

**T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**BROYLER'LERDEN *Clostridium*  
*perfringens* İZOLASYONU ve  
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

**DOKTORA TEZİ**

**Burcu KARAGÜLLE**

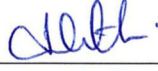
**2016**

## ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Hasan Basri GÜLCÜ

Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Adile MUZ

Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

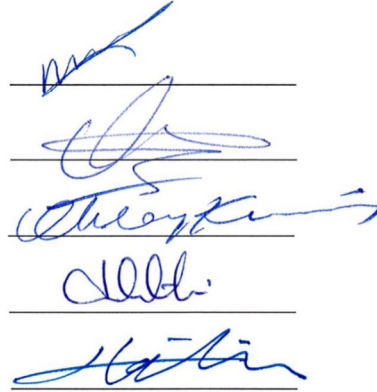
Prof. Dr. Müjgan İZGÜR

Prof. Dr. Adile MUZ

Prof. Dr. Oktay KESKİN

Prof. Dr. Hasan Basri GÜLCÜ

Prof. Dr. Hatice ERÖKSÜZ



## TEŞEKKÜR

Akademik hayatımın en zorlu dönemeci olan doktora tez sürecim boyunca, danışmanlığımı üstlenen başta danışman hocam Prof. Dr. Adile MUZ olmak üzere Anabilim Dalımızın diğer öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Tez çalışmamın en başından beri akademik bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan Prof. Dr. Hakan KALENDER, Prof. Dr. Mehmet AKAN ve Prof. Dr. Barış OTLU'ya, pozitif kontrolleri temin ettiğim Yrd. Doç. Dr. H.Şahan GÜRAN'a, yakın desteğini gördüğüm çalışma arkadaşım Arş. Gör. Zeynep YERLİKAYA'ya, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üye ve yardımcılarına, Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Anaerob Laboratuvarı çalışanlarına, NetB toksin gen DNA'sını Avustralya Monash Üniversitesinden bana ulaştıran Prof. Dr. Julian ROOD'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca büyük bir özveri ile maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim aileme ve eşime ayrıca teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 214O164 nolu proje kapsamında desteklenmiştir. Tez çalışmama sağladıkları maddi destekten dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI .....	i
ONAY SAYFASI .....	ii
TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
KISALTMALAR .....	ix
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT .....	3
3. GİRİŞ .....	5
3.1. <i>Clostridium perfringens</i> 'in Tarihçesi.....	7
3.2. <i>Clostridium perfringens</i> 'in Biyokimyasal ve Genel Özellikleri.....	8
3.3. Clostridumlar'ın Filogenetik Sınıfı.....	9
3.4. <i>Clostridium perfringens</i> 'in Virülens Faktörleri.....	11
3.5. <i>Clostridium perfringens</i> 'in Ürettiği Major Toksinler .....	14
3.5.1. Alfa Toksin ( $\alpha$ ).....	14
3.5.2. Beta toksin ( $\beta$ ).....	15
3.5.3. Epsilon Toksin ( $\epsilon$ ).....	16
3.5.4. Iota Toksin ( $\iota$ ) .....	16
3.5.5. $\beta$ 2 Toksini (CPB <sub>2</sub> ).....	17
3.5.6. Enterotoksin (CPE) .....	17
3.6. Son Yıllarda Keşfedilen Yeni Toksinler .....	18
3.6.1. NetB Toksin.....	22
3.7. Kanatlılarda <i>Clostridium perfringens</i> 'in Oluşturduğu Nekrotik Enterit.....	25
3.7.1. Nekrotik Enterit'e Tarihsel Bakış .....	25
3.7.2. Klinik Belirtiler ve Lezyonlar.....	29
3.7.3. Nekrotik Enterit'in Predispoze Faktörleri .....	30
3.7.4. Korunma ve Kontrol.....	33
3.8. Amaç .....	35

<b>4. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>37</b>
4.1. Gereç .....	37
4.1.1. Tez çalışmasında kullanılan besiyerleri ve ayıraçlar .....	37
4.1.2. Kültür aşamasında kullanılan besiyeri ve ayıraçları .....	37
4.1.3. PZR Aşamasında Kullanılan Ayıraçlar .....	40
4.1.4. Elektroforez İşleminde Kullanılan Malzemeler .....	41
4.1.5. PFGE Aşamasında Kullanılan Ayıraçlar .....	42
4.2. Yöntem .....	44
4.2.1. Kümes Ziyaretleri .....	44
4.2.2. Örneklerin Toplanması .....	47
4.2.3. <i>Clostridium perfringens</i> 'in Kültür Yöntemiyle İzolasyon ve İdentifikasyonu .....	48
4.2.4. Bağırsak İçeriklerinin Koksidiyoz Varlığı Yönünden İncelenmesi .....	52
4.2.5. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Yöntemiyle <i>Cpa</i> Toksin Varlığının İncelenmesi .....	52
4.2.6. Kültür Yöntemiyle Elde Edilen <i>Clostridium perfringens</i> İzolatlarının PZR Amplifikasyonu ile Toksin Genlerinin Belirlenmesi .....	52
4.2.6.1. Referans Suşlar .....	52
4.2.6.2. DNA İzolasyonu .....	53
4.2.6.3. <i>Cpa</i> Toksin Geni'nin PZR ile Amplifikasyonu .....	54
4.2.6.4. <i>Clostridium perfringens</i> Toksin Genlerinin Multipleks PZR Yöntemiyle Tespiti .....	55
4.2.6.5. NetB Toksin Geni'nin PZR ile Amplifikasyonu .....	56
4.2.7. <i>Clostridium perfringens</i> İzolatlarının Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) Yöntemiyle Genotiplendirilmesi .....	58
4.2.7.1. İzolatların Hazırlanması .....	58
4.2.7.2. İzolatların Agaroza Gömülmesi .....	59
4.2.7.3. Agaroz İçindeki Hücrelerin Parçalanması .....	60
4.2.7.4. Agaroz Kalıpları İçindeki DNA'nın Restriksiyon Enzimi (RE) ile Kesilmesi .....	60
4.2.7.5. Elektroforez Jelinin Hazırlanması ve Kalıpların Jele Yüklenmesi .....	61
4.2.7.6. Sonuçların Gözlenmesi ve Analizi .....	61

<b>5. BULGULAR.....</b>	<b>63</b>
5.1. <i>Clostridium perfringens</i> 'in Kùltür Yöntemiyle İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları.....	63
5.2. Bağırsak İçeriklerinin Koksidiyoz Varlığı Yönünden İncelenmesinde Elde Edilen Bulgular.....	65
5.3. <i>Clostridium perfringens</i> İzolatlarının ELISA ile Alfa Toksin Yönünden İncelenmesinde Elde edilen Bulgular .....	65
5.4. <i>Cpa</i> Toksin Geni PCR Amplifikasyon Bulguları .....	66
5.5. <i>Clostridium perfringens</i> İzolatlarının Toksin Genlerinin Multipleks PZR Bulguları.....	67
5.6. NetB Toksin Geni PZR Bulguları.....	68
5.7. <i>Clostridium pefringens</i> İzolatlarının PFGE Yöntemi ile Genotiplendirme Bulguları.....	70
<b>6. TARTIŞMA.....</b>	<b>74</b>
<b>7. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>84</b>
<b>8. KAYNAKLAR .....</b>	<b>86</b>
<b>9. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>96</b>

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b>	<i>C. perfringens</i> 'in toksin tiplerine göre sınıflandırılması .....	12
<b>Tablo 2.</b>	<i>C. perfringens</i> 'in bilinen ve yeni toksin çeşitleri .....	20
<b>Tablo 3.</b>	Sağlıklı ve nekrotik enteritli tavuk bağırsaklarından izole edilen <i>C. perfringens</i> Tip A suşlarının ülkelere göre NetB toksin gen prevalansı .....	24
<b>Tablo 4.</b>	Yıllara göre Nekrotik Enterit ile ilgili yapılan araştırma makalelerinin sayısı .....	29
<b>Tablo 7.</b>	PZR analizlerinde toksin genleri için kullanılan primer çiftleri .....	57
<b>Tablo 8.</b>	Kesimhanelere göre toplam <i>C. perfringens</i> izolatlarının dağılımı .....	64
<b>Tablo 9.</b>	Toplam <i>C. perfringens</i> izolatlarının kesimhanelere göre prevalansı .....	64
<b>Tablo 10.</b>	Broyler'lerden elde edilen <i>C. perfringens</i> izolatlarının örnek türüne ve yerleşim yerine göre dağılımı .....	64
<b>Tablo 11.</b>	Broyler'lerden elde edilen <i>C. perfringens</i> izolatlarının örnek türüne göre prevalansı .....	65

## ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1.** *C. perfringens*'in filogenetik kümesi. .... 11
- Şekil 2.** Ziyaret edilen kümeslerden bir görüntü ..... 45
- Şekil 3.** Büyüme döneminde ziyaret edilen kümeslerden bir görüntü..... 47
- Şekil 4.** *C. perfringens*'in karaciğer ve incebağırsak örneklerinden kültür yöntemiyle izolasyon ve identifikasyon şeması (Orijinal)..... 50
- Şekil 5.** *C. perfringens*'in mikroskop görüntüsü (Orijinal)..... 51
- Şekil 6.** *C. perfringens*'in 46°C de, 48 saat 'lik anerobik jar inkübasyonun ardından oluşturduğu sporların mikroskop görüntüsü (Orijinal)..... 51
- Şekil 7.** *C. perfringens* olarak identifiye edilen kültürlerden elde edilen DNA'ların *C.perfringens* *Cpa* toksin genine spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR analizi sonucunda oluşan ürünlerin ethidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü. .... 66
- Şekil 8.** Çalışmada kullanılan pozitif kontroller ve Alfa toksin geni pozitif çıkan *C. perfringens* DNA'larının Ethidium Bromide ile boyanmış agaroz jeldeki görüntüsü..... 68
- Şekil 9.** Çalışmada kullanılan NetB pozitif kontrolü ve NetB toksin geni içermeyen *C. perfringens* DNA'larının ethidium bromide ile boyanmış agaroz jeldeki görüntüsü. .... 69
- Şekil 10.** *SmaI* enzimi ile kesilen *C. perfringens* saf izolatlarına ait PFGE ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jelde görünümü.... 71
- Şekil 11.** PFGE yöntemi sonucu *C. perfringens* izolatlarına uygulanan dendogram grafiği..... 73

## KISALTMALAR

<b>ABD</b>	: Amerika Birleşik Devletleri
<b>ABF</b>	: Antibiyotik Büyütme Faktörü
<b>bp</b>	: Base pair
<b>CDC</b>	: Centers for Disease Control and Prevention
<b>CE</b>	: Competitive Exclusion
<b>CHEF</b>	: Countour-Clamped Homogeneous Field Electrophoresis
<b>CMM</b>	: Cooked Meat Medium
<b>CPE</b>	: <i>C. perfringens</i> Enterotoksini
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>dNTP</b>	: Deoksinükleotریفosfat
<b>EDTA</b>	: Etilendiamintetra-asetik asit
<b>Eh</b>	: Oksidasyon/Redüksiyon Potansiyeli
<b>ELISA</b>	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<b>FDA</b>	: Food and Drug Administration
<b>HST</b>	: Hücre Süspansiyon Tamponu
<b>kb</b>	: Kilobaz
<b>kDa</b>	: Kilodalton
<b>Kob</b>	: Koloni oluşturan birim
<b>Mb</b>	: Megabaz
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>µm</b>	: Mikrometre
<b>NE</b>	: Nekrotik Enterit
<b>PFGE</b>	: Pulsed Field Gel Electrophoresis
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RCA</b>	: Reinforced Clostridial Agar
<b>RE</b>	: Restriksiyon Endonükleaz Enzimi
<b>rRNA</b>	: Ribozomal RNA
<b>SDS</b>	: Sodyum Dodesil Sülfat
<b>TBE</b>	: Tris-Borik asit-EDTA Tampon Solüsyonu
<b>TSC</b>	: Tryptose Sulphite Cycloserine Agar

**SUSS** : Steril Ultra Saf Su  
**UV** : Ultraviyole  
**VDE** : Vankomisin Dirençli Enterokok



## 1. ÖZET

Bu çalışmada, Elazığ ve Malatya illerindeki 100 farklı kümeden 3 farklı kesimhaneye getirilen broyler'lerde *Clostridium perfringens*'in varlığı konvansiyonel kültür ve PZR yöntemleri ile araştırılarak, söz konusu etkenin bölgedeki yaygınlığı ve dağılımı ile ilgili verilerin toplanması amaçlandı.

Bu amaçla hayvanların büyüme dönemlerinde Malatya'da bulunan bir işletmeye ait 30 kümes ziyaret edildi. Malatya ve Elazığ'daki kanatlı kesimhanelerinden alınan 500 bağırsak ve 500 karaciğer örnekleri olmak üzere toplam 1000 numune incelendi. Alfa- toksin ( $\alpha$ ), beta-toksin ( $\beta$ ), epsilon-toksin ( $\epsilon$ ), iota-toksin ( $\iota$ ), enterotoksin (Cpe), beta<sub>2</sub> ( $\beta_2$ ) toksin genlerine spesifik primerler kullanılarak multiplex-PZR yöntemi ile izolatların toksin tiplendirmesi yapıldı. Ayrıca izolatlar, hasta ve sağlıklı kanatlı hayvanlardaki rolü henüz ortaya konulamamış olan NetB toksin geni yönünden PZR yöntemi ile incelendi.

