpe* için 233 bp ve *cpb2* için 567 bp büyüklüğünde bantların oluşumu beklendi. Multipleks PCR işlemi sonucunda 545 izolatın tamamının *cpa*, 12 (% 2.1)'sinin hem *cpa* hem de *cpb2* ve 1 (% 0.1)'inin hem *cpa* hem de *cpe* toksin genlerini içerdiği tespit edildi (Şekil 9). Ayrıca izolatların hiçbirinin *cpb*, *etx* veya *iA* toksin genlerinden herhangi birini bulundurmadığı saptandı (Tablo 15). Bu sonuçlar ile 558 *C. perfringens* izolatının 545 (% 97.6)'inin tip A, 12 (% 2.1)'sinin *cpb2* (+) tip A ve 1 (% 0.1)'inin *cpe* (+) tip A olduğu belirlendi (Tablo 16). Tavuk parça etlerinden multipleks PCR ile tespit edilen bazı *cpa*, *cpb2* ve *cpe* genleri ile pozitif kontrol olarak kullanılan referans suşların elektroforez jel görüntüleri Şekil 10, 11 ve 12'de verilmiştir.

**Tablo 15.** Tavuk parça etlerinden elde edilen *C. perfringens* izolatlarında toksin gen varlığının dağılımı

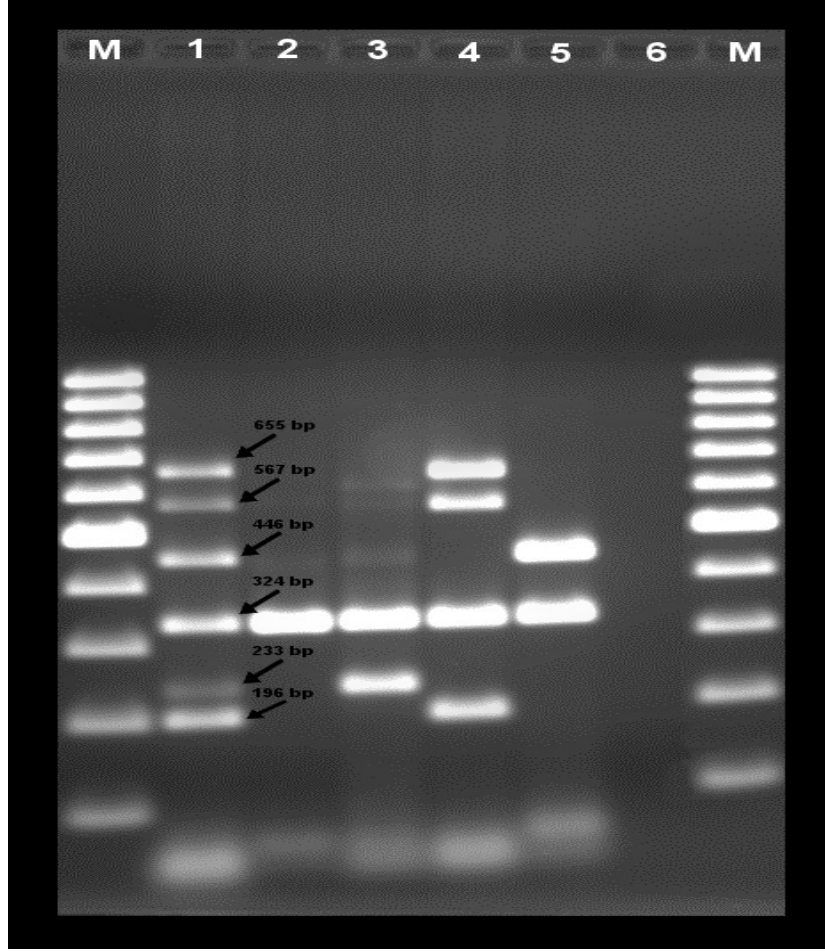
Toksin Geni	Kanat Parça Etleri				Pozitif Toksin Gen Sayısı
	But	Göğüs	Kanat	Baget	
<i>cpa</i>	149 (+)	98 (+)	163 (+)	135 (+)	558
<i>cpe</i>	-	-	1 (+)	-	1
<i>cpb2</i>	3 (+)	2 (+)	5 (+)	1 (+)	12
<i>cpb</i>	-	-	-	-	-
<i>etx</i>	-	-	-	-	-
<i>iA</i>	-	-	-	-	-

**Tablo 16.** Tavuk parça etlerinde *C. perfringens* izolatlarının toksin gen varlığına göre tiplendirilmesi

Numune	Örnek Sayısı	Kontamine Örnek Sayısı	<i>C. perfringens</i>		
			Tip A	Tip A- <i>cpb2</i>	Tip A- <i>cpe</i>
But	50	40 (% 80)	149 (% 98)	3 (% 2)	-
Baget	50	34 (% 68)	98 (% 98)	2 (% 2)	-
Kanat	50	47 (% 94)	163 (% 96.4)	5 (% 2.9)	1(% 0.5)
Göğüs	50	33 (% 66)	135 (% 98.5)	2 (% 1.5)	-
<b>Toplam</b>	<b>200</b>	<b>154 (% 77)</b>	<b>545 (% 97.6)</b>	<b>12 (% 2.1)</b>	<b>1 (% 0.1)</b>



**Şekil 9.** Tavuk parça etlerinden elde edilen *C. perfringens* izolatlarında toksin gen dağılımı



**Şekil 10.** Çalışmada kullanılan pozitif kontrollerin ethidium bromid ile boyanmış agaroz jel görünümü

M- DNA ladder (100 bp)

1- Multipleks PCR: *cpb*, *cpe*, *cpa*, *iA*, *cpb2*, *etx* toksin genleri pozitif

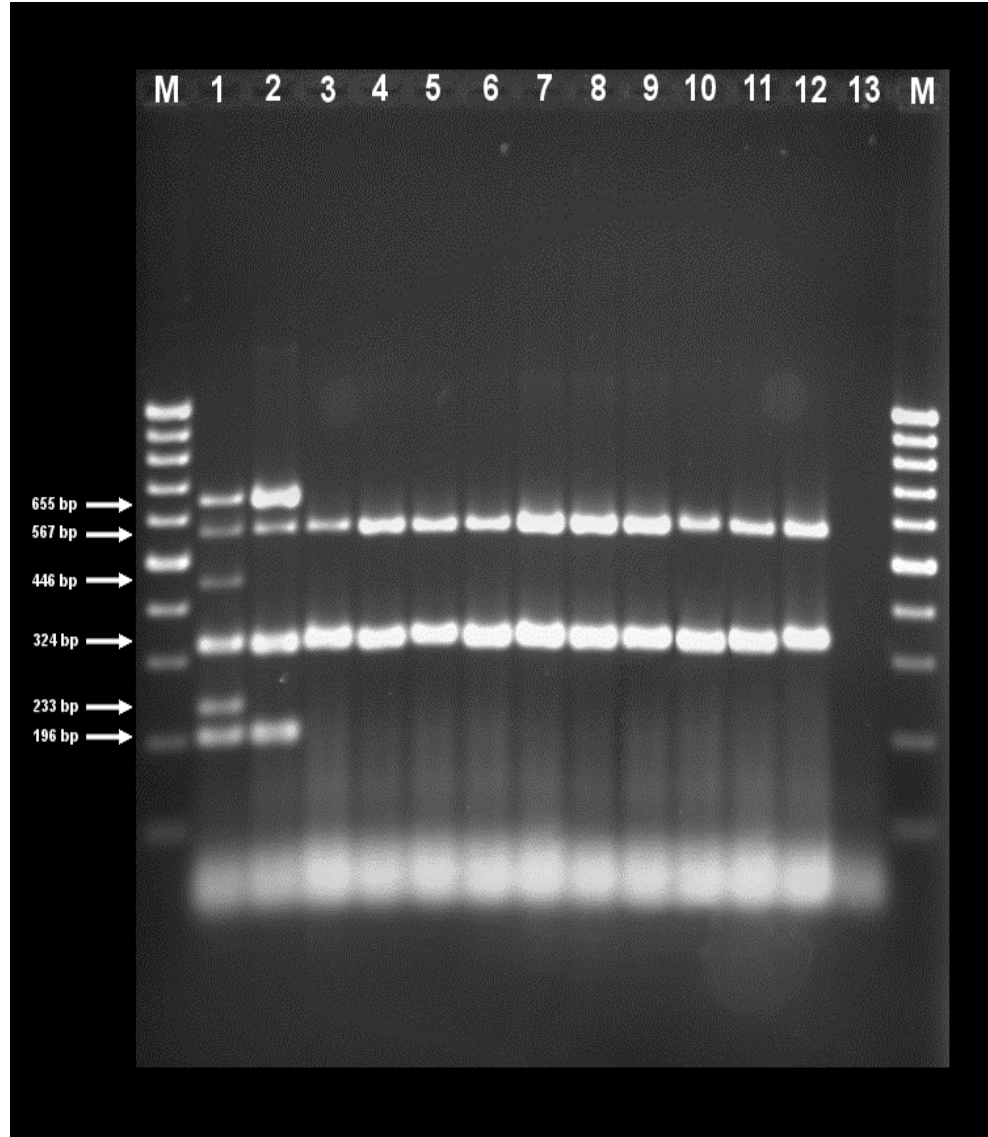
2- ATCC 13124: *cpa* geni pozitif

3- NCTC 8239: *cpe* ve *cpa* geni pozitif

4- NCTC 13110: *cpb*, *cpa*, *cpb2* ve *etx* geni pozitif

5- CCUG 44727: *cpa* ve *iA* geni pozitif

6- Negatif kontrol



Şekil 11. *cpa* ve *cpb2* geni pozitif bazı *C. perfringens* izolatlarının

ethidium bromid ile boyanmış agaroz jel görünümü

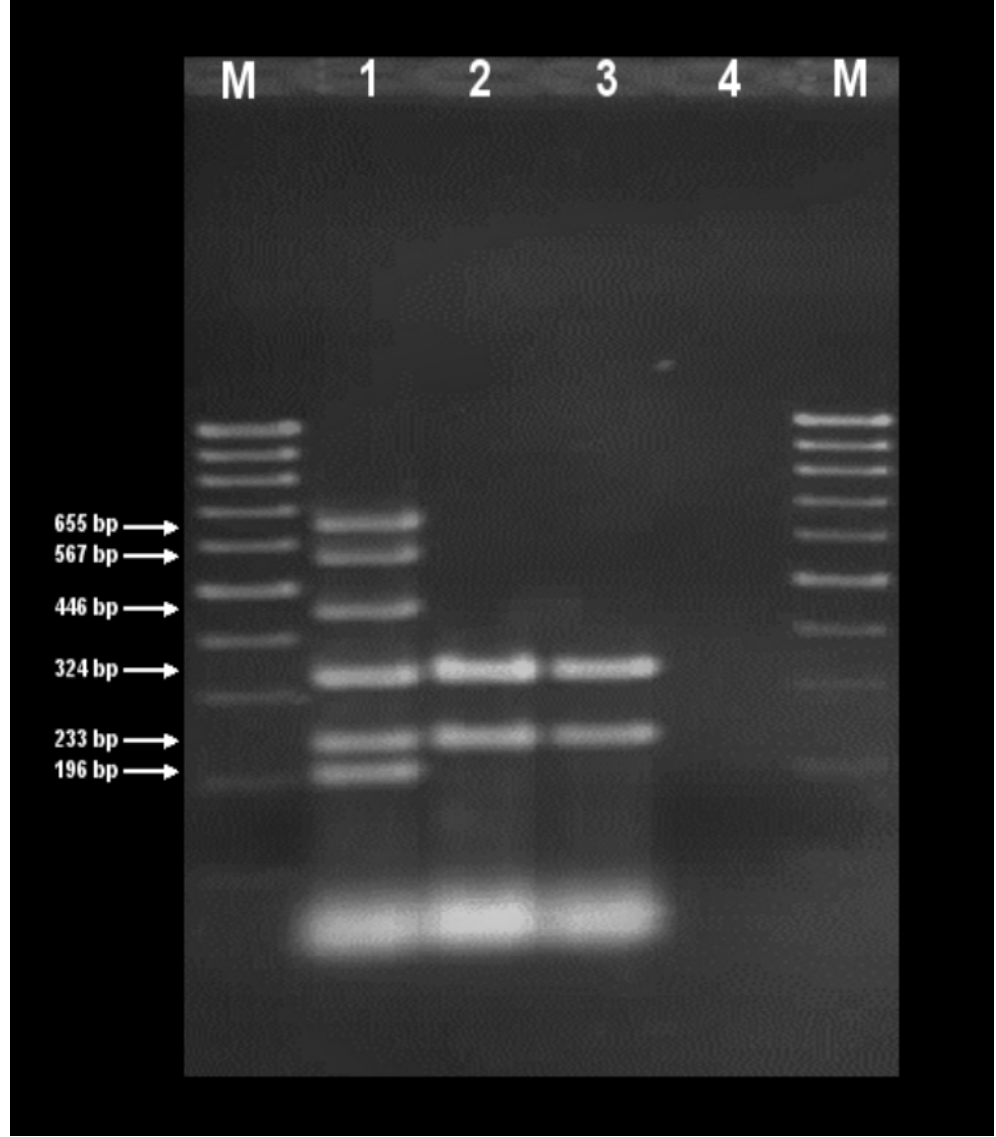
M- DNA ladder (100 bp)

1- Multipleks PCR: *cpb*, *cpe*, *cpa*, *iA*, *cpb2*, *etx* toksin genleri pozitif

2- NCTC 13110: *cpb*, *cpa*, *cpb2* ve *etx* genleri pozitif

3- 12: *cpa* ve *cpb2* geni pozitif bazı *C. perfringens* tavuk eti izolatları

13- Negatif kontrol



**Şekil 12.** *cpa* ve *cpe* geni pozitif *C. perfringens* izolatının ethidium bromid ile boyanmış agaroz jel görünümü

M- DNA ladder (100 bp)

1- Multipleks PCR: *cpb*, *cpe*, *cpa*, *iA*, *cpb2*, *etx* toksin genleri pozitif

2- NCTC 8239: *cpe* ve *cpa* genleri pozitif

3- *cpa* ve *cpe* geni pozitif *C. perfringens* tavuk eti izolatu

4- Negatif kontrol

## 5.2. Farklı Dondurma Sıcaklıklarının *C. perfringens*'in Yaşamı Üzerine Etkisi

Tavuk kanatlarında  $-12 \pm 1$  °C'de dondurma ve muhafaza,  $-18 \pm 1$  °C'de dondurma ve muhafaza,  $-40 \pm 1$  °C'de 1 gün dondurma ve  $-18 \pm 1$  °C'de muhafazanın *C. perfringens*'in yaşamı üzerine etkisi incelendi. *C. perfringens* sayısı bakımından I. grup ile II. ve III. gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ( $P < 0.05$ ) (Tablo 17, Şekil 13). 0. günden muhafazanın sonuna kadar (112. gün) II. ve III. gruplar arasında fark önemsizken ( $P > 0.05$ ), I. grupta 0. günden muhafazanın sonuna kadar günler arasında farkın istatistiksel açıdan önemli olduğu ( $P < 0.05$ ) saptandı.