Elazığ ve Malatya'daki farklı kümeslerden izole edilmiş 61 izolata Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) yöntemi uygulanarak genotiplendirme yapıldı. Gel Compare II yazılım sistemi (version3.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edildi. PFGE profillerinin, dendogramı oluşturularak kümeleşme analizi yapıldı.

Bu çalışmada Malatya ve Elazığ illerindeki broyler piliçlerde karaciğer ve ince bağırsaklarında toplam *C. perfringens* yaygınlığı %66 olarak tespit edildi. Toplam 660 *C. perfringens* izolatın 657'si  $\alpha$  toksin geni yönünden pozitif bulunurken, diğer toksin genlerinin hiçbirine rastlanmadı. Kalan üç örnek ise tiplendirilemedi. Çalışmada incelenen hiçbir izolatta NetB toksin geni

saptanamadı. Kümesler arasında 30 farklı PFGE genotipi tespit edildi ve heterojen bir dağılım gözlendi.

Bu alışma ile Türkiye’de ilk kez kanatlı hayvanlarda hem NetB toksin geni araştırılmış, hem de *C. perfringens* izolatlarının PFGE profilleri saptanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Broyler, *C. perfringens*, NetB, PFGE, PZR, Toksin.



## 2. ABSTRACT

### MOLECULAR CHARACTERIZATION AND ISOLATION OF *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* FROM BROILERS

The aim of the current study was to investigate the prevalence of *Clostridium perfringens* in broilers which was brought for slaughter to 3 different slaughterhouses from 100 different broiler flocks in Elazig and Malatya provinces by conventional culture and PCR techniques.

For this aim, 30 coops which were located in Malatya were visited during the growing period of broilers. A total of 500 intestines and 500 livers have been collected. Toxin genotyping were performed by using multiplex-PCR to the Alfa-toxin ( $\alpha$ ), beta-toxin ( $\beta$ ), epsilon-toxin ( $\epsilon$ ), iota- toxin ( $\iota$ ), enterotoxin (Cpe),  $\beta_2$  toxin genes. Besides all isolates were analysed for the NetB toxin gene using PCR.

Also, a total of 61 isolates collected from different coops in Elazig and Malatya provinces were genotyped by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) technique. Band profiles were analysed using the Gel Compare II software (version3.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). The dendogram of PFGE profiles was established and clustering analysis was performed.

The prevalence of *C. perfringens* was detected as 66% in broilers located in Elazig and Malatya provinces. 657 out of 660 *C. perfringens* isolates was detected as positive for Alfa-toxin ( $\alpha$ ) while none of the other toxin genes could identified. It has not been genotyped the rest 3 samples. NetB toxin gene couldn't

detected in none of the isolates examined. Thirty different PFGE genotypes were detected and a heterogeneous distribution was seen.

Both NetB toxin gene and the PFGE profiles of *C. perfringens* isolates were investigated in broilers for the first time in Turkey in the current study.

**Key Words:** Broiler, *C. perfringens*, NetB, PCR, PFGE, Toxin



### 3. GİRİŞ

*Clostridium perfringens*, insanlarda gıda kaynaklı salgınlara neden olan Salmonella ve Campylobacter gibi patojenlerden sonra en fazla izole edilen bakteriyel patojendir (1). Kanatlı etlerinde kontaminasyon, çoğunlukla kesim işlemi sırasında *C. perfringens*'in, hayvanların dışkılarından veya bağırsaklarından bulaşması ile olabilmektedir. Uygun olmayan şartlarda soğutulan ve yetersiz pişirilen *C. perfringens* ile kontamine etlerin, insanlarda gıda kaynaklı infeksiyonlara neden olduğu rapor edilmiştir (2). Dolayısıyla insan sağlığı açısından büyük risk faktörü taşımaktadır (3). Nitekim *C. perfringens* Tip A'nın ürettiği alfa toksin, insanlarda gıda kaynaklı zehirlenmelere yol açabilmektedir (1). *C. perfringens*'in, enfekte hayvanlar tarafından ve çevreden fekal yolla bulaşmasının azaltılması ve engellenmesi, bağırsaklarla ilişkili hastalıkların infeksiyon riskini azaltabilir (2).

*C. perfringens*, kanatlılarda subklinik ve akut klinik formda seyreden nekrotik enterit, kolangiohepatit, taşlıkta lezyonlar ve nekrotik dermatite neden olan önemli patojenlerden biridir (4). Nekrotik enterit (NE), *C. perfringens* suşlarının, 2-5 haftalık broyler'lerde ishal, bağırsaklarda nekrotik yangı ve ölüm ile karakterize, Tip A ve de Tip C tarafından oluşturulan, infeksiyöz, enterotoksijenik bir hastalıktır (3).

NE, ilk kez 1961 yılında İngiltere'de Parish tarafından bildirilmiştir. Hastalık o zamandan beri çeşitli ülkelerde başta İngiltere (5) olmak üzere; Kanada (6), Fransa (7) ve Avustralya'da rapor edilmiştir (8).

Nekrotik enterit kanatlılarda akut klinik ve subklinik formda seyrederek. Akut klinik form, broyler kümeslerinde 3-4 gün içinde ani ölümlerle kendini

gösterir. Subklinik formda ise *C. perfringens* toksinleri bağırsak mukozasında hasar meydana getirerek emilim ve absorpsiyonun azalmasına, yem dönüşüm oranının artmasına ve ortalama canlı ağırlığın azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca subklinik formda karaciğerde büyüme ve yangı görülmesi, *C. perfringens*'in kolangiohepatite de neden olabileceğini göstermektedir (3). Deneysel çalışmalarda ortaya çıkan postmortem bulgularda *C. perfringens*'in oluşturduğu lezyonların daha çok duodenum, ileum ve jejunumda nadiren de karaciğer ve böbrekte olduğu görülmüştür. Broilerlerin yanısıra hindilerde de nekrotik enteritin varlığı bildirilmiştir, hatta klinik belirtiler hindilerde daha şiddetli seyredebilmektedir (9).

*C. perfringens*'in neden olduğu nekrotik enterit broiler yetiştiriciliğinde çok büyük ekonomik kayıplara neden olmuştur. Her yıl dünya genelinde sadece korunma ve kontrol için kanatlı sektöründe yılda 2 milyar dolar civarında kayba neden olduğu tahmin edilmektedir. Bu nedenle hastalık tüm dünya'da ekonomik açıdan büyük öneme sahiptir (3,10). *C. perfringens* Tip A, kanatlılarda alfa toksin üretimine neden olmaktadır. Tip C hem alfa hem de beta toksinini üretmektedir. Alfa toksin, hastalığın oluşmasında uzun zamandan beri en önemli virülens faktör olarak bilinmektedir ve insanlardaki gıda kaynaklı zehirlenmelerde halk sağlığı açısından potansiyel risk oluşturmaktadır (3). NE'nin patogenezi; genel olarak ince bağırsaktaki *C. perfringens*'in aniden çoğalmasına dayandırılmaktadır (3, 11, 12, 13).

### 3.1. *Clostridium perfringens*'in Tarihçesi

*C. perfringens*'in ilk kez 1897 yılında Amerikalı bilim adamı William H. Welch tarafından yara infeksiyonlarında etkili olduğu saptanmış, anaerob, Gram (+), sporlu bir bakteri olarak tanımlanmıştır (14, 15). William H. Welch, 1886 yılında John Hopkins Üniversitesi hastanesinin patoloji laboratuvarında çalışmaya başlamış olmasına rağmen, hastanenin patoloji laboratuvarı henüz aktifleşmemiştir. William H. Welch'in gayretli çalışmaları sonucunda John Hopkins Üniversitesi patoloji laboratuvarında ilk otopsi 28 Mayıs 1889 yılında Dr. William H. Welch tarafından yapılmıştır. Çalışmalarını sürdürdüğü laboratuvarında 1892 yılında 38 yaşında ölen bir hastada yaptığı otopsi sonucunda, nekrotik yaraların varlığını ve gaz kabarcıklarını farketmesiyle, ölümden sonra gaz oluşumu gözlenen yeni bir bakteri keşfetmiştir. Keşfettiği bakteriyi, arkadaşı Nutall ile birlikte vaka raporu olarak yayınlamışlardır (15).

Yeni keşfedilen bakterinin adı "*Bacillus aerogenes capsulatus*" olarak isimlendirilmiştir. Ancak daha sonradan kapsül oluşumunun bakterideki varlığı tam olarak belirlenememiş olmasından dolayı, keşfedilen bakteri artık *Clostridium welchii* olarak tanımlanmıştır. Bu süreç içerisinde *Bacillus enteritidis sporogenes*, *Bacillus perfringens*, *Bacterium welchii* veya *Clostridium welchii* isimleri kullanılmış ancak en son günümüze de gelen şekliyle literatürde *Clostridium perfringens* olarak tanımlanmıştır (14, 15).

Perfringens terimi latince de "içten parçalayan" anlamına gelmektedir (16).

1943 yılında İngiltere’de, tavuk eti tüketen okul çağındaki çocuklardan *C. perfringens*’in izole edilmesiyle birlikte, ilk kez gıda kaynaklı infeksiyon etkeni olarak tanımlanmıştır (17). Ayrıca I. Dünya savaşı sırasında yüzbinlerce askerin ölümüne yol açan gazlı gangren oluşumunda etkili olduğu rapor edilmiştir (18).

### **3.2. *Clostridium perfringens*’in Biyokimyasal ve Genel Özellikleri**

*C. perfringens*, *Clostridiaceae* familyasından Gram (+), 1.0-1.5 µm boyutlarında, hareketsiz, spor formu, sporları subterminal ve oval olan anaerobik bir bakteri olup, çoğunlukla insanların gıda kaynaklı hastalık etkeni olarak bilindiği gibi, insan ve hayvanlarda meydana gelen bağırsak hastalıklarındaki başlıca patojenlerinden biridir. Etken doğada ve toprakta bulunan hareketsiz, jelatinaz, lesitinaz yönünden pozitif, nitratı indirgeyen ve laktozu fermente edebilen bir bakteridir (3, 19-22).

Sağlıklı hayvanların sekum ve kalın bağırsaklarında kommensal olarak düşük miktarlarda bulunabilmektedir (4). Etken katı besiyerinde 24 saatte anerobik ortamda yuvarlak, düzenli, opak ve parlak koloniler meydana getirmektedir. Kanlı agarda kolonilerin oluşturduğu çift zonlu hemoliz karakteristik özelliğe sahiptir. Oluşan çift zonlu hemoliz, alfa toksinin dışta oluşturduğu bulanık zon ve theta toksinin oluşturduğu iç zonun etkisiyle meydana gelmektedir (19).

*C. perfringens* için üreme sıcaklığı 43-45°C arasında değişmektedir. Optimum üreme sıcaklığı 42°C’dir (20). Gelişmesi için tipik *Clostridium* üyeleri gibi anaerobik koşullara ihtiyaç duymasına rağmen, diğer *Clostridium*lar’dan farklı olarak, az miktarda oksijen varlığında oksidasyon redüksiyon potansiyelini değiştirerek aerotolerant özellik gösterebilmektedir (21). Ortamın oksidasyon

redüksiyon (Eh değeri) potansiyelini ferrrodoksin gibi indirgeyici moleküller üreterek, aerotolerant olarak gelişmesi için uygun şartları bu şekilde oluşturabildiği bilinmektedir (23).

*C. perfringens*'in üremesi için çeşitli selektif besiyerleri bulunmaktadır. İzolasyon ve identifikasyonda en iyi üreme gösterdiği besiyerinin yumurta sarısı içermeyen TSC (Tryptose Sulphite Cycloserine) agar ve Reinforced Clostridial Agar (RCA) olduğu ortaya konulmuştur. *C. perfringens* sporları içinse, en etkili besiyerinin RCA olduğu rapor edilmiştir (24).

TSC agar, içeriğinde diğer katı besiyerlerinden farklı olarak Ferric amonium citrat ve Sodium metabisulphite ihtiva ettiğinden dolayı, sülfid bakterisi tarafından sülfide indirgenir ve besiyerinde meydana gelen bu değişimler, tipik siyah renkli kolonilerin oluşumunda etkilidir (25).

*C. perfringens* şimdiye kadar yeryüzünde en geniş yayılım gösteren bakterilerden biri olarak bilinmektedir. Alplerde ortaya çıkarılan bir mumyanın üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda, kalın bağırsağında *C. perfringens*'e ait DNA parçalarının bulunması, bu bakterinin en az 5000 yıldır doğada ve insanlarda var olduğunun bir kanıtı olarak gösterilmiştir (26).

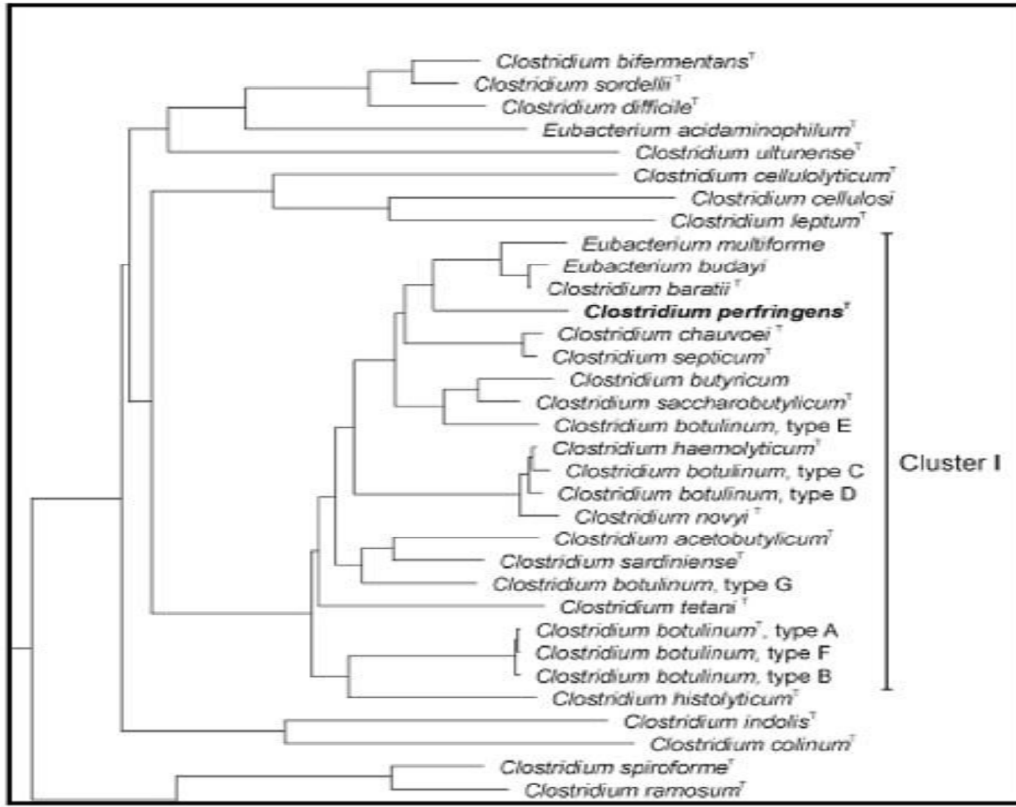
### 3.3. Clostridumlar'ın Filogenetik Sınıfı

*C. perfringens* genom haritası Pulsed - Field Gel Electrophoresis (PFGE) yöntemiyle tamamlanmış ilk Gram (+) bakterilerden biri olarak kabul edilmiştir (27). Genom büyüklüğü 3.0 ve 3.7 megabase (Mb) arasında değişiklik gösterirken (28) DNA'sı % 24-27 düşük oranda G+C içermektedir (21). Şimdiye kadar 3 farklı *C. perfringens* suşuna ait genom sekansları tanımlanmıştır. Sekanslar

karşılaştırıldığında *C. perfringens* suşları arasında umulmadık şekilde genomik çeşitlilik olduğu fark edilmiştir. Suşların oluşturduğu toksinler, enzimler ve metabolik faaliyetlerden kaynaklanan bu çeşitlilik, *C. perfringens*'in farklı çevre şartlarına adaptasyonuna ve çeşitli virülens karakterlerinin gelişmesine olanak sağlamıştır (29).

Clostridium genusu, farklı genetik özellikleri ile 35 tanesi patojen olarak bilinen, 150 den fazla tür içeren en geniş taksomonik gruplardan birisidir. Bu genusun tüm üyeleri Gram (+), anaerobik, spor formlu olup, bilinen bakteriyel toksinlerin %18 kadarını üreten kalabalık bir bakteri grubundan oluşmaktadır (30).

Clostridumlar, filogenetik olarak 16S ribozomal RNA (rRNA) dizilimlerine göre sınıflandırıldığında, *C. perfringens* en patojenik suşlarla birlikte (*Clostridium difficile* ve *Clostridium sordelli* hariç) küme XI'in I ve II. alt kümesinde bulunur (Şekil 1).



Şekil 1. *C. perfringens*'in filogenetik kümesi (31).

### 3.4. *Clostridium perfringens*'in Virülens Faktörleri

Birçok klostridial türlerde olduğu gibi *C. perfringens*'in virülensi de toksin üretimine bağlı olarak gerçekleşmektedir. *C. perfringens* ürettiği kuvvetli toksinler ve ekstrasellüler enzimlerin de etkisiyle insan ve hayvanlarda, hem kommensal hem de patojen bir bakteri olarak kalabilmeyi başarmıştır (1-4, 32).

*C. perfringens* yirmi adet esansiyel yağ asitlerinden on üç tanesini üretme kabiliyetinden yoksun olduğu için, ihtiyacı olan aminoasitleri ürettiği toksinler ve yıkımda görev alan enzimleri sayesinde konakçı dokularından temin etmektedir. (13, 33). Patojenik *C. perfringens* bakterisi konakçı hücreleri tamamen ele geçiremez fakat; farklı toksinlerin litik ve hücre içindeki enzimatik aktiviteleri ile

hücre hasarına neden olup, hedeflediği hücrelerin temel fonksiyonlarını bozarak etkisini göstermektedir (34, 32).

*C. perfringens* toksinleri kromozom veya plazmidler üzerinde farklı bölgelerde lokalize olmuştur. Bu lokalizasyon *C. perfringens*'in toksin tiplerinin çeşitliliğini destekler niteliktedir. Meydana gelen toksin çeşitliliğinden dolayı ise, insan ve hayvanlarda; gazlı gangren, çeşitli enterotoksemiler, gıda zehirlenmeleri ve nekrotik enterit olmak üzere geniş bir alana yayılan hastalık profilleri ortaya çıkmaktadır (35, 36). *C. perfringens*, ürettiği 4 büyük toksin (alpha-beta-epsilon ve iota) çeşidine göre kendi içinde A-B-C-D-E olmak üzere 5 alt tipe ayrılarak sınıflandırılmıştır (1, 4, 19, 21) (Tablo 1).

**Tablo 1.** *C. perfringens*'in toksin tiplerine göre sınıflandırılması

Toksın Tipleri	Toksınler			
	Alpha ( $\alpha$ )	Beta( $\beta$ )	Epsilon( $\epsilon$ )	Iota( $\iota$ )
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+

*C. perfringens*'in ürettiği 5 adet toksin alt tiplerinden Tip A, en yaygın olan toksin alt tipidir. Doğada, toprakta, hem sağlıklı hem de hasta olan insan ve hayvanların bağırsaklarında yaygın olarak bulunmaktadır (2, 13).

*C. perfringens* tarafından üretilen Tip A dışındaki diğer alt tipler, insan ve hayvanların bağırsaklarından çok nadir olarak üretilebilmekte olup ısıya dayanıklı

sporları doğada ve çevrede yıllarca yaşamlarını sürdürebilmektedir. Yapılan çalışmalar, *C. perfringens*'in ürettiği toksinlerin bir kısmının, enteritin gelişimindeki önemini ortaya koymuştur. Örneğin; İnsanlarda gıda kaynaklı enteritin gelişmesinde enterotoksinin, broyler tavuklarda nekrotik enterit'in gelişmesinde alfa toksin ve NetB toksinin önemi belirtilmiştir. Iota ve  $\beta_2$  toksin gibi diğer üretilen toksinlerin bağırsak hastalıklarının gelişmesindeki rolü hala tartışılmaktadır (2, 13, 37, 38.).

*C. perfringens*, toksin üretiminin yanısıra, konakçının normal bağırsak florasındaki faydalı bakterileri de baskılayarak, bağırsak mikroflorasının dengesiz hale gelmesine sebep olup, hastalığın ilerleyişine hız katabilmektedir. Üstelik çevresel faktörler de normal bağırsak florasını doğrudan ya da dolaylı yoldan etkilemektedir. Sağlıklı hayvanların ince bağırsaklarının yüksek pH ve yüksek oksijen içeriği normal şartlarda etkenin gelişmesini engelleyebilmektedir. Ancak bağırsak florasının bozulmasına neden olan bazı faktörler, *C. perfringens*'in hızla çoğalmasıyla, bağırsakta fazla miktarda toksin üretilmesine neden olabilmektedir (39). Dolayısıyla, virülent *C. perfringens* suşlarının üremesiyle, kolonizasyonu ve toksin üretiminin akabinde hastalığın oluşması söz konusudur (2).

Çeşitli *C. perfringens* genlerinin transkripsiyonu, intrasellüler metabolizma, hücrelerin hayatta kalması, enzimlerin taşınması ve toksinler için, gerekli proteinleri kodlayan VirR/VirS sistemi adı altında iki bileşen tarafından düzenlenir. VirR ve VirS proteinleri transmembran proteini gibi davranır ve alfa toksin, beta toksin,  $\beta_2$  toksin, NetB toksin ve bunun yanısıra toksinlerin üretimini kodlayan genlerin ekspresyonunu düzenleyen düzenleyici protein olarak da görev

alır. Öte yandan epsilon ve iota toksin üretiminin düzenlenmesi hala aydınlatılamamıştır (2, 32).

Birçok araştırmada, enterotoksin üretimi ile sporlanma arasında kuvvetli bir ilişki olabileceğine, fakat buna rağmen, bazı çalışmalarda sporsuz kültürlerde de enterotoksin üretiminin olduğuna işaret edilmektedir. Hem sporlanma hem de enterotoksin üretimi Sigma faktörleri tarafından düzenlenmektedir (SigE, SigF, ve SigK). Bu faktörler, çevresel koşullar altında vejetatif büyüme için gerekli besin maddelerinin yetersiz miktarda alınmasını sağlarlar. Çevre koşullarının bu Sigma faktörlerini hangi yolla etkileyebildiği hala araştırılmaktadır (2, 32, 40).

### **3.5. *Clostridium perfringens*'in Ürettiği Major Toksinler**

#### **3.5.1. Alfa Toksin ( $\alpha$ )**

Alfa toksin 43 kilo dalton (kDA) ağırlığında sfingomiyelinaz ve lesitinaz aktivitesine sahip fosfolipaz C yapısında çinko içeren multifonksiyonel bir enzimdir. Bakteriye toksinler içerisinde enzimatik aktiviteye sahip olduğu tespit edilen tek toksin çeşididir (41). Enzimatik aktiviteye sahip olduğu 1941 yılında Macfarlane ve Knight tarafından tanımlanmıştır (27).

*C. perfringens*'in bütün tipleri tarafından sentezlenebilen bir toksindir. Alfa toksin kromozoma yerleşmiş “*cpa/plc*” geni tarafından kodlanır ve bu gen replikasyon bölgesine çok yakındır. Alfa toksin helikal aminoterminal bölge (N-terminal domain) ve karboksiterminal bölge (C-terminal domain) olmak üzere başlıca iki protein bölgesinden oluşmaktadır. Karboksiterminal bölge toksisitesini, membran hücre fosfolipid içeriği ile etkileşime girerek göstermektedir (42, 43).

Alfa toksin konakçı metabolizmasında nötrofil kemotaksisini, pıhtılaşma faktörlerinin göçünü inhibe ederek ve vazokonstriksiyon ile hemolitik, sitotoksik ve nekrotik karakterde etkisini göstermektedir. Membran fosfolipidlerini hidrolize ederek fosfotidil kolin ve sfingomiyeline ayırır (42). Sahip olduğu hem kalsiyum hem de çinko iyonları alfa toksinin aktivitesi ve stabilitesi için önemli bir kofaktör görevi üstlenmişlerdir. Alfa toksin, çinko ile şelat yapan EDTA tarafından aktivitesini kaybedebilir (44).

Alfa toksin *C. perfringens*'in büyüme fazında üretilir ve bu fazda mRNA sentezi maksimum düzeydedir (45).

### **3.5.2. Beta toksin ( $\beta$ )**

*C. perfringens* Tip B ve C tarafından üretilen letal ve nekrotik karakterde olan bu toksin yaklaşık olarak 34.9 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Toksinin en önemli özelliği tripsine karşı oldukça duyarlı ısıya karşıda dirençli olmasıdır. Polipeptid yapısı 336 aminoasit içeren beta toksin, *cpb* geni taşıyan bir virülens plazmiti tarafından kodlanmaktadır (34, 36, 46).

Beta toksin birçok hayvan türünde ve insanlarda “enteritis nekrotikans” olarak bilinen hastalığa neden olmaktadır. Tripsine olan duyarlılığı, açlık durumlarında ortaya çıkarak etkisini göstermektedir. Özellikle tripsin inhibitörü içerdiği bilinen tatlı patates gibi gıdaların tüketilmesiyle, tripsin inhibitörleri toksinin parçalanmasını engelleyerek hastalığın hızla ilerlemesine yol açmaktadır (22).