Tavuk kanatlarında 0. günde *C. perfringens* ile kontaminasyon düzeyinin ortalama  $6.35 \log_{10}$  kob/cm<sup>2</sup> olduğu bunu takiben 1. günde; I. grupta  $0.81 \log_{10}$  kob/cm<sup>2</sup>, II. grupta  $1.03 \log_{10}$  kob/cm<sup>2</sup> ve III. grupta  $1.18 \log_{10}$  kob/cm<sup>2</sup>'lik bir düşüş saptandı.

Muhafaza süresine bağlı olarak *C. perfringens* sayısındaki en fazla düşüş muhafazanın 56. gününde  $1.85 \log_{10}$  kob/cm<sup>2</sup> ile I. grupta saptandı. Muhafazanın 28. gününde II. grupta *C. perfringens* sayısında herhangi bir değişim saptanmaz iken diğer 2 grup arasında en düşük azalma, 28. günde  $0.02 \log_{10}$  kob/cm<sup>2</sup> ile III. grup ve 14. günde  $0.24 \log_{10}$  kob/cm<sup>2</sup>'lik bir azalma ile I. grup olduğu belirlendi.

Muhafaza sonunda (112. gün) *C. perfringens* düzeyi; I. grupta; tespit edilebilir düzeyin altında, II. grupta;  $4.23 \log_{10}$  kob/cm<sup>2</sup> ve III. grupta;  $4.30 \log_{10}$  kob/cm<sup>2</sup> olarak tespit edildi.

**Tablo 17.** Farklı dondurma sıcaklıklarının tavuk kanatlarında *C. perfringens*'in yaşamı üzerine etkisi ( $\log_{10}$  kob/cm<sup>2</sup> n=72)

GRUPLAR	GÜNLER							
	0.gün	1.gün	7.gün	14.gün	28.gün	56.gün	98.gün	112.gün
<b>I.grup</b>	6.35 <sup>Ak</sup> ±0.13	5.54 <sup>Al</sup> ±0.03	4.31 <sup>Am</sup> ±0.04	4.07 <sup>An</sup> ±0.10	3.60 <sup>Ap</sup> ±0.05	1.75 <sup>Ar</sup> ±0.09	1.58 <sup>Ar</sup> ±0.05	< 1
<b>II.grup</b>	6.35 <sup>Ak</sup> ±0.13	5.32 <sup>BCl</sup> ±0.04	4.40 <sup>ABm</sup> ±0.03	4.37 <sup>BCm</sup> ±0.03	4.32 <sup>BCm</sup> ±0.01	4.32 <sup>BCm</sup> ±0.02	4.24 <sup>BCm</sup> ±0.03	4.23 <sup>Am</sup> ±0.03
<b>III.grup</b>	6.35 <sup>Ak</sup> ±0.13	5.17 <sup>Cl</sup> ±0.11	4.50 <sup>Bm</sup> ±0.07	4.43 <sup>Cm</sup> ±0.04	4.41 <sup>Cm</sup> ±0.04	4.38 <sup>Cm</sup> ±0.02	4.35 <sup>Cm</sup> ±0.03	4.30 <sup>Am</sup> ±0.01

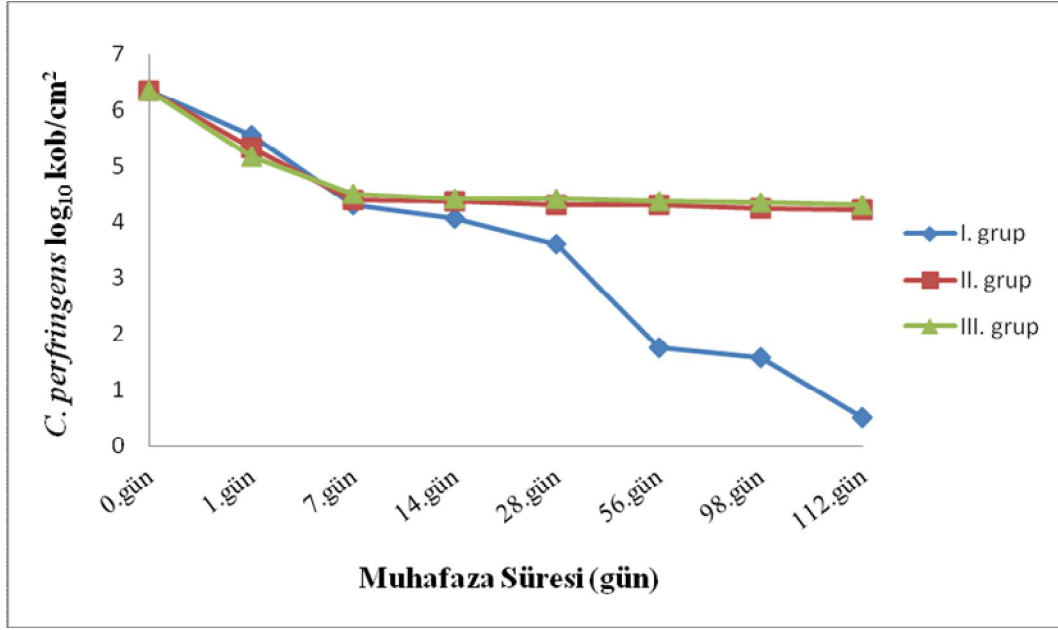
ABC; Aynı sütunda yer alan ortalamalardan farklı üst simgeyi taşıyanlar istatistiksel bakımdan önemlidir (P <0.05).

klmnp; Aynı satırda yer alan ortalamalardan farklı üst simgeyi taşıyanlar istatistiksel bakımdan önemlidir (P <0.05).

I. Grup; -12±1 °C'de dondurma ve muhafaza

II. Grup; -18±1 °C'de dondurma ve muhafaza

III. Grup; -40±1 °C'de 1 gün dondurma ve -18 °C'de muhafaza



Şekil 13. Farklı dondurma sıcaklıklarının *C. perfringens*'in yaşamı üzerine etkisi

## 6. TARTIŞMA

### 6.1. Tavuk Parça Etlerinde *C. perfringens*'in Kültür Yöntemi ile Tanımlanması

İnsanlarda *C. perfringens*'e bağlı gıda kaynaklı hastalıkların ortaya çıkmasında proteinden zengin hayvansal kaynaklı gıdalar büyük önem taşımaktadır. Etken özellikle çiğ et ve bu etlerden hazırlanmış çiğ veya yetersiz pişirilmiş et ürünlerinde yaygın olarak bulunmaktadır.

Bu çalışmada çeşitli market, şarküteri ve kasaplarda satışa sunulan toplam 200 tavuk parça etinde (50 adet tavuk but, 50 adet tavuk göğüs, 50 adet tavuk kanat ve 50 adet tavuk baget) klasik kültür tekniği kullanılarak *C. perfringens* varlığının belirlenmesi ve *C. perfringens* olarak belirlenen izolatların multipleks PCR ile toksin genlerine göre tiplendirilmesi yapıldı. Bu amaçla alınan toplam 200 örneğin 154 (% 77)'ünün *C. perfringens* ile kontamine olduğu saptandı. Bu çalışmadaki bulgulara benzer olarak Hindistan'da market ve kesimhanelerden toplanan tavuk etlerinin % 70.4'nün (169), Pekin'de tüketime sunulan tavuk karkaslarının % 88'inin (164), Mısır'da bakkal ve süpermarketlerde satışa sunulan 19 tavuk butununun 11 (% 57.9)'ünün *C. perfringens* ile kontamine olduğu tespit edilmiştir (161). Araştırma sonucunda tavuk parça et örneklerinden izole edilen *C. perfringens* prevalansının yüksek olmasında, etkenin ubiquiter özellikle olmasının, kanatlı kesimhane koşulları ve etkenin sağlıklı veya hasta tavukların dışkısında bulunabilmesinin etkili olduğu ifade edilebilir. Etkenin sağlıklı hayvanlardan izolasyonu için yapılan çalışmalarda Götze (222), 100 adet broyler dışkısının 41 (% 41)'inde, Miwa ve ark. (154), 50 adet broyler dışkısının 40 (% 80)'inde, Tschirdewahn ve ark. (223), tavuk dışkı örneklerinin % 80'inde *C.*

*perfringens*'i tespit etmişlerdir. Özellikle tavuk kesimhanelerinde birçok kontaminasyon noktasının (tüy ıslatma, tüy yolma, iç organların çıkarılması, soğutma, parçalama ve ambalajlama) varlığı, barsak içeriğinde etkenin düşük oranlarda bulunması durumunda dahi çapraz kontaminasyon açısından önemli olduğunu göstermektedir. Kesimhane ve et işletmelerinin sanitasyon ve hijyenik koşullarının yeterli düzeyde olmadığı, bıçakların, tezgahların, işleme makinaları gibi alet ve ekipmanlar ile çalışan personelin çapraz kontaminasyonlara neden olduğu bildirilmiştir (224-226). Heikinheimo ve ark. (153), yaptıkları bir araştırmada herhangi bir gastrointestinal sistem hastalığı belirtisi göstermeyen sağlıklı 137 gıda çalışanına ait dışkı örneğinin 25 (% 18.4)'inde *cpe* (+) *C. perfringens*'i saptamışlardır. Bu durum gıda çalışanlarının etken açısından gıda maddelerinin üretiminden servisine kadar olan aşamalarda muhtemel bir kaynak oluşturabileceğini göstermektedir.

Miki ve ark. (155), Fluid Thioglycollate Medium (FTM) ile en muhtemel sayı (EMS) yöntemini kullandıkları çalışmalarında Japonya'nın Wakayama şehrinde satışa sunulan 33 tavuk etinin 32 (% 97)'sinde ve 22 tavuk kıymasının 22 (% 100)'sinde, Çakmak ve ark. (227), Türkiye'nin Ankara ilinde kanatlı kesimhanelerinden topladıkları 40 donmuş tavuk kıymasının FTM ile EMS yöntemine göre 28 (% 70)'inin değişik düzeylerde *C. perfringens* ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada tavuk parça etlerinde *C. perfringens* varlığı FTM'de zenginleştirme işlemi uygulandıktan sonra tespit edilmiştir. FTM'nin kullanılması ortamın seçiciliğini artırarak bazı fakültatif veya anaerobik mikroorganizmaların baskılanmasını ve aynı zamanda hasar görmüş *C. perfringens*'lerin gelişimi için uygun bir ortam oluşturarak tavuk parça etlerinde

muhtemel düşük sayıdaki *C. perfringens*'in tespit edilebilir oranını arttırdığı düşünülmektedir. Çalışmada *C. perfringens* prevalansının (% 77) yüksek bulunması ve elde edilen şüpheli 568 izolatın önemli bir çoğunluğunun (% 98.2) *C. perfringens* olarak belirlenmiş olması bu düşünceyi destekler niteliktedir. Aynı şekilde ABD'de yapılan bir çalışmada satışa sunulan toplam 887 et ve et ürünü ile balıktan oluşan gıda maddelerinin 278 (% 31.2)'inde 0 ile 23 EMS/g arasında *C. perfringens* tespit edildiği ve kullanılan FTM'nin *C. perfringens* geri kazanımını yaklaşık 50 kat arttırdığı bildirilmiştir (166).

Buna karşın ABD'nin Massachusetts eyaleti ile Pennsylvania eyaletinin Pittsburgh kentinde satışa sunulan tavuk etlerinde Lin ve Labbe (165), 19 tavuk eti örneğinin 4 (% 21)'ünün; Wen ve McClane (166), 147 tavuk etinin 56 (% 38)'sının; Japonya'nın Aichi Prefecture ve Shimane Prefecture bölgelerinde market, şarküteri ve açıkta sunulan tavuk etlerinde sırasıyla Saito (147), 68 tavuk eti örneğinin 16 (% 24)'sının, Fukushima ve ark. (162), 120 tavuk etinin 13 (% 10.8)'ünün; Lindblad ve ark. (228) ise İsveç'te 10 farklı tavuk kesimhanesinden 1 yıl boyunca topladıkları 636 tavuk karkasının 114 (% 18)'ünün *C. perfringens* ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonucun tez çalışmasındaki bulgulardan düşük olduğu, bunun da kesimhaneler arasındaki teknolojik farklılıklar, örnekleme tekniği ve sayısı ile metodolojik farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kanatlı et ve ürünlerinde *C. perfringens*'in prevalansına yönelik yapılan araştırmalarda tespit edilen prevalans değerlerinin bu çalışmayı destekler şekilde olduğu görülmüştür (33, 229). Bu kapsamda hindi etlerinde *C. perfringens* düzeyini belirlemeye yönelik yapılan bir araştırmada; 55 hindi kıyma örneğinin 40

(% 73.0)'ının *C. perfringens* ile kontamine olduğu belirlenmiştir (230). ABD Tarım Bakanlığı Gıda Güvenliği ve Kontrolü Servisi (USDA/FSIS) tarafından incelenen 296 hindi kıymasının 82 (% 28.1)'sinde *C. perfringens* tespit edildiği bildirilmiştir (163). Türkiye'de yapılan bir çalışmada; Ankara'da marketlerde tüketime sunulan toplam 100 hindi kıyması örneğinin 58 (% 58)'inde *C. perfringens* saptanmıştır (231).