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

*C. perfringens* tip B ve D tarafından letal ve dermonekrotik özellikte olan epsilon toksin, inaktif bir protoksin olarak üretilmektedir. Yaklaşık olarak 32.7 kDa molekül ağırlığında 296 aminoasitten oluşan inaktif haldeki prototoksin, bağırsak lümenindeki tripsin ve kimotripsin gibi proteazların etkisiyle aktif protein haline dönüşerek toksisitesinde artışa neden olmaktadır. Geniş bir plazmit üzerinde bulunan “*etx*” toksin geni tarafından kodlanmaktadır (27, 47).

Epsilon toksin, Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Koruma ve Kontrol Merkezi (CDC) tarafından botulismus ve tetanoz toksininden sonra bilinen en güçlü klostridial toksin olarak kabul edilmiş ve biyoterörist ajan kategorisinde yerini almıştır (48). Toksin vasküler permeabiliteyi artırarak vasküler endotelial hücrelere bağlanır ve akciğer, beyin, böbrek gibi organlarda ciddi hasarlar meydana getirir. Başta koyun olmak üzere keçi, kuzu ve sığırlarda önemli ekonomik kayıplara neden olan enterotoksemilere neden olmaktadır (47-49).

*C. perfringens* Tip D koyunlarda yumuşak böbrek hastalığına, Tip B ise yeni doğan kuzularda dizanteriye neden olmaktadır (1, 49).

### 3.5.4. Iota Toksin ( $\iota$ )

*C. perfringens* tip E tarafından üretilen iota toksin, aynı plazmidde lokalize olan aralarında 243 nükleotid bulunan iki farklı gen tarafından kodlanmaktadır. Birbirinden bağımsız iota-a (*Ia*) ve iota-b (*Ib*) olarak adlandırılmış protein yapısındaki bu iota toksin komponentlerinin (*Ia* ve *Ib*) tek başına toksik etkisi olmadığı, ancak birlikte çalıştıklarında letal dermonekrotik ve sitotoksik etkilerinin olduğu ortaya konulmuştur. Yaklaşık olarak molekül ağırlığı 47.5 kDa

olan *Ia* ADP-(Adenozin difosfat) ribosiltransferaz yapısında olup, Molekül ağırlığı 71.5 kDa olan *Ib* ise toksinin hücreye bağlanmasında ve hücre içerisine girmesinde etkili olmaktadır (40, 50).

*C. perfringens* Tip E çiftlik hayvanlarda özellikle dana ve koyunlarda önemli bir enterotoksemi nedeni olarak bilinmektedir (49).

### 3.5.5. $\beta_2$ Toksini (CPB<sub>2</sub>)

CPB<sub>2</sub> toksini *C. perfringens* Tip C tarafından üretilen, 34.9 kDa molekül ağırlığına sahip  $\beta$  toksinden tamamen farklılık gösterdiği ortaya konulmuştur. Bu farklılığın  $\beta$  toksinin proteolitik duyarlılığından kaynaklandığı düşünülmektedir (51).

CPB<sub>2</sub> toksini ilk kez Gilbert ve ark. (52) tarafından tanımlanmıştır. Molekül ağırlığı 28 kDa olan bu toksin plazmit üzerine lokalize olmuş *cpb2* geni tarafından kodlanmaktadır. *C. perfringens*  $\beta_2$  toksin, diğer  $\beta$  toksinlerle biyolojik aktivite benzerliğine sahip olup yapılan fare model çalışmalarında, fare bağırsak hücreleri üzerine sitotoksik etkili olduğu görülmüştür (51). Atlarda enterokolitis ve domuzlarda nekrotik enteritis gibi hastalıklara neden olmaktadır (53).

### 3.5.6. Enterotoksin (CPE)

İnsanlarda gıda kaynaklı infeksiyonlarda en önemli virulens faktörlerinden biri *C. perfringens* Tip A tarafından oluşturulan enterotoksindir. CPE yaklaşık olarak 3.75 kDa ağırlığında 319 aminoasitten oluşan polipeptid yapıda bir enterotoksindir (19, 23).

CPE'nin etkinliğini göstermesi için etkenin vejetatif formlarının gıda ile  $10^6$  kob/g ve üzeri miktarda alınması gerekmektedir. Mide asiditesinden kurtularak canlılığını sürdüren etkenler ince bağırsakta spor formlarını oluştururlar (40, 54).

Sporlanmış hücreler içerisinde oluşan enterotoksin hücre lizisi gerçekleştiğinde ortama salınmaktadır. Toksin bağırsak epitel hücrelerinin geçirgenliğini değiştirerek bağırsakta sıvı birikmesine ve Sodyum ( $Na^+$ ) ve Klor ( $Cl^-$ ) artışına neden olmaktadır (40, 54).

### **3.6. Son Yıllarda Keşfedilen Yeni Toksinler**

*C. perfringens*'in sınıflandırılmasında kullanılan oluşturduğu toksin çeşidine göre alt tiplendirme yöntemi günümüzde zaman aşımına uğramış bulunmaktadır, fakat farklı toksin tiplerinin hastalıklarla ilişkisini belirtebilmek için; sınıflandırmada kolaylık sağladığı göz önünde bulundurularak beş alt tipe (A-E) ayrılmıştır (40, 36). Örneğin; İnsanlarda gıda zehirlenmesi ve klostridial miyonekrozis, tip A suşları ile ilişkili iken, evcil hayvanlarda enterik hastalıklardan en fazla tip B, tip C ve tip D sorumludur (40).

*C. perfringens*'in şimdiye kadar bilinen potansiyel virulens faktörlerine, 2007 yılından bu yana identifiye edilen altı yeni toksin daha ilave edilmiştir (55). *C. perfringens*'in, insan ve hayvanlarda hastalık oluşturabilecek düzeyde en az 14 toksin daha sentezleyebildiği bilinmektedir. Şimdiye kadar karakterize edilerek sınıflandırılan 20 tane farklı toksin ve enzim, Tablo 2'de gösterilmiştir (32, 34, 56, 57). Ayrıca bu bakteri ürettiği 4 büyük toksinin yanısıra, klostridial enterit formlarında virulens faktör olarak rol aldığı bilinen enterotoksin,  $\beta 2$  toksin, NetB

toksin gibi ilave önemli toksinler de üretebilmektedir (2). Bu toksinlerin birkaçı dışında diğerleri konjugatif plazmidler üzerinde kodlanmaktadır. Hastalıkların seyri sırasında veya mide bağırsak kanalında *C. perfringens* suşları arasında toksin gen transferine izin vererek etkisini göstermektedirler (36, 40, 47, 58, 59).

*C. perfringens*'in kromozomal olarak kodlanan toksinleri ise (alfa toksin ve perfringolisin O), insanlarda histotoksik infeksiyonlarda ve gıda zehirlenmelerinde (enterotoksin) etkili olmaktadır (36, 56).



**Tablo 2.** *C. perfringens*'in bilinen ve yeni toksin çeşitleri (55)

Toksin/Enzim	Gen	Biyolojik Etki Şekli	İlişkili Olduğu Hastalık	Genetik Lokalizasyonu
Alfa toksin	<i>plc veya cpa</i>	Fosfolipaz C ve Sfingomyelinaz	İnsan ve hayvanlarda klostridial miyonekrozis	Kromozom
Beta toksin	<i>cpb</i>	Hücre membran geçirgenliğinde gözenek oluşturarak değişikliğe neden olma	İnsan ve hayvanlarda nekrotik enterit	Plazmid
Epsilon Toksin	<i>etx</i>	Hücre membran geçirgenliğinde gözenek oluşturarak değişikliğe neden olma	Koyun ve keçilerde enterotoksemi	Plazmid
İota Toksin	<i>iap/ibp</i>	Aktinin ADP ribolizasyonu	Koyun ve sığırlarda enterit, tavşanlarda enterotoksemi	Plazmid
Enterotoksin	<i>cpe</i>	Hücre membran geçirgenliğinde gözenek oluşturarak değişikliğe neden olma	Evcil hayvanlarda enterit ve kolit, insanlarda gıda kaynaklı zehirlenme	Kromozom/Plazmit
Theta Toksin/Perfringolizin O	<i>pfoA</i>	Hücre membran geçirgenliğinde gözenek oluşturarak değişikliğe neden olma- sitolizine bağlı kolesterol	İnsan ve hayvanlarda klostridial miyonekrozis	Kromozom
$\beta$ 2 Toksin	<i>cpb2</i>	Hücre membran geçirgenliğinde gözenek oluşturarak değişikliğe neden olma ?	Hastalıkla ilişkisine dair doğrulanmış veri yok	Plazmid
TpeL	<i>tpeL</i>	Ras-spesifik monoglikoziltransferaz	Hastalıkla ilişkisine dair doğrulanmış veri yok	Plazmid
NetB	<i>netB</i>	Hücre membran geçirgenliğinde gözenek oluşturarak değişikliğe neden olma	Kanatlılarda nekrotik enterit	Plazmid
BecA, BecB	<i>becA/B</i>	Aktinin ADP ribolizasyonu	İnsanlarda gastroenterit	Plazmid
NetE	<i>netE</i>	Hücre membran geçirgenliğinde gözenek oluşturarak değişikliğe neden olma ?	Hastalıkla ilişkisine dair doğrulanmış veri yok	Plazmid
NetF	<i>netF</i>	Hücre membran geçirgenliğinde gözenek oluşturarak değişikliğe neden olma	Köpek ve taylarda hemorajik enterit ve nekrotik enterokolit	Plazmid
NetG	<i>netG</i>	Hücre membran geçirgenliğinde gözenek oluşturarak değişikliğe neden olma ?	Hastalıkla ilişkisine dair doğrulanmış veri yok	Plazmid
NanI	<i>nanI</i>	Sialidaz	İlave virülens faktör	Kromozom
Kappa -Toksin	<i>colA</i>	Kollajenaz	Hastalıkla ilişkisine dair doğrulanmış veri yok	Kromozom
Mu-Toksin	<i>nagH</i>	Hiyaluronidaz	Hastalıkla ilişkisine dair doğrulanmış veri yok	Kromozom
Lambda Toksin	<i>lam</i>	Proteaz	Hastalıkla ilişkisine dair doğrulanmış veri yok	Plazmid
$\alpha$ - clostripain	<i>ccp</i>	Sistein Proteaz	Hastalıkla ilişkisine dair doğrulanmış veri yok	Kromozom
NanJ	<i>nanJ</i>	Sialidaz	Hastalıkla ilişkisine dair doğrulanmış veri yok	Kromozom
Delta toksin	<i>cpd</i>	Hücre membran geçirgenliğinde gözenek oluşturarak değişikliğe neden olma	Hastalıkla ilişkisine dair doğrulanmış veri yok	Plazmid

*C. perfringens*'in toksinleri işlevsel olarak dört kategoride sınıflandırılmıştır. Bunlar; membran hasarı yapan enzimler, membran permeabilitesini gözenek oluşturarak bozan (pore-forming) toksinler, intrasellüler toksinler ve hidrolitik enzimlerdir. (40).

Membran hasarı oluşturanlar (alfa toksin ve enzimleri gibi) hedef hücre membranlarını yıkımlayarak etkilerini gösterir (60).

Gözenek oluşturucu (pore-forming) toksinler en geniş toksin kategorisinde yer almaktadır. Membran permeabilitesini ve iyon transportunu bozarak, membran içinde gözenek ve kanalların oluşmasına sebep olmaktadır. Bu kategorideki toksinler arasında; perfringolisin O, beta-toksin, Enterotoksin(CPE), NetB ve Epsilon toksin yer almaktadır (50, 54).

TpEL, BEC ve Iota toksin gibi intrasellüler toksinler konakçı hedef hücre iskelet yapısını bozarak etki gösterirler (50). Hidrolitik enzimler ise; *C. perfringens* tarafından salgılanan silialidaz ve hiyaluridaz enzimleridir (40, 61). Bu enzimler hastalık oluşmasında direkt etkili olmasalarda, bakterinin virulensinin artışına neden olmaktadır (62).

Son yıllarda tanımlanan *C. perfringens* toksinlerinin sayısında önemli derecede artış görülmektedir. En son yapılan çalışmalarda *C. perfringens*'e ait NetB, BEC, TpEL, NetE, NetF ve NetG olmak üzere altı yeni toksin daha keşfedilmiştir ( 55).

NetB toksin; beta benzeri toksin olup gözenek oluşturucu etkiye sahiptir ve birçok *C. perfringens* toksinleri gibi konjugatif plazmitler üzerinde kodlanmaktadır (35, 63). Keşfedildiğinden bu yana birçok kanatlı nekrotik enterit

vakalarından izole edilen suşlarda NetB toksini kodlayan plazmitler identifiye edilmiştir. Yapılan son çalışmalarda birçok araştırmacı, NetB toksininin kanatlı nekrotik enterit'in rolünü ve etkisini ortaya koymuşlardır (64).