Bu çalışmada kanat ve göğüs ile kanat ve baget örnekleri arasında *C. perfringens* prevalansının istatistiksel açıdan önemli olduğu tespit edildi ( $P < 0.005$ ). Kanat örneklerinde *C. perfringens* prevalansının % 94 gibi yüksek bir oranda bulunması kanatların topoğrafik olarak anatomik yerleşimi, morfolojik yapısı, tavuk kesim prosesi, teknolojik farklılıklar ile uygulanan dekontaminasyon tekniklerinin yetersiz kalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Tavuk parça etlerinin mikrobiyel kalitesi ile ilgili Türkiye'de yapılan bir araştırmada İstanbul'da satışa sunulan çeşitli markalara ait 30 adet kanat, 30 adet but ve 30 adet göğüs olmak üzere toplam 90 adet tavuk parça eti numunesinde toplam mezofil aerobik bakteri sayısı kanatların 29 (% 96.6)'unda, butların 24 (% 90)'ünde ve göğüslerin 21 (% 70)'inde  $5.01-7.01 \log_{10} \text{kob/g}$  arasında, *E. coli* kanat örneklerinin 29 (% 96.6)'unda, but örneklerinin tamamında (% 100) ve göğüs örneklerinin 25 (% 83.3)'inde, anaerob mikroorganizmalar kanat ve butların 5 (% 16.7)'inde, göğüslerin 3 (% 10)'ünde saptanmıştır (232). Benzer bir çalışmada Astorga ve ark. (233), kanat örneklerindeki toplam mezofil aerobik bakteri sayısını yaklaşık olarak  $5.85 \log_{10} \text{kob/g}$ , but örneklerinde ise  $5.79 \log_{10} \text{kob/g}$ , Berrang ve ark. (234) ise tavuk parça etlerinin derili ve derisiz oldukları durumlarda *Campylobacter*, *E. coli*, koliform ve toplam aerobik bakteri yüklerini

belirlemek amacıyla yaptıkları araştırmalarında, ticari bir işletmeden iç organların çıkarılmasından önce ve sonra olmak üzere iki aşamada aldıkları göğüs, kalça ve but eti örneklerinde derideki mikroorganizma yükünün derisiz et kısımlarındaki mikroorganizma yükünden önemli oranda daha fazla olduğunu saptamışlardır.

## **6.2. *C. perfringens*'in Toksin Genlerinin Multipleks PCR ile Belirlenmesi**

*C. perfringens* A tipi gıda kaynaklı hastalık durumlarında dışkı veya gıda materyallerinde yüksek düzeyde *C. perfringens* tespitinin etkenin insan barsak florasında da bulunabilmesinden dolayı epidemiyolojik açıdan bir değerlendirme ve kesin teşhis için yeterli değildir. Bu amaçla şüpheli materyallerden direk ELISA ya da diğer serolojik yöntemler ile enterotoksin varlığının tespitinin yapılması veya elde edilen izolatların toksin genleri veya akrabalık dereceleri yönünden değerlendirilmesi gerekir (165). Serolojik yöntemlerle dışkı gibi klinik materyallerde toksin tespiti mümkün iken gıda maddelerinde etkenin toksin sentezleyebilmesi için optimal koşulların bulunmamasından dolayı serolojik testler ile toksin varlığının tespiti mümkün değildir. Bundan dolayı gıda materyallerinden elde edilen *C. perfringens* izolatlarının moleküler yöntemler ile hızlı ve güvenilir bir şekilde toksin genleri (*cpa*, *cpb*, *etx*, *iA*, *cpe* ve *cpb2*) yönünden değerlendirilmesi gereklidir (165, 180). Bu amaçla günümüze kadar duplex PCR veya multipleks PCR gibi farklı protokoller ile DNA amplifikasyonunu temel alan yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar arasında yer alan multipleks PCR birçok araştırmacı tarafından *C. perfringens*'in toksin genlerine (*cpa*, *cpb*, *etx*, *iA*, *cpe* ve *cpb2*) göre tiplendirilmesinde başarılı bir şekilde kullanılabileceği ifade edilmiştir (167, 168, 180, 184).

Bu çalışmada kültür yöntemi ile *C. perfringens* olarak tespit edilen izolatlar, multipleks PCR ile *cpa*, *cpe*, *cpb*, *etx*, *cpb2* ve *iA* toksin genlerinin varlığı tespit edilerek tiplendirildi. *C. perfringens* olarak belirlenen 558 izolatın 545'inin yalnız *cpa* geni, 12'sinin *cpa* ve *cpb2* geni, 1'inin ise *cpa* ve *cpe* genleri yönünden pozitif olduğu tespit edilerek sırasıyla *C. perfringens* tip A, *cpb2* (+) *C. perfringens* tip A ve *cpe* (+) *C. perfringens* tip A olarak tiplendirildi. *C. perfringens* tip A'nın yeryüzünde geniş bir dağılıma sahip olması ve tüm *C. perfringens* tiplerinde *cpa*'nın ortak gen olması bulguların bu yönde tespit edilmesinde önemli etkisinin olduğu düşünülmektedir.

*C. perfringens* A, B, C, D ve E tiplerinin insan ve hayvanlarda farklı karakterde hastalıklara neden olduğu bildirilmiştir (84). Yapılan epidemiyolojik çalışmalar insanlarda *C. perfringens* tip A kaynaklı zehirlenme vaka ve salgınları *cpe* (+) *C. perfringens* tip A izolatları tarafından sentezlenen enterotoksin ile bağlantılı olduğu yönündedir (69). Ridell ve ark. (197), gıda kaynaklı 36 salgın ile ilişkili 28'i gıdadan ve 43'ü diyareli dışkıdan olmak üzere 71 *C. perfringens* izolatını PCR ile *cpe* geni yönünden inceledikleri çalışmalarında 28 gıda izolatının 24 (% 86)'ünün ve 43 dışkı örneğinin 38 (% 88)'inin *cpe* geni taşıdığını saptamışlardır. Benzer şekilde Fach ve Popoff (179), gıda kaynaklı salgınlarla ilişkili gıda ve biyolojik materyallerden izole edilen 24 *C. perfringens* izolatının tamamının *cpa* ve 7'sinin *cpe* geni yönünden pozitif olduğunu bildirmiştir. Bu durum *cpe* (+) *C. perfringens* tip A izolatlarının gıda, çevre veya klinik izolatlarda belirlenmesini halk sağlığı ve gıda güvenliği açısından öncelikli hale getiren bir unsurdur. Ancak *C. perfringens* tip A izolatlarının çok az bir kısmının (% 1-5) *cpe* geni yönünden pozitif olduğu belirtilmektedir (235, 236). Bu çalışmada da 200

tavuk parça etinden yalnızca 1'inde *cpe* (+) *C. perfringens* tip A tespit edilmiş olması bu durumu destekler niteliktedir. Benzer şekilde Lin ve Labbe (165), 133 gıda örneğinde tespit ettikleri *C. perfringens* izolatlarının tamamının *cpa* geni taşıdığını ancak *cpe* geni yönünden negatif olduğunu saptayarak tüketime sunulan gıda maddelerinde *cpe* izolatlarının çok nadir bulunduğunu ifade etmişlerdir. Erol ve ark. (167), hindi etlerinden izole ettikleri 22 *C. perfringens* izolatını multipleks PCR ile tiplendirdikleri çalışmalarında izolatların tamamının *cpa* genini içerdiğini ancak *cpe*, *cpb*, *etx*, *cpb2* veya *iA* toksin genlerinden herhangi birinin bulunmadığını saptamışlardır. Wen ve McClane (166), 147 tavuk eti örneğinin 56 (% 38.0)'sından izole ettikleri *C. perfringens*'lere uyguladıkları multipleks PCR sonucunda 24 izolatın *cpa*, 27 izolatın *cpb2* ve 1 izolatın *cpe* geni taşıdığını saptamışlardır. Aynı çalışmada, toplam 887 et ve et ürününden elde edilen izolatlarda yapılan multipleks PCR analizlerinde 201 izolatta *cpa*, 47 izolatta *cpb2* ve sadece 10 (% 1.4) örnekte *cpe* (+) *C. perfringens* izole edilebilmiştir. Miki ve ark. (155) ise *C. perfringens*'e bağlı gıda kaynaklı zehirlenmelerin önemli nedenleri arasında yer alan domuz, sığır ve kanatlı etlerinden oluşan toplam 200 hayvansal kaynaklı gıda örneğinden izole ettikleri 212 *C. perfringens* izolatını multipleks PCR ile tiplendirdikleri çalışmalarında, izolatların tamamında (% 100) *cpa*, 143 (% 71.5)'ünde *cpb2* ve 8 (% 3.77)'inde *cpe* genini tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar aynı çalışmada *cpe* pozitif olan izolatların *cpb2* geni içermediğini ve analiz edilen 55 tavuk eti ve kıymasının 93'ünün *C. perfringens* tip A (*cpa* pozitif), 84'ünün *cpb2* (+) tip A ve 1'inin *cpe* (+) tip A olarak belirlemişlerdir.

Enterotoksijenik *C. perfringens*'in diğ er et türlerinde varlığı ile ilgili yapılan bir çalışmada incelenen 315 taze sosis, 100 hamburger eti ve 100 kıyma olmak üzere toplam 515 et örneğinden elde edilen 126 izolatın 123 (% 97.2)'ünün tip A, 2 (% 1.6)'sinin tip C ve 1 (% 0.79)'inin tip E olarak saptandığı ve 9 (% 7.1) izolatın enterotoksin üretebilme kabiliyetinde olduğu bildirilmiştir (168).

Bu çalışmada tavuk parça etlerinden elde edilen *C. perfringens* izolatlarının 12'sinin *cpb2* geni taşıdığı ve *cpe* (+) olarak tespit edilen 1 izolatın *cpb2* geni bulundurmadığı saptandı. Bu çalışmaya benzer olarak gıda maddeleri ile ilgili yapılan araştırmalarda *cpe* ve *cpb2* genlerinin aynı izolatta tespit edildiği bir literatüre rastlanılamamıştır. Epidemiyolojik araştırmalar *cpb2* geni tarafından kodlanan *C. perfringens* beta 2 toksin (CPB2)'in sıcakkanlı hayvanlarda farklı gastro intestinal hastalıklara neden olduğunu göstermektedir (181, 237-239). İnsanlarda ise bu toksine bağlı herhangi bir gıda zehirlenme vakasının olduğu ile ilgili bir veri bulunmamakla beraber plazmidal *cpe* (+) *C. perfringens* izolatlarının insanlarda neden olduğu antibiyotik ilişkili diyareler ile ani ölüm sendromuna bağlı vakalarda *cpb2* geninin rol oynayabileceği belirtilmektedir (69). Fischer ve ark. (240), ani ölüm sendromu ve antibiyotik ilişkili diyarelerden elde edilen 79 plazmidal *cpe* (+) *C. perfringens* izolatı üzerinde yaptıkları çalışmalarında bu izolatların 48'inin *cpb2* genini taşıdığını bildirmiş olmaları bu durumu destekler niteliktedir (240). Aynı araştırmacılar insan gastrointestinal hücre kültürü modellerinde CPB2 toksinin sitotoksik etki gösterdiğini bununda CPE toksinin neden olduğu ani ölüm sendromu ve antibiyotik ilişkili diyarelerdeki semptomatik farklılıkların açıklanmasında önemli bir katkı yaptığını ifade etmişlerdir.

Özellikle tavuk parça etlerinde (but, baget, kanat ve göğüs) *C. perfringens*'in izolasyon, identifikasyon ve toksin tiplendirilmesine yönelik Türkiye'de ve diğer ülkelerde gerçekleştirilmiş sınırlı sayıda araştırma bilgisine rastlanılmıştır. Çalışmalar çoğunlukla evcil hayvanların dışkıları ile kanatlıların barsak veya dışkı örneklerinden etkenin izolasyonu, identifikasyonu ve tiplendirilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır.

### **6.3. Farklı Dondurma Sıcaklıklarının *C. perfringens*'in Yaşamı Üzerine Etkisi**

Türkiye'de ve diğer ülkelerde kanat veya deri gibi farklı gıda matrislerinde farklı dondurma ve muhafaza kombinasyonlarının kullanılarak *C. perfringens*'in yaşam kabiliyetinin incelendiği yeterli sayıda literatür bilgisine rastlanılamamıştır.

Bu çalışma tavuk kanatlarının -12°C'de dondurma ve muhafazanın, -18 °C'de dondurma ve muhafazanın, -40°C'de 1 gün dondurma ve -18 °C'de muhafazanın vejetatif *cpe* (+) *C. perfringens* yaşamı üzerine etkilerini incelemek amacıyla yapıldı. Bakterilerde donmaya bağlı ölümlerin asıl mekanizması tanımlanmamış olmakla birlikte bilim insanları dondurma sırasında mikroorganizmalarda meydana gelen ölümleri veya hasarları farklı dondurma sıcaklığı, dondurarak muhafaza süresi, çözündürme gibi teoriler ile açıklamaya çalışmaktadır.

Trakulchang ve Kraft (62), taze hazırlanmış et ürünlerine inoküle ettikleri vejetatif *C. perfringens* hücrelerini -29°C'de 42 gün muhafazasında vejetatif hücrelerin muhafazanın 1. gününde % 38-75'nin azaldığını, Ladiges ve ark. (241), -20 °C'de dondurarak muhafaza ettikleri sığır kıymasında *C. perfringens* sayısında muhafazanın 1. gününde herhangi bir değişikliğin olmadığını bildirmişlerdir.

Benzer şekilde bu çalışmada da dondurma işleminin 1. gününde I., II. ve III. gruplarda *C. perfringens* miktarında sırasıyla 0.81, 1.03 ve 1.18 log<sub>10</sub> kob/cm<sup>2</sup>'lik bir azalmanın olduğu tespit edildi. Bu sonuçlar dondurma sırasında *C. perfringens* sayısında bir azalmanın olduğunu göstermekle birlikte farklı dondurma sıcaklıklarının dondurma esnasında *C. perfringens* yaşamı üzerine istatistiksel açıdan önemli ancak sayısal anlamda ciddi bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

Bu çalışmada muhafaza sıcaklığına bağlı olarak muhafazanın 112. gününde I. grupta *C. perfringens* sayısı tespit edilebilir limitin altına düşerken II. ve III. gruplarda *C. perfringens* sayısı sırasıyla 4.23 ve 4.30 log<sub>10</sub> kob/cm<sup>2</sup> olarak tespit edildi. Aynı muhafaza süresinde I. grupta *C. perfringens* sayısındaki azalmanın diğer gruplara göre daha fazla olmasının yavaş dondurma ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Bu duruma benzer şekilde Trakulchang ve Kraft (62), et ürünlerinin -29 °C'deki muhafazasında vejetatif *C. perfringens* hücrelerinin muhafazanın 42. gününde % 89.5'nin öldüğünü, Ladiges ve ark. (241), sığır kıymasındaki *C. perfringens* sayısının -20 °C'de 30., 60., 90. ve 120. günlerdeki muhafazasında sırasıyla % 7, % 8, % 14 ve % 3 düzeyinde azaldığını bildirmiştir. Yavaş dondurma sırasında oluşan letal etkinin hızlı dondurmaya göre daha yüksek olduğu ve birçok mikroorganizmanın yavaş dondurma sırasında gıda içinde donmamış su fraksiyonlarına geçtiğini ve hücre dışındaki bu fraksiyonlarda çözelti haldeki gıda suyu içerisinde çözülmüş bileşenlerin daha konsantre hale gelerek bakteri hücrelerinde dehidrasyona ve uzun süre ozmotik strese maruz kalmasına neden olduğu belirtilmektedir (55, 59). Bank ve ark. (242), dondurma sırasında hücre içinde oluşan ilk buz kristal büyüklüğünün muhafaza sıcaklığı ve

süresine bağlı olduğunu, hızlı donma sırasında meydana gelen buz kristallerinin yavaş donmaya göre daha küçük olduğunu ve yavaş donmaya bağlı oluşan buz kristallerinin muhafaza süresince büyüklüğünü yavaş yavaş arttırmaya devam ettirdiğini belirtmiştir. Yapılan başka bir araştırmada dondurma ve dondurarak muhafaza sıcaklıkları düştükçe *Salmonella spp.*, *E. coli* O157:H7 ve *Listeria monocytogenes* gibi gıda kaynaklı patojen bakteriler üzerine letal etkilerinin düştüğü bildirilmiştir (61).