BEC toksini, BECa ve BECb olmak üzere iki farklı komponentden oluşan klostridial binary (ikili bağlanma) toksin grubuna dahil olduğu saptanan yeni bir toksin çeşididir. BEC toksini fonksiyonel olarak iota toksinine benzerlik göstermektedir. BECa komponenti aktin spesifik ADP-riboziltransferaz aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. BEC toksini ilk kez insanlarda birbirinden bağımsız iki farklı gıda zehirlenmesi salgınında keşfedilmiş olup, tipik olarak insanlarda gıda zehirlenmesinden sorumlu bir toksin olduğu ancak CPE tarafından kodlanmadığı ortaya konulmuştur (65).

TpEL toksini; klostridial monoglikoziltransferaz toksin ailesinin bir üyesi olarak, konakçı hücre proteinlerinin glikolizasyon süresince sitotoksik etkisini göstermektedir. *Clostridium difficile*'nin, TcdA ve TcdB toksinleri ile ilişkili olduğu ancak hastalık oluşumunda direk etkili değil de, sadece *C. difficile*'nin virulensinde etkin rol oynadığı kabul edilmektedir (66).

### **3.6.1. NetB Toksin**

Alfa toksin, NE oluşmasında uzun zamandan beri en önemli virülens faktör olarak bilinmektedir (3, 5, 6). Ancak bundan birkaç yıl önce yapılan bazı çalışmalar neticesinde birçok araştırmacı alfa toksinin NE oluşumunda primer etken olarak rol oynamasına şüpheyle yaklaşmaya başlamışlardır. NE'ye karşı alfa toksin ile yapılan aşı çalışmalarında alfa toksinin kanatlıları kısmi olarak koruduğu rapor edilmiştir (37). Yine bazı çalışmalar da deneysel yollarla

oluşturulmuş NE'e karşı diğer proteinlerinde immun sistemi başlatabildiği, aktifleştirebildiği görülmüştür (33, 37).

Son yıllarda Keyburn ve ark. (38) yaptığı bir çalışmada, *C. perfringens* Tip A'nın alfa toksin yönünden negatif (-) mutantlarının deneysel modellerde NE oluşturabildiğini kanıtlamışlardır. Daha sonra broyler'lerde NE ile ilişkili olduğu tahmin edilen ve tespit edilen EHE-NE18 suşundan saflaştırmış bu yeni toksin geni NetB olarak adlandırılmıştır (3, 38, 63, 64). Günümüzde bu NetB toksin geni ile ilgili literatürde bilgiler oldukça kısıtlıdır. EHE-NE18 suşundan purifiye edilen toksin geninin biyoinformatik sekans analizi sonucunda 323 aminoasit kodladığı görülmüştür (67). Beta toksin ile benzer moleküler ağırlığa sahip olduğu için beta benzeri nekrotik enterit toksini (NetB) olarak adlandırılmıştır. Bu gen sadece kanatlılarda bulunmuş olup, beta toksin ile %38 aminoasit benzerliği olduğu bildirilmiştir (38, 67).

Keyburn ve ark. 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada NE ile infekte edilmiş tavuklardan elde edilen izolatlarda NetB toksin genini bulmalarına rağmen infekte olmamış hayvanlarda NetB toksin genini bulamamışlardır (63). İlginç bir şekilde Cooper ve Songer (2009) ise deneysel modellerinde NetB toksin geni yönünden negatif (-) izolatlarıyla hastalığı oluşturabilmişlerdir (37). Yine yapılan bazı çalışmalarda NetB toksininin nekrotik enterit patogeneziinde kritik virülens faktör olduğu ortaya konulmasına rağmen (3) NetB toksin geninin nekrotik enterit ile ilişkili olmadığını ileri süren çalışmalar da mevcuttur (68, 69).

**Tablo 3.** Sağlıklı ve nekrotik enteritli tavuk bağırsaklarından izole edilen *C. perfringens* Tip A suşlarının ülkelere göre NetB toksin gen prevalansı (67).

Ülke	Nekrotik Enteritli Tavuklar		Sağlıklı Tavuklar		Kaynak
	netB insidensi <sup>a</sup>	% netB pozitif izolatlar	netB insidensi <sup>a</sup>	% netB pozitif izolatlar	
Avustralya	31/44	70	2/55	4	1
Kanada	39/41	95	7/20	35	2
Danimarka	12/25	48	14/23	61	3
İran	19/36	53	0/43	0	4
İtalya	16/30	53	4/22	18	5
Hollanda	43/45 <sup>b</sup>	96	c		6
İsveç	31/34	91	d	25	7
A.B.D	17/20	85	10/31	32	8

<sup>a</sup> NetB pozitif izolat sayısı/ Çalışılan izolat sayısı

<sup>b</sup> Tip C toksin tiplerini de içermektedir.

<sup>c</sup> Sağlıklı tavuk izolatları incelenmedi.

<sup>d</sup> Sağlıklı tavuk izolatların sayısı girilmedi

*C. perfringens* izolatlarında NetB toksin geninin varlığı Tablo 3’de de görüldüğü üzere ülkelere göre farklı profiller ile karşımıza çıkmaktadır (67). Örneğin; Kanada’da yapılan bir çalışmada nekrotik enteritli broyler’lerde, *C. perfringens* izolatlarında %95 NetB pozitif bulunurken, sağlıklı broylerlerden elde edilen izolatlarda %35 pozitif NetB bulunmuştur. Amerika Birleşik Devletleri’ndeki oran ise nekrotik enteritli broylerlerde %58, sağlıklı broylerlerde ise %8.75 olarak bulunmuştur (3, 67). Sağlıklı ve hasta kanatlı hayvanlardaki rolü

henüz tam olarak ortaya konulamamış NetB toksin geni ile ilgili Türkiye'de bir çalışmaya rastlanmamıştır.

### **3.7. Kanatlarda *Clostridium perfringens*'in Oluşturduğu Nekrotik Enterit**

#### **3.7.1. Nekrotik Enterit'e Tarihsel Bakış**

NE kanatlı hayvanların ince bağırsaklarında *C.perfringens* Tip A ve Tip C tarafından oluşturulan toksinlerin hızla çoğalması ve sayıca artmasına bağlı olarak, bağırsak mukozasına verdiği hasar sonucu meydana geldiği kabul edilmektedir (13, 33, 37). NE'e ait ilk vaka raporu, 1930 yılında Bennets tarafından siyah bir Orpington türü broylerin bağırsak lezyonlarından *Bacillus welchii* izole etmesiyle yayınlanmıştır (8, 70).

Mann, 1940'lı yılların başında yaptığı bir çalışmada broyler piliçlerin bağırsak duvarına invaze olan bakterinin *C. perfringens* olduğunu kabul etmiş ve bu bakterinin yaptığı hastalığı da " altı gün hastalığı" olarak tanımlamıştır (71, 72).

Parish tarafından 1961 yılında, İngiltere'de bir kümeste, bağırsak lezyonları görülen 6-7 haftalık piliçlerin bağırsaklarından *C. perfringens* izole etmiş, ve bu hastalığı ilk kez Nekrotik enterit olarak tanımlamıştır (73-75). Hasta hayvanların bağırsak içerikleri çıkarıldıklarında broyler ve fareler için öldürücü nitelikte olduğu ortaya konulmuş ve ilk kez bu hastalıktan elde edilen *C. perfringens* izolatları tip F olarak sınıflandırılmıştır. Ancak yapılan araştırmalarda, *C. perfringens*'in toksinleri Tip B ve Tip C antitoksinleri ile nötralize edildiği fark edilince, şimdiki sınıflandırmada Tip C olarak yerini almıştır (75).

Ayrıca Parish, *C. perfringens* bakterisini hayvanlara ağız yoluyla başarılı bir şekilde uygulayarak hastalığı tekrar oluşturmayı başarmış ve İngiltere’de bu hastalığı nekrotik enterit olarak olarak tanımlaması ile birlikte tüm Dünya’da rapor edilmiştir (76-79).

Avustralya’da ise ilk kez 1961 yılında 3 yıl içinde 10 üreticiye ait kanatlı işletmesinde ortaya çıkmıştır (8, 80). Kaldhusdal ve Skjerve yaptıkları bir çalışmada (81), 1969 ve 1989 yılları arasında Norveçte tavuk popolasyonunda nekrotik enterit insidensinin % 0 - % 34 arasında bir oranla değişkenlik gösterdiğini ortaya koymuşlardır (81).

Bu hastalığın tüm Dünya’da salgınlar şeklinde artışı ile araştırmacılar, tedavi ve hastalıktan korunma stratejileri geliştirmeye başlamışlardır. Korunma stratejilerinden ilki kanatlı yemlerine antibiyotik büyütme faktörlerinin, (ABF) ilave edilmesi olmuştur. Bunun üzerine yapılan çalışmalarda, 1948 yılında ABF’lerin kanatlı yemlerinde kullanıldığı zaman, kanatlıda büyüme performansını artırdığı ve hastalığın mortalitesini düşürdüğü görülmüştür (82-85). FDA tarafından da hayvan yemlerine ABF’lerin ilave edilmesi onaylanmıştır (82). Bu uygulama çarpıcı bir şekilde tüm dünya’da uygulanmaya başlanmış ve Avrupa Birliğinde de antibiyotiklerin neredeyse %50’sinin hayvanlarda kullanılmaya başlandığı tahmin edilmiştir (86).

Hollanda’da 1990 yılında insanlarda 80.000 kg antibiyotik kullanılmışken, hayvanlarda yaklaşık olarak 300.000 kg antibiyotik kullanıldığı tahmin edilmektedir (87).

1999 yılında A.B.D’de, hayvan sağlığı ensititüsü tarafından yapılan bir çalışma ile 20.42 milyon İngiliz Sterlini tutarında antibiyotiğin, hayvanlara verildiği bildirilmiştir (82). Daha sonra yapılan çalışmalar göstermiştir ki; hayvan yemlerine katılan antibiyotik büyütme faktörleri bağırsağın mikrobiyal florasını, özellikle de Gr(+) bakterileri öldürerek veya inhibe ederek etkisini göstermektedir. ABF’lerin kullanım sıklığındaki çarpıcı artış, hayvanlardaki patojen bakterilere karşı antimikrobiyal direncin gelişmesine ve beraberinde gıdalarda ilaç kalıntılarının muhtemel etkisine yol açabileceği araştırmacıların dikkatini çekmiştir (88). Ayrıca dikkatleri çeken diğer bir ayrıntı da, büyütme faktörü olarak kullanılan bazı antibiyotiklerin, insanlarda tedavi amaçlı kullanılan antibiyotikler sınıfına karşı, yavaş yavaş kendini gösteren çapraz direnç gerçeğinin olması ihtimalini ortaya çıkarmıştır (76).

Çapraz direncin kendisini gösterdiği antibiyotikler řu şekilde sıralanabilir: Vankomisin ve Avoparsin, Virginamisin ve Dalfopristin, Tilozin ve Spiromisin/Eritromisin, Avilamisin ve Evernimicins (89-91).

Hollanda’da yapılan bir çalışmada, Eritromisin direnci insanlara oranla broyler popülasyonunda çok daha yüksek bulunmuştur. Bu yükseklik, broyler yetiştiriciliğinde fazla dozda tilozin kullanılmasıyla ilişkilendirilebilir (87).

Çapraz direncin geliştiği en önemli bakteri grubu, vazokomiyal infeksiyon etkeni olarak bilinen enterokoklarda; Vankomisin dirençli enterokokların ortaya çıkmasıdır. Avoparsin’in hayvan yemlerinde büyütme faktörü olarak kullanılması, hayvansal ürünlerde vankomisin dirençli enterokokların bir rezervuarını oluşturmuştur (83, 91, 92). Ayrıca yapılan çalışmalar ile oluşturulan PFGE

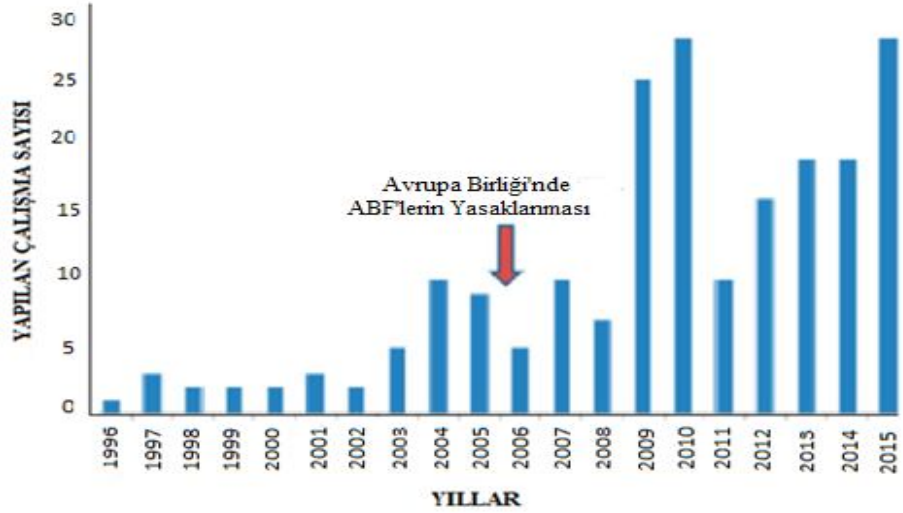
profilleri karşılaştırıldığında kanatlı izolatları ile insan izolatları, birbiriyle eş veya hemen hemen aynı olduğu ortaya konulmuştur (92).

Avrupa Birliği 1970’li yılların başında yemlerde kullanılan antibiyotikler ile insanlarda tedavi amacıyla kullanılan antibiyotikleri birbirinden ayırmaya başlamıştır (91, 93, 94). Bunun sonucunda Vankomisin dirençli Enterokokların (VDE) prevalansında ciddi bir şekilde düşüş gerçekleşmiştir (89, 92). Ancak VDE’lerin bu düşüşünün en büyük negatif etkisi, özellikle Avrupa’nın doğusunda kanatlılarda NE ve diğer klostridial hastalıkların salgınları sayısında artışa neden olmasındır (94-96).

Fransa’da NE insidensi 1995 yılında %4 oranında iken 1999 yılında %12.4’e yükselmiştir (93, 97). Avrupada birçok ülke NE salgınları ile iyonoforların kullanılması, hijyenik şartların iyileştirilmesi ve rasyonların modifiye edilmesi ile başa çıkabilmiştir (91, 98).

Sonuç itibariyle ABF’ler ile ilgili ortaya konulan tüm veriler doğrultusunda Avrupa’da 2006 yılından itibaren Hayvan yemlerinde ABF’lerin kullanılması tamamen yasaklanmıştır (13). Avrupa Birliği’nde ABF’lerin yasaklanması ile birlikte 2006 yılından 2015 yılına kadar geçen süre içerisinde nekrotik enterit ile ilgili yapılan akademik ve bilimsel çalışmalar hızla yükselişe geçmiştir (Tablo 4).

**Tablo 4.** Yıllara göre Nekrotik Enterit ile ilgili yapılan araştırma makalelerinin sayısı.



### 3.7.2. Klinik Belirtiler ve Lezyonlar

NE, *C. perfringens* suşlarının, 2-5 haftalık broyler'lerde ishal, bağırsaklarda nekrotik yangı ve ölüm ile karakterize, Tip A ve de Tip C tarafından oluşturulan, infeksiyöz, enterotoksijenik bir hastalıktır (3, 33).

NE'nin tavuklarda tipik klinik belirtileri; depresyon, yerinden kalkmada isteksizlik, diyare, tüylerin birbirine karışması durumu, uyuşukluk ve iştah azalması, dehidrasyon ve biraraya toplanmak sayılabilir (43, 76). Ancak bu klinik belirtiler o kadar kısa sürmektedir ki; tavuklar 1-2 saat içinde ölmektedir (8, 76, 99, 100). Benzer klinik belirtiler diğer kanatlılarda da görülmektedir (101). Mortalite oranları ise % 0.1 - %50 arasında değişmektedir (75, 80, 102).

Büyük lezyonlar tipik olarak ince bağırsakta sınırlanmıştır (75, 103, 104). Bunlar daha çok jejunum ve ileumdadır fakat duodenumda da meydana

gelebilmektedir. İnce bağırsaklar genellikle gaz ile şişmiş vaziyette, bağırsak duvarı aşırı derecede incelmış, koyu kahve renkli kötü kokulu bir içeriğe sahiptir (8, 75, 76, 94, 104).

Subklinik NE'de ince bağırsakta fokal lezyonlar mevcuttur. Oluşan büyük lezyonlar hindilerde benzer şekilde seyrederek ancak duodenum, tavuklardan daha fazla etkilenmekte olup lezyonlar kolona kadar ilerlemektedir (101, 105).

Bağırsak hasarı ile *C. perfringens* portal dolaşıma ve safra kanallarına girerek kolangiohepatitise neden olmaktadır. Karaciğer genel olarak büyümüş, sertleşmiş ve solgun renkte olmakla beraber, yüzeyini çoklu sarı renkte nekrotik odaklar kaplamıştır ve konjesyon mevcuttur (70, 76, 95).

### **3.7.3 Nekrotik Enterit'in (NE) Predispoze Faktörleri**

*C. perfringens*, normal bağırsak florasının bir üyesi olarak bilinse de çevreden ve doğadan elde edilen virulent suşlar, flora bakterisi yerine geçebilir ya da sakın bağırsak florası iken toksin genlerini kodlayan plasmidlerin transferi ile *C. perfringens*'i gizli enteropatojenlerden biri haline getirebilir (2, 35, 36).

NE, çevresel faktörlerin zemin hazırlayıcı etkisiyle *C. perfringens* tarafından oluşturulan multifaktöriyel bir hastalıktır. Bağırsaktaki küçük lezyonların varlığı, glisin içeren taneli yemler gibi ani yem değişikliğinin neden olduğu bağırsak pH değişikliği, stres faktörleri, immunosupresyona neden olan hastalıklar ve en önemlisi de koksidiyoz'un varlığı nekrotik enterit'in oluşması için hazırlayıcı unsurlar olarak bildirilmiştir. Özellikle bağırsakta koksidiyoz mevcutsa nekrotik enterit için önemli bir risk faktörü oluşturmaktadır. Koksidiyoz etkenleri bağırsakta kolonize olarak bağırsak epitel hücrelerinin ölümüne sebep olmaktadır.

Dolayısıyla bağırsak mukozasında meydana gelen hasar, *C. perfringens*'in çoğalmasına zemin hazırlamaktadır (94, 106-108).

Sindirim sistemi mukoza yapısının, yem ve yem katkı maddelerinin bileşenlerinden önemli derecede etkilendiği bilinmektedir. Bağırsak epitel tabakasının yüzeyindeki hücreler arasında çok sayıda goblet hücreleri bulunmaktadır. Goblet hücreleri ise mürin olarak adlandırılan bir mukopolisakkarit salgılamaktadır. Bu salgı epitelyal yüzeyin üzerindeki mukoza hücrelerinin üzerini kaplayarak koruyucu etkiye sahiptir. Fiziksel ve kimyasal bir bariyer olup epitel tabakasını bağırsak bakterileri, bakteriyel ve çevresel toksinler ve bazı yem maddelerinden korumaktadır (109, 110).

Yüksek miktarda protein içeriğine sahip veya yüksek miktarda nişasta olmayan polisakkarid (NOP) içeren arpa, buğday, çavdar gibi yemlerin kullanılması mürin salgılanmasını olumsuz yönde etkilediğinden dolayı, NE'ye zemin hazırlamaktadır (109). Yapılan bazı çalışmalarda NOP'den zengin yem ile besleme (arpa, buğday, çavdar gibi) mısıra dayalı besleme ile karşılaştırıldığında NE insidensinde artış meydana geldiği rapor edilmiştir (110, 111).

Kemik unu ve balık unu gibi hayvansal kaynaklı yüksek proteinli yemlerin, NE'in prevalansını daha da fazla artırdığı görülmüştür (97). Bu durum, hayvansal kaynaklı protein içerikli yemlerin bitkisel içerikli olanlara göre daha fazla glisin içermesinden dolayı *C. perfringens*'in proliferasyonundaki artışını desteklemesiyle ilişkilidir (97). Balık unu içeren yemler ile soya fasulyesi içeren yemler karşılaştırıldığında, soya fasulyesi içeren yemlerde glisin ve methiyonin konsantrasyonunun daha düşük miktarda olduğu görülmüştür. Bu iki aminoasit ayrı ayrı test edildiğinde görülmüştür ki; Methiyonin ince bağırsaktaki *C.*

*perfringens* populusyonunu düşürürken, glisin ise ince bağırsakta *C. perfringens* sayısını artırarak mortalite oranlarının artışına neden olmaktadır. Protein kaynaklı yemlerin ve yemlerdeki protein miktarının fazla olmasının, *C. perfringens*'in enterit ile ilişkisi üzerine etkisi, koruma ve kontrol stratejileri kapsamında daha fazla araştırma yapılarak geliştirilmelidir (2, 13).

*Eimeria* türlerinin oluşturduğu koksidiyozis de NE için en büyük predispoze faktörlerden biridir. Yapılan bir çalışmada *Eimeria spp.* ve *C. perfringens*'in koinfeksiyon oluşturmak amaçlı deney hayvanlarına verilmesiyle NE şiddetinin arttığı görülmüştür (112-114). *Eimeria* türlerinin bağırsak mukozasına hasar vermesi ile konakçının plazma proteinleri açığa çıkar, bu durum mukus artışı ile birlikte *C. perfringens*'in üremesi ve gelişmesini tetikler (113, 114).

Kanatlı işletmelerinin NE oluşumundaki rolüne bakıldığında; yetersiz havalandırma, ani yem değişiklikleri ve kümes kapasitesinin üzerinde hayvan sayısının artırılması sonucu kanatlıların gereksiz yere strese maruz kalması gibi etkenler sıralanabilir (115).

İngiltere'deki broyler çiftliklerinde yapılan bir çalışmada NE prevalansının artışındaki en büyük faktörlerden birisinin kullanılan altlığın yaş ve ıslak olması durumu saptanmıştır, ancak bu durumun NE oluşumundaki tek faktör olduğu kesinleştirilememiştir (116). Yapılan çalışmalardan birinde NE salgını çıkan kümesler takip edilerek, hayvanların bağırsaklarında çok sayıda sinek bulunmuş, bu durumun kümesin sinekler tarafından istilası sonucu hayvanların onları tüketmesiyle ortaya çıktığı anlaşılmıştır (117). NE başlangıcında viral

immunosupresif hastalıklar da tetikleyici olabilmektedir. Örneğin İnfeksiyöz Bursal Hastalık NE şiddetini artırmaktadır (118).

#### **3.7.4. Korunma ve Kontrol**

İşletmelerin NE'den korunma ve kontrol stratejileri; diyetteki risk faktörlerinin azaltılması, koksidiyozise karşı korunma, su ve yemlerde profilaktik amaçlı antimikrobisellerin kullanılması ile gerçekleştirilmektedir (37). Geçmiş yıllarda bu antimikrobisellerin kanatlı yemlerinde büyütme faktörü olarak kullanılması sonucu kanatlıların gastrointestinal kanalında *C. perfringens* popülasyonu üzerine doğrudan etki etmesiyle, NE salgınlarının ortaya çıkması engellenmiştir. Ancak bu yaygın uygulama ile birlikte zoonotik patojenlerin antibiyotik dirençlerindeki prevalansında artış meydana geldiği görülmüştür (119). Bunun üzerine Avrupa Birliği (AB), bu durumdan endişe ederek 1996 yılında ilk olarak avoparsinin gelişmeyi artırıcı amaçla kullanımını yasaklamıştır. Ardından 1999 yılında da kanatlı yemlerinde büyütme faktörü olarak kullanılan 5 antibiyotiği (Avoparsin, Virginamisin, Basitrasin, Tilosin fosfat ve Spiramisin) insanlarda kullanılan antibiyotiklere benzerlik göstermesinden dolayı direnç gelişimi endişesi ile yasaklamıştır. Bunu takiben geriye kalan 2 antibiyotiği de (Avilamisin, Flavomisin) 2006 yılından itibaren kalıcı olarak yasaklamıştır. Bu yasaklamanın ardından birçok araştırma şunu göstermiştir ki; hayvan ve insan sağlığını ilgilendiren bu antimikrobisellerin geri çekilme durumu, kanatlılarda NE insidensinin artışına neden olmuştur (91, 93). Bu NE' deki yüksek insidens NE salgınlarını tedavi etmek için bu sefer de terapötik amaçlı antibiyotik kullanımının artışına neden olmuştur (91, 120).

Ülkemizde de AB uyum kuralları gereği 21 Ocak 2006 tarih ve 26056 sayılı kanun ve 3 Mayıs 2007 tarih ve 26511 sayılı kanun ile hormon ve antibiyotik büyütme faktörlerinin tümünün, hayvansal yemlerde kullanımı yasaklanmıştır. Bazı hayvan türleri için premiks ve karma yemlerde bazı antikoksidiyal ve diğer ilaç kaynaklarına yasal yoldan katkı maddesi olarak kullanılmasına izin verilmektedir (121).

2006 yılından itibaren kanatlı yemlerinde büyütme faktörü olarak antibiyotik kullanımı yasaklanmıştır. Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada'da ise antibiyotikler hala kanatlı yemlerinde büyütme faktörü olarak kullanılmaktadır. Avrupa, Asya ve diğer ülkelerde yemlerde antibiyotiklerin yasaklanması ile birlikte NE insidensindeki artışa karşı, hükümetler alternatif stratejiler geliştirmeye çalışmıştır. Competitive Exclusion (CE) yarışmacı dışlama, ürünlerinin kullanılması sekumda *C. perfringens* popülasyonunun düşmesinde etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca bununla beraber NE'den kaynaklanan mortaliteyi azaltmış, şiddetli lezyonların azalmasına neden olmuş ve performans artışını sağlamıştır (102, 122).