Bu çalışmada muhafazanın sonuna kadar (112.gün) II. grupta  $2.12 \log_{10}$  kob/cm<sup>2</sup>, III. grupta ise  $2.05 \log_{10}$  kob/cm<sup>2</sup>'lik bir azalmanın olduğu tespit edildi. Strong ve Canada (65), tavuk sosunun -17.7 °C'deki muhafazasında 90. ve 180. günlerinde *C. perfringens* sayısında sırasıyla % 95.7 ve % 96.3'lik bir azalmanın olduğunu, Li ve McClane (68), fluid thioglycollate medium da vejetatif *C. perfringens*'in D<sub>20</sub> değerinin 0.6 gün ile 1.5 gün arasında değiştiğini, Trakulchang ve Kraft (62), Ellner's sıvı besiyerinde -29 °C'de muhafazasında vejetatif *C. perfringens*'lerin 28 günde % 99.5'nin öldüğünü bildirmişlerdir. Araştırma sonuçları arasındaki farklılıkların muhtemel diğer değişkenler (dondurma sıcaklığı, muhafaza süresi vb.) dışında dondurma modellemelerinde kullanılan matrikslerin farklı olmasından kaynaklanabileceği ve bu çalışmada materyal olarak deri bütünlüğü bozulmadan tavuk kesim prosesinden tüketiciye kadar ulaşan tavuk kanatlarının kullanılmasının *C. perfringens*'in yaşamı üzerine önemli bir katkısının olabileceği düşünülmektedir. Gıda maddelerinin protein, basit ya da kompleks karbonhidratlar ile trigliserit gibi bileşikleri içermesi bakterilerin donmaya karşı dirençli hale gelmesinde katkı sağlayabildiği belirtilmiştir (243). Tavuk derisi ile ilgili yapılan araştırmalar da tavuk deri ve tüy

foliküllerinde bulunabilen protein, yağ ve yağ asitleri gibi bileşiklerin bakterileri donma sırasında oluşan buz kristallerinden kaynaklanan inhibisyonlardan koruyabileceğini göstermektedir (60). Tavuk derisindeki tüy foliküllerinin altında ve derin kanallarında yapılan mikroskopik incelemelerde aktif veya inaktif olarak mikroaerofilik özellikteki *Camphylobacter jejuni*'nin bulunduğu bildirilmiş olması bu durumu destekler niteliktedir (244).

Dondurma işleminde bakterilerin yaşamı üzerine bakteriye bağlı tür ve suş özellikleri ile hangi gelişme fazında olduğu gibi bazı intrinsik faktörlerin önemli rol oynayabileceği belirtilmektedir (245). *C. perfringens* tip A gıda kaynaklı zehirlenmelerinin çok önemli bir kısmının kromozomal *cpe* (+) izolatlar tarafından oluşturulduğu, bunun da kromozomal *cpe* (+)'lerin, plazmidal *cpe* (+)'lere göre çevresel streslere ve muhafaza yöntemlerine daha dayanıklı olmasından kaynaklandığı ifade edilmektedir (69). Li ve McClane (68), kromozomal ve plazmidal kaynaklı *cpe* (+) *C. perfringens* tip A izolatlarına ait vejetatif formlarının Fluid Thioglycolate Medium (FTM) içinde 4 °C ve -20 °C'deki sıcaklıklarda yaşam kabiliyetini inceledikleri araştırmalarında vejetatif NCTC 10239 (kromozomal kaynaklı *cpe*) suşu için 4 °C (D<sub>4</sub>) ve -20 °C (D<sub>20</sub>)'deki D değerinin sırasıyla 11 gün ve 1.5 gün, vejetatif 458 suşunun (plazmidal kaynaklı *cpe*) D<sub>4</sub> ve D<sub>20</sub> değerini sırasıyla 1.8 gün ile 0.6 gün olarak saptamışlardır. Aynı çalışmada araştırmacılar farklı gıda kaynaklı zehirlenme vakalarından elde edilen 8 kromozomal *cpe* (+) *C. perfringens* izolatı ile insan ve evcil hayvanlardan elde edilen 7 plazmidal *cpe* (+) *C. perfringens* izolatının D<sub>20</sub> değerlerinin plazmidal *cpe* (+) izolatlardan 3 kat daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada tavuk kanatlarının kontaminasyonu için kromozomal

kaynaklı *cpe* (+) *C. perfringens* tip A suşu (NCTC 8239)'nun kullanılmış olmasının dondurarak muhafazanın sonuna kadar (112. gün) etkenin varlığını devam ettirebilmesinde katkısının olabileceği düşüncesini destekler niteliktedir.

Bu çalışmada farklı sıcaklıklarda dondurularak muhafaza edilen kanat örnekleri FSIS tarafından önerildiği şekilde 4 °C'de çözündürülmüştür. Özellikle I. gruptaki ölümlerin muhafaza sıcaklığı ve süresine paralel olarak diğer gruplara göre daha şiddetli olmasında çözündürme sıcaklığının katkısının olduğu düşünülmektedir. Gıda maddelerinin 4 °C ve altında erimeye bırakılmasında çözündürme süresinin önemli bir bölümünün donma noktasının altında veya donma noktası civarında bulunmasının yaralı bakteriler üzerine letal etkinin daha ciddi olmasında önemli olduğu belirtilmiştir (60). Trakulchang ve Kraft (62), farklı et ürünlerini dondurarak muhafaza ettikleri çalışmalarında çözündürme işleminin 5 °C'de gerçekleştirildiği gruptaki *C. perfringens* sayısındaki azalmanın çözündürme işlemi yapılmadan direk analize alınan gruba göre daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Bakterilerde meydana gelen hücresel yaralanmaların yavaş dondurarak muhafazaya bağlı olarak zamanla arttığı bu durumun ise bakteri hücrelerinde onarılması mümkün olmayan hasarlara neden olduğu ve çözündürme işleminin yaralı bakterilerin daha duyarlı hale gelmesinde önemli olduğu vurgulanmaktadır (60).

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Dünyada ve Türkiye’de tavuk eti ve ürünlerinin tüketimindeki hızlı artış halk sağlığı ve gıda güvenliği açısından bu ürünlerde bulunabilen *C. perfringens* gibi patojen bakterilerin önemini arttıran bir durumdur. Bu çalışmada, Elazığ ilinde satışa sunulan toplam 200 tavuk parça eti örneğinin 154 (% 77)’ünün *C. perfringens* ile kontamine olduğu saptanmıştır. Farklı satış noktalarından toplanan örneklerin farklı yerel ve ulusal firmalara ait olması tavuk parça etlerinde tespit edilen *C. perfringens* düzeyinin Türkiye’deki muhtemel prevalansı açısından önemli olabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışma ile Türkiye’de tavuk parça etlerinde *C. perfringens* varlığı ilk kez multipleks PCR ile *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA*, *cpe* ve *cpb2* toksin gen varlığı belirlenerek tiplendirilmiştir. Ayrıca gıda kaynaklı salgın veya vaka durumlarında şüpheli gıda materyallerinden elde edilen izolatlarda multipleks PCR ile *C. perfringens* toksin genlerinin belirlenmesi hızlı ve güvenilir bir şekilde yapılabileceği belirlenmiştir.

*C. perfringens*’in ubiquiter özellikte olması, tavuk barsak florasında bulunabilmesi ve tavuk etlerinin çiftlikten sofraya kadar olan süreçte birçok aşamada bu bakteri ile kontamine olma riski, halk sağlığı ve gıda güvenliği açısından önemsenmesi gereken bir konudur. Bundan dolayı tavuk etlerinde kesim işleminden satışa sunulmasına kadar olan tüm aşamalarda hijyenik koşullara azami düzeyde dikkat edilmesi ve HACCP gibi uluslararası gıda güvenliği sistemlerinin uygulanmasında gereken hassasiyetin gösterilmesine önem verilmelidir.

Bu çalışmada özellikle tavuk etlerinin uzun süre muhafazasında organoleptik ve kimyasal özellikleri ile mikrobiyal kalitesinin korunması için

önerilen dondurarak muhafaza sıcaklıklarının *C. perfringens*'in yaşamı üzerine önemli etkilerinin olduğu saptandı. Düşük sıcaklıklarda yaşam kabiliyetinin diğer patojenlere göre duyarlılığının fazla olması ile bilinen *C. perfringens*'in bu çalışma sonucunda özellikle -18°C ve altındaki sıcaklık koşullarında uzun süre canlılığını koruyabildiği tespit edildi. Bu kapsamda bilim dünyasında genel kabul gören ve dondurarak muhafaza sıcaklığı olan minimum -18°C ve altındaki değerlerin tavuk kanatlarında *C. perfringens*'in vejetatif formları üzerine muhafaza süresince beklenen etkiyi göstermediği ve bu sıcaklıklarda bekletilen tavuk kanatlarının potansiyel bir tehlike oluşturabileceği saptandı. *C. perfringens* sayısının -12 °C'de muhafazanın 112. gününde tespit edilebilir limitin altına düşmesi önemli bir etki olmakla beraber bu sıcaklık değerinin ürünün raf ömrü açısından yaratacağı olumsuzluklar dikkate alınmalıdır.

## 7. KAYNAKLAR

- 1- Bryan FI, Doyle MP. Health risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. J Food Prot 1995; 58 (3): 326-344
- 2- Aktaş N. Tavuk Etinin Beslenmemizdeki Yeri ve Önemi, Gıda Teknolojisi 1997; 23: 41-47
- 3- Anonim. Kanatlı Yetiştiriciliği (Türkiye ve Dünyada Kanatlı Sektörünün Genel Durumu) <http://www.tarim.gov.tr/Files/uretim/hayvancilik/KanatliYetistiriciligi/KanatliYetistiriciligi25102011.pdf> / 16.04.2012.
- 4- Anonim. “Kanatlı Sektörü Özet Raporu” <http://www.besd-bir.org/sectorraporu.htm> / 16.04.2012
- 5- Bilgili SF. Future of Poultry in The Global Market. XV. European Symposium on The Quality of Poultry Meat. Kuşadası, Turkey, 2001.
- 6- Cevger Y, Sarıözkan S and Güler H. The effect of the sale of whole or cut up chicken meat on enterprise income according to season. Turk J Vet Anim Sci 2002; 28: 399-402.
- 7- Şengör E. Türk tavukçuluk sektörünün durumu ve dünya ile karşılaştırma. Gıda Teknolojisi 2002; 6 (9): 18-20.
- 8- Mulder RWA, van der Hulst MC, and Bolder NM. Research note: *Salmonella* decontamination of broiler carcasses with lactic acid, L-cystein, and hydrogen peroxide. Poultry Sci 1987; 66: 1555-1557.
- 9- Buzby JC, Roberts T. The economics of enteric infections: Human foodborne disease costs Gastroenterology 2009; 136 (6): 1851–1862.
- 10- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, et al. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. Emerg Infect Dis 2011; 17: 7–15.
- 11- Bostan K. ve Özgen Ö. Kanatlı kesimhanelerinde karkasların mikrobiyolojik kalitesini iyileştirmek için kullanılan yöntemler. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 1995; 21 (2): 452-461.
- 12- Bremner A. Johnston, M. Poultry meat hygiene and inspection. University Press, Cambridge London 1996.
- 13- Kanatlı Ar-Ge yayınları. Kanatlı etleri ve gıda güvenliği. Bey ofset, Ankara Türkiye 2001.
- 14- Kozacinski L, Hadziosmanovic M, Zdolec N. Microbiological quality of poultry meat on the Croatian market. Vet. Arhiv. 2006; 76: 305–313.
- 15- James C, Vincent C, Lima TI, James SJ. The primary chilling of poultry carcasses—a review. Int J Food Refrig 2006; 29: 847–62.
- 16- Al-Dughaym A, Al-Tabari G. Safety and quality of some chicken meat products in Al-Ahsa markets—Saudi Arabia. Saudi J of Biol Sci 2010; 17: 37–42.
- 17- Ward N. New directions and interactions in metagenomics research. FEMS Microbiol Ecol 2006; 3: 331–338.
- 18- Welch WH, and Nuttall, GHF. A gas producing bacillus (*Bacillus aerogenes capsulatus*, nov. spec.) capable of rapid development in the blood vessels after death. Bull Johns Hopkins Hosp 1892; 3: 81-91.
- 19- Delépine S. The bearing of Outbreaks of Food Poisoning upon the Etiology of Epidemic Diarrhoea. J Hyg 1903; 3: 68-94
- 20- Cato E, George WL, and Finegold S. Genus *Clostridium*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1986; 2: 1141-1200.
- 21- Skerman V, McGowan V, and Sneath P. Approved Lists of Approved Bacterial Names. American Society for Microbiology, Washington DC, USA 1980.

- 22- Williamson ED and Titball RW. A genetically engineered vaccine against a-toxin of *Clostridium perfringens* protects mice against experimental gas gangrene. *Vaccine* 1993; 11: 1253–1258.
- 23- Hughes JA, Turnbull PCB, Stringer MF. A serotyping scheme for *C. welchii* (*C. perfringens*) type A, and studies on the type-specific antigens. *J Med Microbiol* 1976; 9:475–485.
- 24- Goldman E, Green LH. *Practical Handbook of Microbiology*. Second Edition, CRC Press; USA, 2008.
- 25- Dworkin M. *Prokaryotes-A Handbook on the Biology of Bacteria*. Springer Science Business Media, LLC 2006.
- 26- Nauery B, Pedersen K, and Madsen M. Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among *C. perfringens* isolates from chickens. *Vet Microbiol* 2003; 94: 257-266.
- 27- Smedley JG, and McClane BA. Fine mapping of the N-terminal cytotoxicity region of *C. perfringens* enterotoxin by site-directed mutagenesis. *Infect Immun* 2004; 72: 6914-6923.
- 28- Canard B, Cole ST. Genome Organization of the Anaerobic Pathogen *C. perfringens*. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 6676-6680.
- 29- Young DI, Evans VJ, Jefferies JR, et al. Genetic methods in clostridia. *Methods Microbiol* 1999; 29: 191-207.
- 30- Myers GSA, Rasko DA, Cheun JK, et al. Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *C. perfringens*. *Genome Res* 2006; 16: 1031.
- 31- Erol İ. *Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi*. Pozitif Matbaacılık Ltd. Şti. Ankara Türkiye, 2007.
- 32- Johnson S, Gerding DN. Enterotoxemic infections. in the clostridia: molecular biology and pathogenesis. eds Rood JI, McClane BA, Songer JG, Titball RW. Academic Press, London, United Kingdom, 1997.
- 33- Labbe RG. *C. perfringens*, In M.P. Doyle (ed.), *Foodborne Bacterial Pathogens*. New York 1989.
- 34- Labbe RG and Huang TH. Generation times and modeling of enterotoxin-positive and enterotoxin-negative strains of *C. perfringens* in laboratory media and ground beef. *J Food Prot* 1995; 58: 1303-1306.
- 35- Willardsen RR, Busta FF, Allen CE and Smith LB. 1978. Growth and survival of *C. perfringens* during constantly rising temperatures. *J Food Sci* 1978; 43: 470-475.
- 36- Shoemaker SP and Pierson MD. "Phoenix phenomenon" in growth of *C. perfringens*. *Appl Environ Microbiol* 1976; 32: 803-807.
- 37- Beerens H, Sugama S, Tahon-Castel M. Psychrotrophic Clostridia. *J Appl Bacteriol* 1965; 28: 36-48.
- 38- Juneja VK, Whiting RC, Marks HM and Snyder OP. Predictive model for growth of *C. perfringens* at temperatures applicable to cooling of cooked meat. *Food Microbiol* 1999; 16: 335-349.
- 39- Fapohunda AO, McMillin KW, Marshall DL and Waites WM. Growth of selected cross-contaminating bacterial pathogens on beef and fish at 15 and 35°C. *J Food Prot* 1994; 57: 337-340.
- 40- Goepfert JM and Kim HU. Behavior of selected food-borne pathogens in raw ground beef. *J Milk Food Technol* 1975; 38: 449-452.
- 41- Hall HE and Angelotti R. *C. perfringens* in meat and meat products. *Appl Microbiol* 1965; 13: 352-357.

- 42- Mead GC. Combined effect of salt concentration and redox potential of the medium on the initiation of vegetative growth by *Clostridium welchii*. J Appl Bacteriol 1969; 32: 468-475.
- 43- Mead GC. Growth and sporulation of *Clostridium welchii* in breast and leg muscle of poultry. J Appl Bacteriol 1969; 32: 86-95.
- 44- Barnes EM, Despaul JE and Angram M. The behavior of a food-poisoning strain of *C. perfringens* in beef. J Appl Bacteriol 1963; 26: 415-427.
- 45- Jong AEI. Spores&Cell, Media&Modelling. PhD Thesis Wageningen University, The Netherlands, 2003.
- 46- Traci P and Duncan CL. Cold shock lethality and injury in *C. perfringens*. Appl Microbiol 1974; 28: 815-821.
- 47- Pearson CB and Walker HW. Effect of Oxidation-reduction potential upon growth and sporulation of *C. perfringens*. J Milk Food Technol 1976; 39: 421-425.
- 48- Willardsen RR, Busta FF and Allen CE. 1979. Growth of *C. perfringens* in three different beef media and fluid thioglycollate medium at static and constantly rising temperatures. J Food Prot 1979; 42: 144-148
- 49- Sabah JR. Evaluation of organic salts and spices for the control of *C. perfringens* in cooked vacuum-packaged ground beef products during alternative cooling procedures. Kansas: PhD Dissertation Kansas University, 2003.
- 50- Jay JM. Food poisoning caused by Gram-positive sporeforming bacteria. in: Modern Food Microbiology USA: AVI Book, 1992.
- 51- Adams MR, Moss MO. Bacterial agents of foodborne illness. in: Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry, Cambridge. 1995: 177-181.
- 52- González MM. Heat resistance and outgrowth of *C. perfringens* spores as affected by the type of heating medium, and heating and cooling rates in ground pork. Teksas: PhD Dissertation, Texas University, 2008.
- 53- Gough BJ and J. Alford JA. Effect of curing agents on the growth and survival of food poisoning strains of *C. perfringens*. J Food Sci 1965; 30: 1025-1028.
- 54- Roberts TA, Pitt JI, Farkas J & Grau FH (eds.) Microorganisms in foods. 6: Microbial ecology of food commodities. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. London: Blackie Academic & Professional 1998.
- 55- Gill CO. Microbial control with cold temperatures. In V.K. Juneja & J.N. Sofos, *Control of foodborne microorganisms*. New York: Marcel Dekker, Inc. 2002: 55-74.
- 56- Farkas J. Physical methods of food preservation. In M.P. Doyle, L.R. Beuchat & T.J. Montville, *Food Microbiology: Fundamentals and frontiers*. Washington D.C: ASM Press, 1997: 497-519.
- 57- Varlık C. Su Ürünleri İşleme Teknolojisi. İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, İstanbul 2004.
- 58- Guerrero-Legarreta I. Handbook of poultry science and technology Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2009.
- 59- Ayres JC, Mundt JO & Sandine WE. Microbiology of foods. San Francisco: W.H. Freeman and Company, 1980.
- 60- Whyte RJ, Hudson JA, Turner NJ. Effect Of Low Temperature On *Campylobacter* On Poultry Meat. [http://foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Effect\\_Temperature-Assessment\\_Freezing.pdf](http://foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Effect_Temperature-Assessment_Freezing.pdf) / 20.04.2012
- 61- Archer DL. Freezing: an underutilized food safety technology? Int J Food Microbiol 2004; 90: 127-138.

- 62- Trakulchang SP, Kraft AA. Survival of *C. perfringens* refrigerated and frozen meat and poultry items. *J Food Sci* 1977; 42: 518–521
- 63- Harmon SM, and Kautter DA. Method for Estimating the Presence of *C. perfringens* Food. *Appl Environ Microbiol* 1970; 20(6): 913-918
- 64- Juneja VK, Snyder OP, Cygnarowicz-Provost M. Influence of cooling rate on outgrowth of *C. perfringens*. *J Food Prot* 1994; 57: 1063–1067
- 65- Strong DH and Canada JC. Survival of *C. perfringens* frozen chicken gravy. *J Food Sci* 1964; 29: 479.
- 66- Fruin JT and Babel FJ. Changes in the population of *C. perfringens* Type A frozen in a meat medium. *J Food Prot* 1977; 40: 622-625.
- 67- Canada JC, Strong DH and Scott LG. Response of *C. perfringens* spores and vegetative cells to temperature variation. *Appl Microbiol* 1964; 12: 273-276.
- 68- Li J and McClane BA. Further comparison of temperature effects on growth and survival of *C. perfringens* type A isolates carrying a chromosomal or plasmid-borne enterotoxin gene. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 4561-4568.
- 69- Lindström M, Heikinheimo A, Lahti P, Korkeala H. Novel insights into the epidemiology of *C. perfringens* type A food poisoning. *Food Microbiol* 2011; 28(2): 192–8.
- 70- Shimizu T, BA-Thein W, Tmaki J, Hayashi H. The *virR* gene, a member of a class of two-component response regulators, regulates the production of the perfringolysin O, collagenase, and hemagglutinin in *C. perfringens*. *J Bacteriol* 1994; 176: 1616-1623.
- 71- Banu S, Ohtani K, Yaguchi H, et al. Identification of novel VirR/VirS-regulated genes in *C. perfringens*. *Mol. Microbiol* 2000; 35 (4): 854-864.
- 72- Ohtani K, Hayashi H, Shdvuzu T. The *luxS* gene is involved in cell-cell signaling for toxin production in *C. perfringens*. *Mol Microbiol* 2002; 44 (1): 171-179.
- 73- Titball RW, Naylor CE and Basak AK. The *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Anaerobe* 1999; 5: 51-64.
- 74- Canard B, Saint-Joanis B, and Cole ST. Genomic diversity and organization of virulence genes in the pathogenic anaerobe *C. perfringens*. *Mol Microbiol* 1992; 6: 1421-1429.
- 75- Macfarlane MG and Knight BC. The biochemistry of bacterial toxins: The lecithinase activity of *Cl. welchii* toxins. *Biochem J* 1941; 35: 884-902.
- 76- Rood JI. The clostridia: molecular biology and pathogenesis. Academic Press, San Diego, Calif, 1997.
- 77- Awad MM, Ellemor DM, Boyd RL, Emmins JJ, and Rood JI. Synergistic effects of alpha-toxin and perfringolysin O in *Clostridium perfringens*-mediated gas gangrene. *Infect Immun* 2001; 69: 7904-7910.
- 78- Al-Sheikhly F, and Truscott RB. The interaction of *Clostridium perfringens* and its toxins in the production of necrotic enteritis of chickens. *Avian Dis* 1977; 21: 256-263.
- 79- Fukata T, Hadate Y, Baba E, Uemura T, and Arakawa A. Influence of *C. perfringens* and its toxin in germ-free chickens. *Res Vet Sci* 1988; 44: 68-70.
- 80- Keyburn AL, Sheedy SA, Ford ME, et al. Alpha-toxin of *C. perfringens* not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. *Infect Immun* 2006; 74: 6496-6500.
- 81- Hunter SE, Brown JE, Oyston PC, Sakurai J, and Titball RW. Molecular genetic analysis of beta-toxin of *C. perfringens* reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 1993; 61: 3958-3965.

- 82- Jolivet-Reynaud C, Popoff MR, Vinit MA, et al. Enteropathogenicity of *C. perfringens*  $\beta$ -toxin and other clostridial toxins. Zentralblatt Bakteriologie. Mikrobiol. Hyg. Suppl. 1986; 15: 145-151.
- 83- Murrell TG and Roth L. Necrotizing jejunitis: a newly discovered disease in the highlands of New Guinea. Med J Aust 1963; 50(1): 61-69.
- 84- Petit L, Gibert M and Popoff MR. *C. perfringens*: toxinotype and genotype. Trends Microbiol 1999; 7: 104–110.
- 85- Hunter SE, Clarke IN, Kelly DC and Titball RW. Cloning and nucleotide sequencing of the *C. perfringens* epsilon-toxin gene and its expression in *Escherichia coli*. Infect Immun 1992; 60: 102-110.
- 86- Niilo L. Enterotoxemic *C. perfringens*. In C.L. Gyles, and CO. Thoen (eds.), *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*, 2<sup>nd</sup> ed., Iowa State University Press, 1993.
- 87- Marvaud JC, et al. *C. perfringens* iota toxin. Mapping of the Ia domain involved in docking with Ib and cellular internalization. J Biol Chem 2002; 277: 43659–43666.
- 88- Perelle S, M Gibert, P Boquet and Popoff MR. Characterization of *C. perfringens* iota-toxin genes and expression in *Escherichia coli*. Infect Immun 1993; 61: 5147-5156.
- 89- Simpson LL, Stiles BG, Zepeda H and Wilkins TD. Production by *Clostridium spiroforme* of an iota like toxin that possesses mono (ADP-ribosyl) transferase activity: identification of a novel class of ADP-ribosyltransferases. Infect Immun 1989; 57: 255-261.
- 90- Gibert M, Jolivet-Reynaud C, Popoff MR. Beta2 toxin, a novel toxin produced by *C. perfringens*. Gene 1997; 203: 65–73.
- 91- Fisher DJ. *C. Perfringens*  $\beta$ 2 toxin: A potential accessory toxin in gastrointestinal diseases of humans and domestic animals. PhD Thesis. Univ. Pittsburgh, Pittsburgh, PA. 2006.
- 92- Skjelkvale R and Uemura T. Experimental diarrhea in human volunteers following oral administration of *C. perfringens* enterotoxin. J Appl Bacteriol 1977; 46: 281–286.
- 93- Stark RL, Duncan CL. Purification and biochemical properties of *C. perfringens* type A enterotoxin. Infect Immun 1972; 6 (5): 662-673.
- 94- Kokai-Kun JF, McClane BA. *Enterotoxemic infections*. in: *The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis*, Eds.: Rood, J., McClane, B.A., Songer, J.G., Titball, R.W. Academic Press, London, 1997.
- 95- Richardson M, Granum PE. The amino acid sequence of enterotoxin from *C. perfringens* type A. FEBS Lett 1985; 182: 479-484.
- 96- Katahira J, Inoue N, Horiguchi Y, Matsuda M, Sugimoto N. Molecular cloning and functional characterization of the receptor for *C. perfringens* enterotoxin. J. Cell Biol 1997; 136: 1239- 1247
- 97- McClane BA. *C. perfringens* enterotoxin and intestinal tight junctions. Trends Microbiol 2000; 8: 145- 146.
- 98- Granum P. *C. perfringens* toxins involved in food poisoning. Int J Food Microbiol 1990; 10: 101-112.
- 99- Brynestad S, Granum PE. *C. perfringens* and foodborne infections. Int J Food Microbiol 2002; 74: 195-202.
- 100- Granum PE, Whitaker JR, Skjelkva Le R. Trypsin activation of enterotoxin from *C. perfringenstype* A. Biochim Biophys Acta 1981; 688: 325- 332.
- 101- Sakaguchi G, Uemura T and Riemann HP. A simplified method for purification of *C. perfringenstype* A enterotoxin. Appl Microbiol 1973; 27: 762-767.