Yapılan bir çalışmada; NE'den korunmak amaçlı *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* ve *Bacillus subtilis* sporlarının probiyotik amaçlı kullanılması ile fayda sağlandığı rapor edilmiştir (123). Bu çalışmalara ilaveten, NE'den korunma amaçlı probiyotiklerin (122) ve yemlerde esansiyel yağ asitleri, enzimlerin profilaktik olarak kullanılması ile bazı başarılar elde edilmiştir (124, 125).

Koksidiozis NE'nin gelişmesinde sorumlu en önemli predispoze faktörlerden biridir ve bununla birlikte Eimeria türlerinin kontrolü sağlandığı takdirde NE insidensinin ciddi anlamda düştüğünü gösteren birçok çalışma bulunmuştur. Ayrıca antikoksidyal aşuların koruyucu olarak NE'e karşı kullanılmasının etkili olduğu gösterilmiştir (108). Fakat bazı vakalarda antikoksidyallerin şiddetli lezyonlara neden olduğu ve ardından NE için tekrar predispoze faktör durumuna geçtiği görülmüştür (126).

Koruma ve kontrol amaçlı bazı antikoksidyal iyonoforların kullanılması (salinomisin, narasin, maduramisin, laslosid) *C. perfringens*'in üremesini inhibe ederek fayda sağladığı görülmüştür (127).

### **3.8. Amaç**

Bu tez çalışmasının amaçları şunlardır:

- Elazığ ve çevresindeki farklı kümeslerden kesimhaneye getirilen etlik piliçlerde ve laboratuvara getirilen nekrotik enterit'ten şüpheli tavuklarda, *C. perfringens*'in konvansiyonel kültür ve PZR yöntemleri ile araştırılması, söz konusu etkenin bölgedeki yaygınlığı ve muhtemel risk faktörleri ile ilgili verilerin toplanması,
- Enterit lezyonları görülen bağırsak örneklerinde koksidioz etkenlerine de bakılarak muhtemel risk faktörlerinin belirlenmesi,
- Enterit lezyonları görülen bağırsak örneklerinde toksin varlığının ELISA ile belirlenmesi,
- Elde edilen izolatlardan spesifik primerler kullanılarak Multipleks PZR ve klasik PZR yöntemiyle toksin tiplendirilmesi,

- NetB toksin geninin spesifik primer kullanılarak sağlıklı ve enterit lezyonları gösteren piliçlerdeki varlığının araştırılması,
- Ayrıca farklı kesimhane ve kümeslerden elde edilen seçilmiş saf izolatlar arasındaki genetik ilişkinin PFGE yöntemiyle belirlenmesi amaçlandı.



## 4. GEREÇ VE YÖNTEM

### 4.1. Gereç

#### 4.1.1. Tez çalışmasında kullanılan besiyerleri ve ayıraçlar

#### 4.1.2. Kültür aşamasında kullanılan besiyeri ve ayıraçlar

##### Cooked Meat Medium ( Oxoid, İngiltere)

Bileşimi	g/litre
Heart muscle	454.0
Peptone	10.0
'Lab-Lemco' powder	10.0
Sodium chloride	5.0
Glucose	2.0

Hazır 500gr'lık Cooked Meat Medium'dan her bir tüp için 1gr tartılarak üzeri 10ml distile su ile tamamlandı. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edildikten sonra dikkatli bir şekilde, besiyerindeki erimiş oksijeni çıkarmak amacıyla tüpler soğuk su altında 37 °C'ye kadar soğutuldu.

##### *Clostridium pefringens* selective supplement (Merck, Darmstadt, Almanya)

###### Her bir vial içeriği

D-cycloserine	200 mg/vial
4-methylumbelliferyl-phosphate disodium salt	50 mg/vial

Her bir vial içeriği 3ml steril distile su ile sulandırılıp iyice karıştırılarak 500 ml'lik TSC agara ilave edildi.

### **Tryptose Sulphite Cycloserine (TSC) Agar (Merck, Darmstadt,**

#### **Almanya)**

<b>Bileşimi</b>	<b>g/litre</b>
Tryptose	15.0
Peptone from soymeal	5.0
Yeast extract	5.0
Sodium disulphite	1.0
Ammonium iron(III) citrate	1.0
Agar-agar	12.0

42 gr TSC agar tartılarak 1000 ml distile su içerisinde çözdürüldükten sonra benmari usulü sıcak su banyosunda iyice eritildi. Besiyeri otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edildikten sonra 50 °C'ye kadar soğuması beklendi. Ardından her bir vial 3ml steril distile su ile sulandırılıp, toplam 2 vial *Clostridium perfringens* selective supplement hazırlanarak TSC agara ilave edildi.

### **Kanlı Agar (Blood Agar Base No 2), (Oxoid, İngiltere)**

<b>Bileşimi</b>	<b>g/litre</b>
Proteose peptone	15.0
Liver digest	2.5
Yeast extract	5.0
Sodium chloride	5.0
Agar	12.0

40 g kanlı agar (Oxoid CM0271) 1000 ml distile su içerisinde eritilip, otoklavda 121 °C’ de 15-20 dakika steril edildi. Besiyeri 45-50°C’ye kadar soğutulduktan sonra içerisine % 7 steril koyun kanı ilave edildi.

#### **Anaerocult\_A® (Merck, Almanya, 1.13829 CE)**

Anaerobik ortam sağlamak amacıyla kullanılan Anaerocult A poşetleri yatay bir şekilde tutularak üzerine 35 ml distile su ilave edildi. Ardından poşet içeriğinin suyu tamamen çekmesi ile fazla bekletilmeden anaerobik jar içerisine yerleştirilerek kullanıldı.

#### **Anaerotest çubukları® (Merck, Almanya 1.15112.0001 CE)**

Bir ucu mavi renk içeren Anaerotest çubukları, anaerobik ortamın sağlanıp sağlanmadığını test etmek amacıyla anaerocult jarların içerisine bırakıldı. Test şeridinin kullanım bilgilerine göre 4 saat içinde maviden beyaz renge dönmesi ile anaerobik ortamın sağlanmış olduğu kabul edildi.

#### **Motility Nitrate Medium (Fluka, Almanya)**

<b>Bileşimi</b>	<b>g/litre</b>
Meat extract	3.0
Disodium hydrogen phosphate	2.5
Galactose	5.0
Agar	5.0
Gelatine peptone	5.0

Hazır besiyerinden 23.5 g tartılarak 1 Litre distile suda çözdürüldükten sonra 5 ml gliserol ilave edilerek tüplere taksim edildi. 121 °C’de 15 dakika otoklavlandı.

#### 4.1.3. PZR Aşamasında Kullanılan Ayıraçlar

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

##### **Sodyum Dodesil Sülfat-SDS)**

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

Yukarıda bileşimde verilen maddeler tartılarak 20 ml'ye distile suyla tamamlandı.

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

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

##### **Fenol- kloroform- izoamilalkol (25:24:1)**

Hazır olarak AppliChem (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edildi.

##### **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 Fermentas firmasından temin edildi.

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

25 mM MgCl<sub>2</sub> her PCR numunesi için 5 µl kullanıldı.

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

Fermentas firmasından temin edildi. Her deoksibonükleotitten eşit oranda alınıp, her PZR numunesi için 4 µl kullanılmak üzere steril distile su ile 1/20 oranında sulandırıldı.

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

Her PZR numunesi için 1,25 U (0,25 µl) kullanıldı.

**Primerler (İontek)**

Bu çalışmada kullanılan primerler iontek firmasına sentezletildi.

#### **4.1.4. Elektroforez İşleminde Kullanılan Malzemeler**

**Agarose LE, ( Promega, Madison, ABD)**

1X TBE çözeltisi ile %2 oranında hazırlandı. Kaynar su banyosunda eritildikten sonra elektroforez kasetine döküldü.

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

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

Yukarıda bileşimi verilen 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.

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

Elektroforez sonucunda oluşan bandların büyüklüklerini belirlemek için 1/6 oranında sulandırılarak kullanıldı. Kullanılncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

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

Elektroforez sırasında DNA fragmentlerinin agaroz jel boyunca ilerlemesini izlenmek amacıyla 1/5 oranında sulandırılarak kullanıldı. Kullanılncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

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

Ethidium bromide solüsyonundan 0,5 ml alınarak distile su ile 15 ml'ye tamamlandı. Agaroz jelin boyanması için 300 ml distile suya 600 µl ethidium bromide katılarak (0,5 µg/ml) kullanıldı.

#### **4.1.5. PFGE Aşamasında Kullanılan Ayıraçlar**

##### **500 ml Hücre Süspansiyon Tamponu (100 mM Tris, 100mM EDTA pH: 8)**

100 mM Tris (pH: 8)	7.88 g
100 mM EDTA (pH: 8)	18.61 g
Sodium Hydroxide	2.59 g

Yukarda bileşimi verilen maddeler tartılıp 2.59 g Sodium Hydroxide ile pH: 8'e ayarlandı ve Steril Ultra Saf Su (SUSS) ile 500 ml'ye tamamlandı.

**500 ml Tris-EDTA solüsyonu (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA pH: 7.6)**

10 mM Tris-HCL	0.79 g
1 mM EDTA	0.19 g
Sodium Hydroxide	0.08 g

Yukarıda bileşimi verilen maddeler tartılıp 0.08 g Sodium hydroxide ile pH: 7.6 ya ayarlanıp SUSS ile 500 ml'ye tamamlandı.

**Hücre Lizis Solüsyonu (1 M NaCl, 10Mm Tris (pH: 8), 5g/lt N-Lourylsarcosine, 2g/lt Sodium deoxycholate, 2.5 mg/ml Lizozim, 20 µg/ml Rnase)**

Yukarıdaki malzemeler lizozim ve Rnase hariç 200 ml için hesaplanıp tartılarak karıştırıldı. Lizozim ve Rnase hesaplaması her numune için ayrı ayrı yapılarak karışıma eklendi.

**SeaKem Gold Agarose -%2'lik düşük erime ısılı agaroz (Lonza, Rockland, USA)**

10 ml HST içerisine %2'lik düşük erime ısılı agaroz olacak şekilde tartılıp mikrodalga fırında eritilerek, kuru ısı bloğunda bekleyen bakteri süspansiyonu ile eşit hacimde olacak şekilde ependorflara dağıtıldı.

***SmaI* RE enzimi (Thermo Scientific, 10 U/µl, 2000 U)**

Her agaroz kalıbı için hesaplanan 1X 40U *SmaI* enzimi, enzim tamponu ile yıkanmış agaroz kalıba konulup, çalkalamalı su banyosunda 25 °C'de 6 saat inkübe edildi.

## 4.2. Yöntem

### 4.2.1. Kümes Ziyaretleri

Bu çalışmada materyal olarak, Elazığ ve Malatya illerindeki 3 farklı kanatlı kesimhanesine getirilen 500 adet broylerin, karaciğer ve bağırsak örnekleri kullanıldı. Uygun örneklerin kesim sırasında alınması için gerekli izinler, Malatya ilindeki iki ve Elazığ ilindeki bir adet kanatlı kesimhanesi işletme sahiplerinden alındı. Bu üç işletme Malatya, Elazığ, Diyarbakır, Tunceli, Bingöl ve Adıyaman illeri çevresinde, yaklaşık olarak 45.000 km<sup>2</sup> lik bir alanda lokalize olmuş sözleşmeli üreticiler (Kümes sahipleri) ile birlikte çalışmakta, günlük ortalama 22.000 adet kesim yapılan kümeslerdendi.

Bu çalışma kapsamında kesime getirilmeden önce etlik piliçlere büyüme dönemlerinde yapılacak olan kümes ziyaretleri, sadece Malatya ilindeki tek bir işletmenin izni doğrultusunda yapılabilmıştır (Şekil 2). Diğer işletme sahipleri, kümeslere giriş ve çıkışlarda hijyenik koşulların sağlanamaması ve kümesteki hayvanların gereksiz yere strese girebileceği düşüncesiyle, endişe ve kaygılarını dile getirerek, kümes ziyaretlerinin yapılmasına izin vermediğinden yapılamamıştır. Dolayısıyla Malatya ilindeki A kesimhanesinden alınan izin doğrultusunda 30 adet kümes için; civciv giriş ve çıkışları, kümeslerde kullanılan altlıklar, kümes şartları, kullanılan yemler yönünden, hayvanlar kesime gelene kadar rutin ziyaretler yapılarak ilgili kayıtlar tutulmuştur (Tablo 5).



**Şekil 2.** Ziyaret edilen kümeslerden bir görüntü

Takibi yapılan kümeslerden ziyaret sırasında ölen hayvanlara da nekropsi yapılarak, hayvanların karaciğer ve bağırsakları makroskobik olarak incelenmiş ve en kısa süre içerisinde laboratuvara ulaştırılmıştır. Takibi yapılan kümeslerden ve diğer işletmelerden kesim sırasında iç organlar, takım halinde steril poşetlere alınarak, bağırsak ve karaciğer örnekleri incelenmiştir.