- 102- Shimizu T, Ohtani K, Hirakawa H, et al. Complete genome sequence of *C. perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc Natl Aca Sci* 2002; 99: 996-1001.
- 103- Huang IH, Waters M, Grau RR and Sarker MR. Disruption of the gene (*spo0A*) encoding sporulation transcription factor blocks endospore formation and enterotoxin production in enterotoxigenic *C. perfringens* type A. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 233(2): 233–240.
- 104- O'Brien DK, and Melville SB. Effects of *Clostridium perfringens* alpha-toxin (PLC) and perfringolysin O (PFO) on cytotoxicity to macrophages, on escape from the phagosomes of macrophages, and on persistence of *C. perfringens* in host tissues. *Infect Immun* 2004; 72: 5204–5215
- 105- Rood JI and Cole ST. Molecular genetics and pathogenesis of *C. perfringens*. *Microbiol Rev* 1991; 55: 621–648.
- 106- Awad MM, Bryant AE, Stevens DL and Rood JI. Virulence studies on chromosomal theta toxin and theta toxin mutants constructed by allelic exchange provide genetic evidence for the essential role of -toxin in *C. perfringens*-mediated gas gangrene. *Mol Microbiol* 1995; 15: 191–202.
- 107- Lobry JR. Asymmetric substitution patterns in the two DNA strands of bacteria. *Mol. Biol. Evol.* 1996; 13: 660-665.
- 108- Stevens DL, Tweten RK, Awad MM, Rood JI and Bryant AE. Clostridial gas gangrene: Evidence that alfa and theta toxins differentially modulate the immune response and induce acute tissue necrosis. *J Infect Dis* 1997; 176: 189–195.
- 109- Mollby R and Holme T. Production of phospholipase C (alpha-toxin), haemolysins and lethal toxins by *C. perfringens* types A to D. *J Gen Microbiol* 1976; 96: 137–144.
- 110- Cornillot E, Saintjoanis B, Daube G, Katayama S, Granum PE, Canard B and Cole ST. The enterotoxin gene (*cpe*) of *C. perfringens* can be chromosomal or plasmid-borne. *Mol Microbiol* 1995; 15: 639-647.
- 111- Sarker M R, Carman RJ, McClane BA. Inactivation of the gene (*cpe*) encoding *Clostridium perfringens* enterotoxin eliminates the ability of two *cpe*-positive *C. perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates to affect rabbit ileal loops. *Molecular Microbiology* 1999; 33: 946–958.
- 112- Li J, Miyamoto K, McClane BA. Comparison of virulence plasmids among *Clostridium perfringens* type E isolates. *Infect Immun* 2007; 75: 1811-1819.
- 113- Raju D, Sarker MR. Comparison of the levels of heat resistance of wild-type, *cpe* knockout, and *cpe* plasmid-cured *Clostridium perfringens* type A strains. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 7618-7620.
- 114- Brynstad S and Granum PE. Evidence that Tn5565, which includes the enterotoxin gene in *C. perfringens*, can have a circular form which may be a transposition intermediate. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 170: 281-286.
- 115- Brynstad S, Synstad B, Granum PE. The *C. perfringens* enterotoxin gene is on a transposable element in type A human food-poisoning strains. *Microbiology* 1997; 143: 2109-2115.
- 116- Collier PW, Sharp JCM, Macleod AF, Forbes GI, Mackay F. Food poisoning in hospitals in Scotland, 1978-1987. *Epidemiol Infect* 1988; 101(3): 661-667.
- 117- Sparks SG, Carman RJ, Sarker MR, McClane BA. Genotyping of enterotoxigenic *C. perfringens* fecal isolates associated with antibiotic-associated diarrhea and food poisoning in North America. *J Clin Microbiol* 2001; 39 (3): 883-888.
- 118- Miyamoto K, Chakrabarti G, Morino Y and McClane BA. Organization of the plasmid *cpe* locus in *C. perfringens* type A isolates. *Infect Immun* 2002; 70: 4261-4272.

- 119- Brynstad S, Sarker MR, McClane BA, Granum PE and Rood JI. Enterotoxin plasmid from *C. perfringens* is conjugative. *Infect Immun* 2001; 69: 3483-3487.
- 120- Minami J, Katayama S, Matsushita O, Matsushita C, Okabe A. Lambda-toxin of *C. perfringens* activates the precursor of epsilon-toxin by releasing its N- and C-terminal peptides. *Microbiol Immunol* 1997; 41: 527-535.
- 121- Adak GK, Long SM and O'Brien SJ. Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. *Gut* 2002; 51: 832-841.
- 122- Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM and Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 607-625.
- 123- Tanaka D, Isobe J, Hosorogi S, et al. An outbreak of food-borne gastroenteritis caused by *C. perfringens* carrying the *cpe* gene on a plasmid. *Jpn J Infect Dis* 2003; 56: 137-139
- 124- Tanaka D, Kimata K, Shimizu M, et al. Genotyping of *C. perfringens* isolates collected from food poisoning outbreaks and healthy individuals in Japan based on the *cpe* locus. *Jpn J Infect Dis* 2007; 60: 68-69
- 125- Grant KA, Kenyon S, Nwafor I, et al. The identification and characterization of *C. perfringens* by real-time PCR, location of enterotoxin gene, and heat resistance. *Foodborne Pathog Dis* 2008; 5: 629-639
- 126- Lund BM, Baird-Parker TC and Gould GW. The microbiological safety and quality of food. Aspen Publishers, Gauthersburg, USA, 2000.
- 127- McClane BA. *C. perfringens*. In: Food microbiology: fundamentals and frontiers, 2nd ed. ASM Press, Washington DC, USA, 2001.
- 128- Ackermann G, Thomalla S, Ackermann F, Schaumann R, Rodloff AC and Ruf BR. Prevalence and characteristics of bacteria and host factors in an outbreak situation of antibiotic-associated diarrhoea. *J Med Microbiol* 2005; 54: 149-153.
- 129- Modi N and Wilcox MH. Evidence for antibiotic induced *C. perfringens* diarrhoea. *J Clin Pathol* 2001; 54: 748-751.
- 130- Harrison B, Raju D, Garmory HS, et al.. Molecular characterization of *C. perfringens* isolates from humans with sporadic diarrhea: evidence for transcriptional regulation of the beta2-toxin-encoding gene. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 8362-8370.
- 131- Rood JI. Virulence genes of *C. perfringens*. *Ann Rev Microbiol* 1998; 52: 533-560.
- 132- Hobbs BC and Sutton RGA. Characteristics of spores *Clostridium welchii* in relation to food hygiene, In V. Fredetti (ed.), *The Anaerobic Bacteria; Proceedings of an International Workshop*. University of Montreal, Canada, 1967.
- 133- Sutton RGA, Kendall M and Hobbs BC. The effect of two methods of cooking and cooling on *Clostridium welchii* and other bacteria in meat. *Journal of Hygiene (Cambridge)* 1972; 70: 415-424
- 134- Woodburn M and CH Kim. Survival of *C. perfringens* during baking and holding of turkey stuffing. *Appl Microbiol* 1966; 14: 914-920.
- 135- Dische FE and Elek SD. Experimental food-poisoning by *C. welchii*. *Lancet* 1957; 2: 71-74.
- 136- Shandera WX, Tacket CO, and Blake PA. Food poisoning due to *Clostridium perfringens* in the United States. *J Infect Dis* 1983; 147: 167-170.
- 137- Tansuphasiri U. Development of duplex PCR assay for rapid detection of enterotoxigenic isolates of *Clostridium perfringens*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001; 32: 105-113.

- 138- Bean NH, Goulding JS, Lao C and Angulo FJ. 1996. Surveillance for foodborne-disease outbreaks - United States, 1988-1992. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. MMWR CDC Surveill Summ 1996; 45: 1-55.
- 139- Bean NH, Griffin PM, Goulding JS and Ivey CB. "Foodborne Disease Outbreaks, 5 Year Summary, 1983-1987". *MMWR CDC Surveill Summ* 1996; 45(5):1-66
- 140- Montville T and Matthews K. *Food Microbiology: An introduction* (2 ed). Washington D.C., ASM Press. 2008; 221-222.
- 141- Lynch J, Painter J, Woodruff R, Braden C. Surveillance for foodborne-disease outbreaks—United States, 1998-2002. *MMWR CDC Surveill Summ* 2006; 55: 1–42.
- 142- Todd ECD. Preliminary estimates of costs of foodborne disease in the United States. *J Food Prot* 1989; 52: 595-601.
- 143- ICMSF. *C. perfringens*. In Roberts TA *et al.* (ed.), *Microorganisms in Foods 5. Characteristics of Microbial Pathogens*. Blackie Academic & Professional, London, UK. 1996.
- 144- Guzman Ams, Micalizzi B, Pagano Cet, Gimenez Df. Incidence of *C. perfringens* in fresh sausages in Argentina. *J Food Prot* 1990; 52 (3): 173-175.
- 145- Sharma NK, Saini SS, Gill JPS, Kwatra MS. Occurrence of *C. perfringens* in uncooked cock-tail sausages at retail level and its public health significance. *Indian J Anim Sci* 1993; 63 (2): 112-114.
- 146- Matches JR, Liston J, Curran D. *C. perfringens* in the environment. *Appl Environ Microbiol* 1974; 28: 655–660
- 147- Saito, M. Production of enterotoxin by *C. perfringens* derived from humans, animals, foods and the natural environment in Japan. *J Food Prot* 1990; 53 (2): 115-118.
- 148- Aschfalk A, Müller W. *C. perfringenstoxin* types from wild-caught Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) determined by PCR and ELISA. *Can J Microbiol* 2002; 48: 365–368
- 149- Mckillop EJ. Bacterial contamination of hospital food with special reference to *Clostridium welchii* food poisoning. *Journal of Hygiene* 1959; 57: 31-46.
- 150- Hobbs BC, Smith ME, Oakley CL, Warrack HG And Cruickshank JC. *Clostridium welchii* food poisoning. *J Hyg* 1953; 51: 74-101.
- 151- Caballero B, Trugo LC, Finglas PM. *Encyclopedia of food sciences and nutrition* (second ed.) Academic Press, Elsevier Science Ltd, Oxford, 2003.
- 152- I-Chen Yang, Jan-Yi Wang and Daniel Yang-Chih Shih. The Level of Fecal Carriage and the Toxic Potential of *C. perfringens* in the Feces of a Taiwan Subpopulation. *Journal of Food and Drug Analysis* 2006; 14 (1): 82-89
- 153- Heikinheimo A, Lindström M, Granum PE, Korkeala H. Humans as reservoir for enterotoxin gene-carrying *C. perfringenstyp* A. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 1724-1729.
- 154- Miwa N, Nishina T, Kubo S, Honda H. Most Probable Numbers of enterotoxigenic *C. perfringens* in intestinal contents of domestic livestock detected by nested PCR. *J Vet Med Sci* 1997; 59 (7): 557-560.
- 155- Miki Y, Miyamoto K, Kaneko-Hirano I, Fujiuchi K, Akimoto S. Prevalence and characterization of enterotoxin gene carrying *C. perfringens* from retail meat products in Japan. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74 (17): 5366-5372
- 156- Çakmak Ö. Ankara’da tüketime sunulan sığır kıymalarında *C. perfringens*’in varlığı ve kontaminasyon düzeyinin belirlenmesi. Yüksek Lisans tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye 2001.
- 157- Anonim. A UK-wide survey of microbiological contamination of fresh red meats on retail sale <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/fsis0110redmeat.pdf> 22.04.2012

- 158- Bauer FT, Carpenter JA and Reagan JO. Prevalence of *C. perfringens* pork during processing. J Food Prot 1981; 44: 279-283.
- 159- Taormina PJ, Bartholomew GW and Dorsa WJ. Incidence of *C. perfringens* in commercially produced cured raw meat product mixtures and behavior in cooked products during chilling and refrigerated storage. J Food Prot 2003; 66: 72-81
- 160- Atwa EI, Abou EI-Roos AN. Incidence of *C. perfringens* Meat Products at Some Egyptian Governorates. International Journal of Microbiological Research 2011; 2 (3): 196-203.
- 161- Nasr EM, Shehta AA, Amer AH. Enterotoxigenicity and Typing of *C. perfringens* Isolates from Some Poultry Products in Egypt. Journal of Applied Sciences Research, 2007; 3(12): 1804-1808
- 162- Fukushima H, Hoshina K, Nakamura R, Ito Y. Raw beef, pork and chicken contaminated with *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *Yersinia enterocolitica* and *C. perfringens* comparative study. Zbl Bakt Hyg B 1987; 184: 60-70.
- 163- Anonim. United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Science and Technology, Microbiology Division, May 1996, Nationwide Raw Ground Turkey Microbiological Survey. <http://www.fsis.usda.gov/OPHS/baseline/rwgrturk.pdf> 01.04.2012
- 164- Guang-Hua W, Xiao-Ling Q. Fleisch und Fleisch produkte aus dem Einzelhandel in Beijing. Vorkommen von *Cl. perfringens*, *S. aureus*, *Salmonellen* und *L. monocytogenes*. Fleischwirtsch, 1994; 74 (3): 326-328.
- 165- Lin YT, Labbe R. Enterotoxigenicity and genetic relatedness of *C. perfringens* isolates from retail foods in the United States. Appl Environ Microbiol 2003; 69 (3): 1642-1646.
- 166- Wen Q, McClane BA. Detection of enterotoxigenic *C. perfringens* type A isolates in American retail foods. Appl Environ Microbiol 2004; 70 (5): 2685-2691.
- 167- Erol I, Goncuoglu M, Ayaz ND, Ormanci FSB and Hildebrandt G. Molecular typing of *C. perfringens* isolated from turkey meat by multiplex PCR. Lett Appl Microbiol 2008; 47, 31–34.
- 168- Stagnitta PV, Micalizzi B, de Guzmán AMS. Prevalence of enterotoxigenic *C. perfringens* in meats in San Luis, Argentina. Anaerobe 2002; 8(5): 253-8.
- 169- Singh RV, Bhilegaonkar KN, Agarwal RK. Studies on occurrence and characterization of *C. perfringens* from selected meats. Journal of Food Safety 2005; 25: 146–156
- 170- Devere JM. A simple method for the isolation and determination of *C. perfringens*. Eur J Appl Microbiol 1979; 6: 409-414.
- 171- Erickson JE and RH Deibel. 1978. New medium for rapid screening and enumeration of *C. perfringens* in foods. Appl Environ Microbiol 1978; 36: 567-571.
- 172- Fruin JT and FJ Babel. Changes in the population of *C. perfringens* type A frozen in a meat medium. J Food Protect 1977; 40: 622-625.
- 173- Angelotti R, Hall HE, Foter MJ and Lewis KH. Quantitation of *C. perfringens* in foods. Appl Microbiol 1962; 10: 193-199.
- 174- AOAC, 1995. Clostridium perfringens from shellfish: iron milk method. Sec 17.7.04 Method 993.10. In: Cundiff, P.A. (Ed.), Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- 175- ISO 7937: 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens*, Colony-count technique.
- 176- Anonim. FDA/BAM. *Clostridium perfringens* <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070878.htm> / 14.04.2012

- 177- Nordic Committee on Food Analysis (NMKL). Nordic Committee on Food Analysis, *C. perfringens*. Determination in Foods, Feed and Environmental Samples Method no. 95 (5th edition), 2009.
- 178- Yoo HS, Lee SU, Park KY, Park YH. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* by multiplex PCR. J Clin Microbiol 1997; 35: 228–232.
- 179- Fach P and Popoff MR. Detection of enterotoxigenic *C. perfringens* in food and fecal samples with a duplex PCR and the slide agglutination test. Appl Environ Microbiol 1997; 63: 4232-4236.
- 180- Meer RR, Songer JG. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *C. perfringens*. Am J Vet Res 1997; 58: 702–705.
- 181- Garmory HS, Chanter N, French NP, et al. Occurrence of *C. perfringens* beta2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. Epidemiol Infect 2000; 124: 61–67.
- 182- Augustynowicz E, Gzyl A, Slusarczyk J. Detection of enterotoxigenic *C. perfringens* with a duplex PCR. J Med Microbiol 2002; 51: 169–172
- 183- Baums CG, Schotte U, Amtsberg G, Goethe R, Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *C. perfringens* isolates. Vet Microbiol 2004; 100: 11–16
- 184- Heikinheimo A and H Korkeala. Multiplex PCR assay for toxinotyping *C. perfringens* isolates obtained from Finnish broiler chickens. Lett Appl Microbiol 2005; 40:407-411
- 185- Schoepe H, H Potschka, T Schlapp, J Fiedler, H Schau and G Baljer. Controlled multiplex PCR of enterotoxigenic *C. perfringens* strains in food samples. Mol Cell Probe 1998; 12: 359-365.
- 186- Albini S, Brodard I, Jaussi A, Wollschlaeger N, Frey J, Miserez R, Abril C. Real-time multiplex PCR assays for reliable detection of *C. perfringens* toxin genes in animal isolates. Vet Microbio, 2008; 127: 179–185.
- 187- Gurjar AA, Hegde NV, Love BC, Jayarao BM. Real-time multiplex PCR assay for rapid detection and toxintyping of *C. perfringens* toxin producing strains in feces of diary cattle. Molecular and Cellular Probes, 2008; 22: 90–95.
- 188- Bugarel M, Beutin L, Martin A, Gill A, Fach P. Micro-array for the Identification of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) Seropathotypes Associated with Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome in Humans. Int J Food Microbiol 2010; 142 (3): 318-329.
- 189- Al Khaldi SF, Myers KM, Rasooly A, Chizhikov V. Genotyping of *C. perfringens* toxins using multiple oligonucleotide microarray hybridization. Mol Cell Probes 2004; 18: 359–367
- 190- Robert EL. Rapid Detection and Characterization of Foodborne Pathogens by Molecular Techniques. CRC Press Taylor & Francis Group 2010.
- 191- Maslanka SE, Kerr JG, Williams G, Barbaree JM, Carson LA, Miller JM, Swaminathan B. Molecular subtyping of *C. perfringens* by pulsed-field gel electrophoresis to facilitate food-borne-disease outbreak investigations. J Clin Microbiol 1999; 37: 2209–2214
- 192- Lukinmaa S, Takknen E, Siitonen S. Molecular epidemiology of *C. perfringens* related to food-borne outbreaks of disease in Finland from 1984 to 1999. Appl Environ Microbiol 2002; 68: 3744–3749.
- 193- Eisgruber H, Wiedmann M, Stolle A. Use of plasmid profiling as a typing method for epidemiologically related *C. perfringens* isolates from food poisoning cases and outbreaks. Lett Appl Microbiol 1995; 20: 290–294.

- 194- Schalch B, Sperner B, Eisgruber H, Stolle A. Molecular methods for the analysis of *C. perfringens* relevant for food hygiene. *FEMA Immunol Med Microbiol* 1999; 24: 281–286.
- 195- Schalch B, Bjorkroth J, Eisgruber H, Korkeala H, Stolle A. Ribotyping for strain characterization of *C. perfringens* isolates from food poisoning cases and outbreaks. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 3992–3994.
- 196- Kilic U, Schalch B, Stolle A. 2002. Ribotyping of *C. perfringens* from industrially produced ground meat. *Lett Appl Microbiol* 2002; 34:238–243.
- 197- Ridell J, Bjorkroth J, Eisgruber H, Schalch B, Stolle A, Korkeala H. Prevalence of the enterotoxin gene and clonality of *C. perfringens* strains associated with food-poisoning outbreaks. *J Food Prot* 1998; 61: 240–243.
- 198- McLauchlin J, Ripabelli G, Brett M, Threlfall E. Amplified fragment length polymorphism(AFLP) analysis of *C. perfringens* for epidemiological typing. *Int J Food Microbiol* 2000; 56: 21–28.
- 199- Sawires Y, Songer J. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for strain typing of *C. perfringens*. *Anaerobe* 2005; 11: 262–272.
- 200- Chalmers G, Martin S, Prescott J, Boerlin P. Typing of *C. perfringens* by multiple-locus variable number tandem repeats analysis. *Vet Microbiol* 2008; 128: 126–135.
- 201- Anonim. How Temperatures Affect Food. [http://www.fsis.usda.gov/Factsheets/How\\_Temperatures\\_Affect\\_Food/index.asp](http://www.fsis.usda.gov/Factsheets/How_Temperatures_Affect_Food/index.asp) / 21.04.2012.
- 202- Hygiëncode voor de voedingszorg in zorginstellingen. Stichting Voedingscentrum, Den Haag, The Netherlands, 2001
- 203- USDA-FSIS. Performance standards for the production of certain meat and poultry products. FSIS Directive 7111.1. *Federal Register* 1999; 64: 732-749.
- 204- USDA-FSIS. Performance standards for the production of processed meat and poultry products. FSIS Directive 7111.1. *Federal Register* 2001; 66: 12589-12636.
- 205- FDA. Food Code. FDA Division of Retail Food Protection. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Washington, DC. Pub. No. PB97 141204, 2001.
- 206- Sikes A. Control of *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus coagulans* in low-acid food with food-grade additives. U.S. Army SSCOM, Natick RD and E Ctr., Natick, MA, Technical Report 1995; NATICK/TR-95/022.
- 207- Sikes A and Ehioba R. Feasibility of using food-grade additives to control the growth of *C. perfringens*. *Int J Food Microbiol* 1999; 46: 179-185.
- 208- Juneja VK and Thippareddi H. Inhibitory effects of organic acid salts on growth of *C. perfringens* from spore inocula during chilling of marinated ground turkey breast. *Int J Food Microbiol* 2004; 93: 155-163.
- 209- Sabah JR, Thippareddi H, Marsden JL and Fung DYC. Use of organic acids for the control of *C. perfringens* in cooked vacuum-packaged restructured roast beef during an alternative cooling procedure. *J Food Prot* 2003; 66: 1408-1412.
- 210- Daly C, Sandine WE and Elliker PR. Interactions of food starter cultures and foodborne pathogens: *Streptococcus diacetilactis* versus food pathogens. *J Milk Food Technol* 1972; 35: 349-357.
- 211- Gilliland SE and Speck ML. 1977. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associated cultures. *J Food Prot* 1977; 40: 820-823.
- 212- O'Mahony L, Feeney M, O'Halloran S, et al. Probiotic impact on microbial flora, inflammation and tumour development in IL-10 knockout mice. *Aliment Parm Therap* 2001; 15: 1219-1225.

- 213- Tabatabai LB and Walker HW. Inhibition of *C. perfringens* by *Streptococcus faecalis* in a medium containing curing salts. J Milk Food Technol 1974; 37: 387-391.
- 214- Kim MK, Kim MJ, Shin DH, Song SC and Lee HS. Growth-inhibiting effects of vegetable extracts on beneficial and harmful human intestinal bacteria. Agricultural Chemistry and Biotechnology. 2001; 44: 65-70.
- 215- Monk JD, Beuchat LR and Doyle MP. Irradiation inactivation of food-borne microorganisms. J Food Prot 1995; 58: 197-208.
- 216- Baumgart J. Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. Hamburg: Behr's Verlag, 1997.
- 217- Çetinkaya B, Karahan M, Atil E, Kalin R, De Baere T and Vaneechoutte M. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. Vet Microbiol 2002; 88: 75-83.
- 218- Juneja VK, Novak JS, Eblen BS and McClane BA. Heat resistance of *C. perfringens* vegetative cells as affected by prior heat shock. J Food Saf 2001; 21: 127-139.
- 219- Anonim. Focus On: Chicken. US Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service (FSIS). [www.fsis.usda.gov/factsheets/chicken\\_food\\_safety\\_focus/index.asp/](http://www.fsis.usda.gov/factsheets/chicken_food_safety_focus/index.asp/) 08.04.2012
- 220- Anonim. The big thaw-safe defrosting methods for consumers. US Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service (FSIS). [www.fsis.usda.gov/Fact\\_Sheets/Big\\_Thaw/index.asp/](http://www.fsis.usda.gov/Fact_Sheets/Big_Thaw/index.asp/) 08.04.2012
- 221- SAS Version 6.1. SAS Institute. Cary, North Carolina, USA, 1999.
- 222- Götze U. Vorkomen von *C. perfringens* bei lebenden Masthühnern und Möglichkeiten der Kontamination beim Schlachten. Fleischwirtschaft 1976; 56: 231-235.
- 223- Tschirdewahn B, Notermans S, Wernars K, Untermann F. The presence of enterotoxigenic *C. perfringens* strains in faeces of various animals. Int J Food Microbiol 1991; 14: 175-178.
- 224- Atasever M. Besin isyerlerinde hijyen, besinlerin hazırlanması ve muhafazası. Y. Y. Ü Veteriner Fakültesi Dergisi 2001; 11(2): 117-122.
- 225- Kalkan A. Et satış yerlerinin ve personelinin hijyenik kontrolü üzerine araştırmalar, Yük. Lis. Tezi, Ankara, 1993.
- 226- Tekinsen OC, Yurtyeri A ve Mutluer B. Ankara'da satılan hazır kıymaların bakteriyolojik kalitesi, AÜ. Vet. Fak. Derg. 1980; 27(1-2): 45-63.
- 227- Çakmak Ö, Ormancı FSD, Tayfur M, Erol İ. Presence and Contamination Level of *C. perfringens* in Raw Frozen Ground Poultry and Poultry Burgers. Turk J Vet Anim Sci 2006; 30: 101-105.
- 228- Lindblad M, H Lindmark, Lambertz ST and Lindqvist R. Microbiological baseline study of broiler chickens at Swedish slaughterhouses. J Food Prot 2006; 69:2875-2882.
- 229- Labbe RG. *C. perfringens*. In: Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. Eds. The Microbiological Safety and Quality of Food. Vol II. Aspen Pub. Gaithersburg, Maryland. 2000; 1110-1135.
- 230- Ali MS, Fung DYC. Occurrence of *C. perfringens* in ground beef and ground turkey evaluated by three methods. Journal of Food Safety 1991; 11 (3): 197-203.
- 231- Sarıgül D. Hindi Kıymalarında *C. perfringens*'in Varlığı ve İzolatların *cpe* geni yönünden PCR ile İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, 2005.
- 232- Baydur AY. İstanbul'da satışa sunulan tavuk etlerinin hijyenik kalitesi üzerine araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniversitesi, 2006.

- 233- Álvarez-Astorga M, Capita R, Alonso-Calleja C, Moreno B, García-Fernández MC. Microbiological quality of retail chicken by-products in Spain. *Meat Science* 2002; 62: 45–50.
- 234- Berrang ME, Ladely SR And Buhr RJ. Presence and level of *Campylobacter*, coliforms, *Escherichia coli*, and total aerobic bacteria recovered from broiler parts with and without skin. *J Food Protect* 2001; 64 (2): 184-188.
- 235- Songer JG, Meer RM. Genotyping of *C. perfringens* by polymerase chain reaction is a useful adjunct to diagnosis of clostridial enteric disease in animals. *Anaerobe*, 1996; 2: 197-203.
- 236- Kokai-Kun JF, Songer JG, Czczuln JR, Chen F, McClane BA. Comparison of Western immunoblots and gene detection assays for identification of potentially enterotoxigenic isolates of *C. perfringens*. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2533-2539.
- 237- Lebrun M, Filee P, Mousset B, et al. The expression of *Clostridium perfringens* consensus beta2 toxin is associated with bovine enterotoxaemia syndrome. *Vet Microbiol* 2007; 120: 151–157
- 238- Bueschel DM, Jost BH, Billington SJ, Trinh HT and Songer JG. Prevalence of cpb2, encoding beta2 toxin in *C. perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. *Vet Microbiol* 2003; 94: 121–129.
- 239- Engstrom BE, Fermer C, Lindberg A, Saarinen E, Baverud V and Gunnarsson A. Molecular typing of isolates of *C. perfringens* from healthy and diseased poultry. *Vet Microbiol* 2003; 94: 225–235.
- 240- Fisher DJ, Miyamoto K, Harrison B, et al. Association of beta2 toxin production with *C. perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene. *Mol Microbiol* 2005; 56: 747-762.
- 241- Ladiges W, Foster J and Ganz W. Incidence and viability of *C. perfringens* in ground beef. *J Milk Food Technol* 1974; 37: 622–626.
- 242- Bank H, Mazur Bank H, Mazur P. Visualization of freezing damage. *J Cell Biol* 1973; 57 (3): 729-1742
- 243- Speck M L and Ray B. Effects of freezing and storage on microorganisms in frozen foods: a review. *J Food Prot* 1977; 40: 333–336
- 244- Lee A, Smith SC and Coloe PJ. Survival and growth of *Campylobacter jejuni* after artificial inoculation onto chicken skin as a function of temperature and packaging conditions. *J Food Prot* 1998; 61: 1609–1614.
- 245- Dykes GA and Moorhead SM. Survival of three *Salmonella* serotypes on beef trimmings during simulated commercial freezing and frozen storage. *Journal of Food Safety* 2001; 21: 85–94.

## 8. EKLER

### 8.1. Kültür, PCR ve Deneysel Aşamalarda Kullanılan Ayıraçlar

#### Fluid Thioglycollate Medium (Merck, Darmstadt, Almanya)

Hazır Fluid Thioglycollate Medium (Merck, 1.08191.0500)'dan 30 g tartılarak 1000 ml distile suda benmari usulü ile ısıtılarak iyice eritildi. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edildikten sonra 50 °C'ye soğuması beklendi.

<b>Bileşimi</b>	<b>g/litre</b>
Yeast extract	15.0
Sodium chloride	2.5
Sodium thioglycollate	0.5
L-Cystine	0.5
Sodium resazurin	0.001
Agar-agar	0.75
D(+) Glucose	5.5
Peptone casein	5.0

#### Tryptose Sulphite Cycloserine (TSC) Agar (LAB M, İngiltere)

Hazır TSC (LAB M 194) agardan 46 g tartılarak 1000 ml distile su içerisinde çözündürülüp sıcak su banyosu içerisinde eritildi. 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilen besi yeri 47 °C'ye kadar soğutuldu. Bu sıcaklıkta hazırlanan besi yeri içerisinde TSC supplement (LAB M, X194) ilave edildi.

<b>Bileşimi</b>	<b>g/litre</b>
Tryptose	15.0
Soy Peptone	5.0
Beef extract	5.0
Yeast extract	5.0
Agar	14.0
Sodium metabisulphite	1.0
Ferric ammonium citrate	1.0

### **TSC Supplement (LAB M, İngiltere)**

Her bir vial (LAB M, X194) 500 ml besi yeri için 5 ml steril distile suda eritilip hazırlandı.

#### **Vial içeriği**

D-cycloserine 200 mg

### **Blood Agar Base (LAB M, İngiltere)**

Hazır besi yerinden (LAB M, 028) 37 g alınarak 1000 ml distile suda çözüldürüldü ve sıcak su banyosunda tamamen eritildi. 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra 47 °C'ye kadar soğutuldu ve üzerine % 7'lik steril defibrine koyun kanı ilave edildi. Besi yeri kullanılmak üzere steril petrilere dökülerek hazırlandı.

<b>Bileşimi</b>	<b>g/litre</b>
Beef Extract	10.0
Balanced Peptone	10.0
Sodium chloride	5.0
Agar	12.0

### **Lactose Medium (NMKL, 2009)**

Brain Heart Infusion ve disodium hydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 1000 ml distile suda çözüldürülüp pH değeri  $7.5 \pm 0.2$  (20-25 °C)'ye ayarlandı. Daha sonra lactose ve phenol red ilave edilerek 16x150 mm tüplere 10'ar ml dağıtıldıktan sonra durham tüpleri bırakılarak 121 °C'de 15 dakika otoklav edildi.

<b>Bileşimi</b>	<b>g/litre</b>
Brain Heart Infusion	25.0
Lactose	10.0
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	5.0
Phenol red	0.05
Distile su	1000 ml

### **Motility Medium (NMKL, 2009)**

Besiyeri bileşimine giren tüm maddeler 1000 ml distile suda eritildi ve pH  $7.3 \pm 0.2$  (20-25 °C)'ye ayarlandı. Daha sonra 16 x150 mm tüplere 11 ml paylaştırılarak 121 °C 'de 15 dakika otoklav edildi.

<b>Bileşimi</b>	<b>g/litre</b>
Brain Heart Infusion	25.0
Disodium hydrogen phosphate	10.0
Galactose	5.0
Agar	3.0

### **Cooked Meat Medium (Fluka, Almanya)**

Hazır besi yerinden (Fluka, 60865) 57 g alınarak 1000 ml distile suda çözüldürüldü ve sıcak su banyosunda tamamen eritildi. 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra kullanıldı.

<b>Bileşimi</b>	<b>g/litre</b>
Beef heart	30.0
Meat peptone	20.0
Sodium chloride	5.0
D (+) Glucose	2.0

### **Anaerocult A (Merck, Almanya)**

Anaerocult A poşeti (Merck 1.13829) olabildiğince yatay tutularak poşetin her yanını ıslatacak şekilde 35 ml su ilave edildi. Süzülmeden anaerob kavanoza yerleştirilerek kullanıldı.

### **Proteinase K Solüsyonu (100 mg, Sigma, St. Louis, MO, ABD)**

1 ml'sinde 20 mg olacak şekilde steril distile su ile hazırlandı.

**TNES Buffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, % 0.2**

**Sodyum Dodesil Sülfat-SDS)**

Aşağıda belirtilen maddeler tartıldıktan sonra steril distile su ile 20 ml'ye tamamlanarak kullanıldı.

<b>Bileşimi</b>	<b>g</b>
Tris	0.048
NaCl	0.175
EDTA	0.075
SDS	0.04

**Fenol- kloroform- izoamilalkol**

Fenol, kloroform ve izoamilalkolü sırasıyla 25:24:1 hacimde içerecek şekilde ayarlanan bileşik hazır olarak AppliChem (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edildi.

**3 M Sodyum asetat çözeltisi**

100 ml'lik balon jojeye 26.424 g sodyum asetat konuldu ve distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

**% 70 Etil alkol (Merck, Almanya)**

% 96'lık etil alkolden (Merck, 1.00971) 70 ml alınarak distile su ile 96 ml'ye tamamlandı.

**10X PCR Buffer (MBI Fermentas, Litvanya)**

750 mM Tris-HCl (pH 8.8; 25 °C), 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve % 0.1 Tween 20 hazır olarak Fermentas firmasından temin edildi.

### **MgCl<sub>2</sub> (MBI Fermentas, Litvanya)**

PCR reaksiyonunda Taq polimeraz enzimi ile birlikte kullanıldı. Kullanılmaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

### **dNTP Set (100mM; dATP, dCTP, dGTP, dTTP; MBI Fermentas, Litvanya)**

Amplifikasyon esnasında denatüre edilen zincirlerin tamamlanması için PCR reaksiyonunda kullanıldı. Kullanılmaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

### **Taq DNA Polymerase Enzimi (500 U; MBI Fermentas, Litvanya)**

PCR reaksiyonunda çift zincirli DNA'nın 5'-3' yönünde nükleotidlerine ayrılmasını ve tek iplikçikli hale gelmesini sağlamak amacı ile kullanıldı. Kullanılmaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

### **Primerler (Alpha DNA, Kanada)**

Çalışmada kullanılan primerler Alpha DNA firmasından temin edildi.

### **5X Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) Elektroforez Tampon Solüsyonu**

Aşağıdaki maddeler tartılıp distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak, pH 8.3'e ayarlandı. Hazırlanan stok TBE tamponu elektroforez işlemi sırasında 4 kat sulandırılarak kullanıldı.

<b>Bileşimi</b>	<b>g</b>
Tris	54.4
Borik Asit	27.2
EDTA	4.6

### **%2'lik Agaroz (Sigma)**

2.4 g agaroz tartılarak 120 ml 1XTBE çözeltilisine konuldu. Kaynar su banyosunda eritildikten sonra elektroforez kasetine döküldü.

### **100 bp DNA Ladder (50 µg/100 µl; MBI Fermentas, Litvanya)**

Elektroforez sonucunda oluşan bandların büyüklüklerini belirlemek için kullanıldı. Kullanılmaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

### **6X Loading Dye (Yükleme Boyası) Solüsyonu (MBI Fermentas, Litvanya)**

6 X Loading Dye'in (Vivantis NM0410) bileşiminde bromophenol blue ve xylene cyanol FF boyaları bulunmaktadır. Elektroforez boyunca DNA fragmentlerinin, DNA ladderlerin ve örneklerin agaroz jelde izlenmesi amacı ile kullanıldı. Kullanılmaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

### **Ethidium Bromide (10 mg/ml; AppliChem GmbH, Darmstadt, Almanya)**

Ethidium bromid solüsyonundan 0.5 ml alınarak distile su ile 15 ml'ye tamamlandı. Agaroz jelin boyanması için 300 ml distile suya 600 µl ethidium bromid katılarak (0.5 µg/ml) kullanıldı.

## 9.ÖZGEÇMİŞ

Arş. Gör. HÜSNÜ ŞAHAN GÜRAN

**Doğum Yeri ve Yılı:** Diyarbakır, 1982

**E-posta:** sahanguran@yahoo.com

### Eğitim Bilgileri

Üniversite/ Fakülte/Okul	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Besin Hijyeni ve Teknolojisi	Doktora	2008-2012
Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi	Veteriner Hekimliği	Lisans	2000-2005

### Akademik ve Mesleki Deneyim

Kurum/Kuruluş	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Fırat Üniversitesi	Elazığ	Veteriner Fakültesi	Arş. Gör.	2008-2012
Helsinki Üniversitesi	Helsinki	Department of Food and Environmental Hygiene, University of Helsinki	-	2009
Dicle Üniversitesi	Diyarbakır	Veteriner Fakültesi	Arş. Gör.	2006–2008

### Yayımları

#### Ulusal ve uluslararası dergilerde yayımlanan makaleler

- 1-Öksüztepe G., **Güran HŞ**, İncili GK, Gül B (2011). Elazığ'da Tüketime Sunulan Fermente Sucukların Mikrobiyolojik ve Kimyasal Kalitesi. F.Ü. Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi, 25(3):107-114.
- 2-Öksüztepe G, **Güran HŞ**, Çoban ÖE (2011). Elazığ'da Tüketime Sunulan Gökkuşluğu Alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) Mikrobiyolojik Ve Kimyasal Kalitesi. E-Journal of New World Sciences Academy, 6(1):1-9.
- 3-Vural A, Erkan ME, **Güran HŞ** (2010). The Examination of the Microbiologic Quality in Örgü Cheese (Braided Cheese) Samples, The Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas, 16 (Suppl-A), 53-58.

4-Öksüztepe G, Çoban ÖE, **Güran HŞ** (2010). Sodyum Laktat İlavesinin Taze Gökkuşuğu Alabalığından (*Oncorhynchus mykiss* W.) Yapılan Köftelere Etkisi. The Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas, 16 (Suppl-A), 65-72.

5-Alp A, Yesilmen S, Vural A, **Guran HS** (2010). Determination Of Some Agronomical Characteristics and Ochratoxin-A Level of Karacadag Rice (*Oryza sativa* L.) in Diyarbakir Ecological Conditions, Turkey. African Journal of Agricultural Research, 4(15), 1965-1972.

6-Erkan ME, Vural A, **Güran HŞ** (2009). Diyarbakır Örgü Peynirinde Aflatoksin M1 ile Verotoksin 1 ve 2 Varlığının Araştırılması. Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1(1), 19-25.

7-Erkan ME, Vural A, **Güran HŞ** (2008). Diyarbakır İlinde Satışa Sunulan Köy ve Market Yumurtalarının Hijyenik Kalitesi Üzerine Bir Araştırma. Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1 (1), 11-16.

### **Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan tebliğ ve posterler**

1- Vural A, Erkan ME, **Güran HŞ**. Örgü Peyniri Örneklerinde Mikrobiyolojik Kalitenin İncelenmesi. 3. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, Bursa, 14-16 Mayıs 2009.

2- Erkan ME, Vural A, **Güran HŞ**, Diyarbakır Örgü Peynirinde Aflatoksin M1 ile Verotoksin 1 ve 2 Varlığının Araştırılması. Pamukkale Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu, Denizli, 21-22 Mayıs 2009.

3- **Güran HŞ**, Öksüztepe G, Çoban ÖE, İncili GK. Bazı Esansiyel Yağların Palamut Balığından (*Sarda sarda Bloch*, 1793) Yapılan Köftelerin Raf Ömrü Üzerine Etkisi. IV. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, Antalya, 13-16 Ekim 2011.

4- **Güran HŞ**, Öksüztepe G. Gıda Kaynaklı Botulizm ve Önemi. IV. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, Antalya, 13-16 Ekim 2011.

5- Öksüztepe G, **Güran HŞ**, İncili GK, Gül B. Elazığ'da Tüketime Sunulan Fermente Sucukların Mikrobiyolojik ve Kimyasal Kalitesi. IV. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, Antalya, 13-16 Ekim 2011.

### **Araştırma Projeleri**

1- **Güran HŞ**. Kıyma Örneklerinde *C. perfringens* Toksin Üreten Genlerinin Multipleks PCR Yöntemi ile Araştırılması. Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü 10 VF 83 numaralı proje. **Araştırmacı- Devam ediyor**

2- **Güran HŞ**. Tavuk Parça Etlerinde *C. perfringens*'in Multipleks PCR Metodu ile Toksin Genotiplendirilmesi ve Farklı Dondurma Sıcaklıklarının *C. perfringens*'in Yaşamı Üzerine Etkisi. Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü VF.11.02 numaralı proje. **Doktora Tez Araştırma Projesi**

3- **Güran HŞ**. Tavuk Parça Eti ve Sakatatlarında *E.coli* 0157:H7 ve Önemli Virülens Genlerinin Immuno Manyetik Seperasyon (IMS)-Multipleks PCR Yöntemi İle Tespiti. Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü, **Araştırmacı- Devam ediyor**

4- **Güran HŞ**. Kitosan ve Bazı Esansiyel Yağların (Kekik, Karanfil, Biberiye) Çiğ köftede Salmonella'nın Yaşamı Üzerine Etkileri. Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü VF.12.11 numaralı proje. **Araştırmacı- Devam ediyor**

### **Seminer / Panel / Konferans**

- 1- Güran HŞ.** “Besin Maddelerinin Digesyon ve Absorpsiyon Prosesi” Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Seminer Salonu (2008).
- 2- Güran HŞ.** “*Clostridium botulinum*’un Moleküler Yöntemlerle Tespiti ve Tiplendirilmesi”. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi (2010). Doktora Semineri

### **Uluslararası Akademik Etkinlikleri**

- 1- Güran HŞ.** “*International PhD course in Advance Meat Science*”, Department of Food Science, Faculty of Life Science, Copenhagen University/ Denmark.
- 2- Güran HŞ.** Department of Food and Enviromental Hygiene, Helsinki University / Finland.  
-Displaying gene expression of selected genes in *Clostridium botulinum* genome by RT- qPCR and data analysis.
- 3- Güran HŞ.** “*Second International Molecular Methods in Food Microbiology Symposium*”. METU-TURKEY.

### **Kurs Katılımları**

- 1- Güran, HŞ.** “*PCR Temelli Genetik Analizler Kursu*”, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara Üniversitesi (2008).
- 2- Güran HŞ.** “*Uygulamalı Real Time PCR Kursu*”, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul Üniversitesi (2008).
- 3- Güran HŞ.** “*V. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu*”, Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi (2010).
- 4- Güran HŞ.** “*II. Klonlama Kursu*”, Adnan Menderes Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (ADÜ-BİLTEM) (2012).

### **Ödüller**

- 1- Güran HŞ.** Sodyum Laktat İlavesinin Taze Gökkuşuğu Alabalığından (*Oncorhynchus mykiss* W.) Yapılan Köftelere Etkisi. Uluslararası Bilimsel Yayınları Teşvik Ödülü (UBYT). TÜBİTAK Ulusal Akademik Ağ ve Bilgi Merkezi (ULAKBİM) 2010.

### **Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler**

- 1- Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti**

### **Diğer Etkinlikler**

- 1- IV. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi Yerel Düzenleme Kurulu Üyesi (13-16 Ekim 2011-Antalya)**