**Tablo 5.** Büyüme döneminde ziyaret edilen kümeslerden alınan veriler

Kümes No	Anti koksidiyal program	Verilen Yem İçeriği	Kullanılan Altlık	Kesim Yaşı	Ani Yem Değişikliği
1	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Odun talaşı	39	Yok
2	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Odun talaşı	40	Yok
3	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Odun talaşı	41	Yok
4	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Çeltik	39	Yok
5	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Saman	40	Yok
6	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Odun talaşı	38	Yok
7	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Saman	36	Yok
8	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Odun talaşı	40	Yok
9	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Saman	40	Yok
10	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Odun talaşı	40	Yok
11	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Odun talaşı	40	Yok
12	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Odun talaşı	39	Yok
13	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Çeltik	39	Yok
14	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Saman	38	Yok
15	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Saman	38	Yok
16	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Odun talaşı	39	Yok
17	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Odun talaşı	39	Yok
18	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Odun talaşı	42	Yok
19	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Çeltik	40	Yok
20	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Saman	41	Yok
21	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Saman	39	Yok
22	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Saman	39	Yok
23	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Saman	38	Yok
24	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Saman	40	Yok
25	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Odun talaşı	40	Yok
26	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Çeltik	41	Yok
27	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Odun talaşı	40	Yok
28	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Saman	41	Yok
29	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Saman	10	Yok
30	Salinomisin	%10 buğday,%40 mısır	Saman	38	Yok



**Şekil 3.** Büyüme döneminde ziyaret edilen kümeslerden bir görüntü

#### **4.2.2. Örneklerin Toplanması**

Bu çalışmada, Elazığ ve Malatya'daki 3 farklı mezbahaneye getirilen broyler'lerden, karaciğer ve bağırsak örnekleri toplandı. Elazığ ve Malatya'daki kesimhanelere 2015 yılı Ocak-Haziran ayları arasında, toplam 100 farklı kümesten getirilip kesilen broyler'lerden (her kümesten 5 bağırsak ve 5 karaciğer olmak kaydıyla) 500 adet bağırsak ve 500 adet de karaciğer olmak üzere toplam 1000 adet örnek toplanmıştır (Tablo 6).

Bağırsak örneklerinin toplanması sırasında, makroskopik olarak bağırsak epitelinde hemoraji ve mukozada hasar izlenen ve enterit benzeri lezyonlarına benzerlik gösterenlerin toplanmasına dikkat edildi. Kesim sırasında İç organlar takım halinde (Karaciğer ve bağırsak örnekleri) hijyenik koşullarda steril poşetlere

alınarak, en kısa süre içerisinde soğuk muhafazada laboratuvara getirildikten sonra *C. perfringens* yönünden incelenmeye başlandı.

**Tablo 6.** Toplanan örneklerin illere göre kesimhane ve kümes dağılımı

İl	Kesimhane	Kümes Sayısı	Bağırsak	Karaciğer	Toplam
Malatya	A	45	5	5	450
Elazığ	B	30	5	5	300
Malatya	C	25	5	5	250
<b>Toplam</b>		100			1000

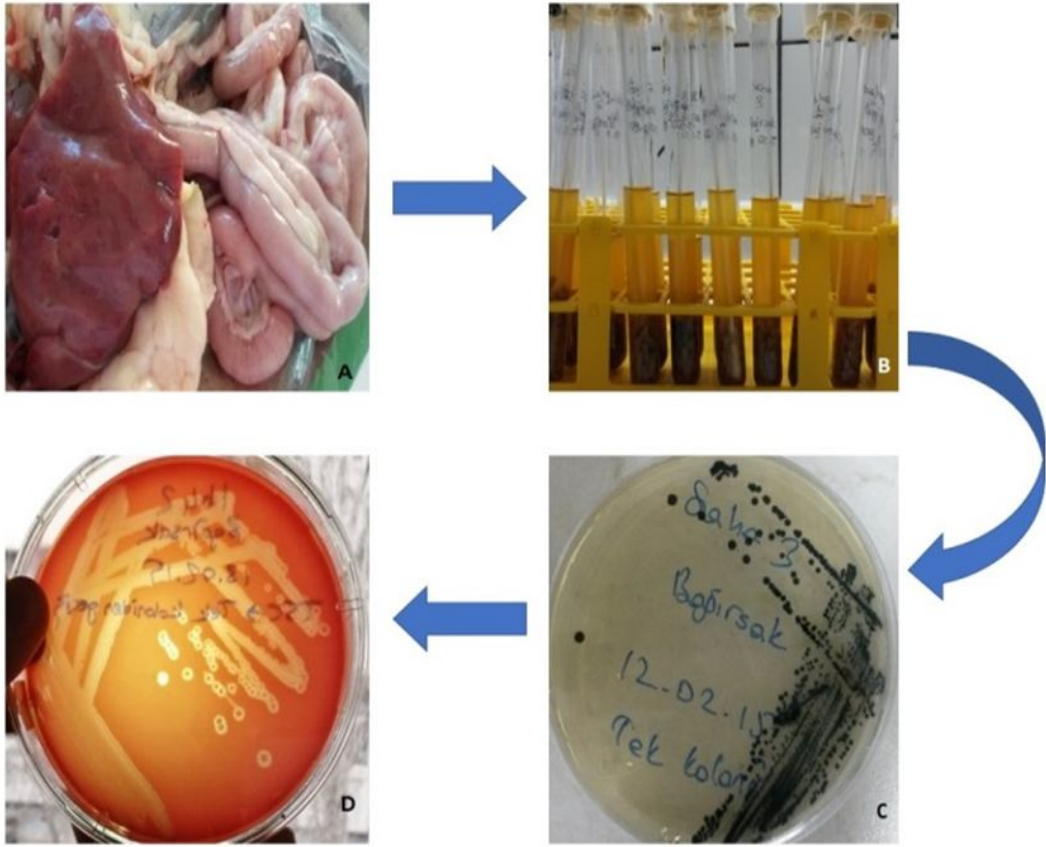
#### 4.2.3. *Clostridium perfringens*'in Kültür Yöntemiyle İzolasyon ve İdentifikasyonu

Laboratuvara ulaştırılan karaciğer ve bağırsak örnekleri önce zenginleştirme işlemine tabi tutularak Cooked Meat Medium (CMM) besiyerine (Oxoid) ekim yapıp  $46 \pm 1.0$  °C'de 24 saat anaerobik jar içerisinde anaerobik ortam sağlanarak inkübasyona bırakıldı. Anaerobik ortam anaerobik gaz kitleri (Anaerocult\_A® Merck 1.13829 CE) ile birlikte anaerobik jar (Merck 1.16387.0001 CE) kullanılarak sağlandı. Anaerobik ortamın sağlanıp sağlanmadığını test etmek amacıyla anaerocult jarların içerisine, bir ucu mavi renk içeren Anaerocult test çubukları (Merck 1.15112.0001 CE) bırakıldı. Test şeridinin kullanım bilgilerine göre 4 saat içinde mavi renkten beyaz renge dönmesi ile anaerobik ortamın sağlanmış olduğu test edildi.

Bağırsak örnekleri, steril pens yardımıyla tutularak yüzeyi spatül ile dağlanıp, duedonum kısmına steril bistüri yardımıyla bir kesi atıldı. Kesi atılan yerden steril eküvyon çubuklarının tüm yüzeyini kaplayacak şekilde alınan bağırsak içeriği, eküvyon çubuklar ile birlikte CMM besiyerine bırakıldı (Şekil 4).

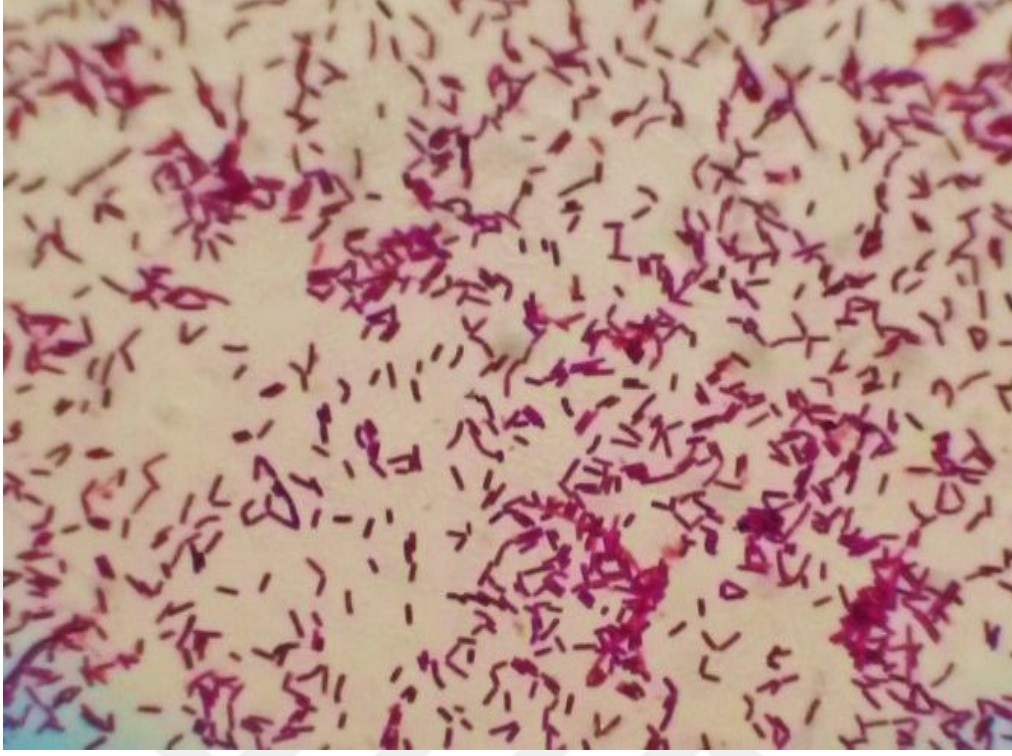
Karaciğer örnekleri de yine aynı şekilde yüzeyi spatül ile dağlanarak steril bistüri yardımıyla açılan bölgenin iç kısmından, yaklaşık 1 gr karaciğer parçası olacak şekilde steril pens yardımıyla CMM besiyerine bırakıldı. CMM besiyerine bırakılan karaciğer ve bağırsak içerikleri  $46 \pm 1.0$  °C'de 24 saat anaerobik inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyonun ardından CMM besiyerinden steril cam pastör pipeti yardımıyla, besiyerinin dip kısmından 100 µl içerik alınıp, içerisinde D-cycloserine supplementi (Merck 10x 1 vial 1.00888.0010) ihtiva eden (200 mg/500ml) selektif TSC (Tryptose Sulphite Cycloserine) agara (Merck 500gr) ekim yapılarak, 37°C' de anaerobik ortamda  $24 \pm 3$  saat inkübasyona bırakıldı.

TSC agarda üreyen *C. perfringens* şüpheli tipik siyah tek kolonilerden en az 3 koloni alınarak %5 koyun kanı içeren kanlı agara (Oxoid 500 gr) ekim yapıp 37°C'de anaerobik ortamda 24 saat inkübasyona bırakıldı. Kanlı agarda üreyen tipik çift zonlu hemoliz oluşturan kolonilere; Gram boyama, hareket ve laktoz fermentasyonu testleri uygulandı. Yine aynı kolonilerden yumurta sarılı agara ekim yapılarak lesitinaz aktivitesinin etkisiyle besiyerinde oluşan opak görünümler elde edildi. Test sonuçlarına göre *C. perfringens* olarak tanımlanan izolatlar moleküler aşamalarda kullanılmak üzere % 40 gliserol içeren CMM besiyerine aktarılarak -80 °C'de muhafaza edildi.



Şekil 4. *C. perfringens*'in karaciğer ve ince bağırsak örneklerinden kültür yöntemiyle izolasyon ve identifikasyon şeması (Orijinal).

- (A) Karaciğer ve bağırsak örnekleri.
- (B) CMM' de zenginleştirilen örnekler.
- (C) TSC agarda üreyen tipik siyah koloniler.
- (D) Kanlı agarda çift zonlu hemoliz.



Şekil 5. *C. perfringens*'in mikroskop görüntüsü (Orijinal).



Şekil 6. *C. perfringens*'in 46°C de, 48 saat 'lik anerobik jar inkübasyonun ardından oluşturduğu sporların mikroskop görüntüsü (Orijinal).

#### **4.2.4. Bağırsak İçeriklerinin Koksidiyoz Varlığı Yönünden İncelenmesi**

Laboratuvara getirilen bağırsakların duvarında hemoraji, bağırsak içinde epitel döküntü ve mukozada hasar şeklinde enterit lezyonlarına benzer görülen bağırsak içerikleri koksidiyoz yönünden incelendi. Duodenumdan alınan yaklaşık 1 gr kadar bağırsak içeriklerinin üzerine doymuş tuzlu su çözeltisi ilave edilerek baget yardımıyla karıştırıldı. Ardından bu karışımın üzerine lamel konularak 20 dk bekletildi. Lamel bir pens yardımıyla lamın üzerine alınarak önce 10X ardından 40X büyütme ile mikroskopta incelendi.

#### **4.2.5. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Yöntemiyle *Cpa* Toksin Varlığının İncelenmesi**

Toplanan bağırsak örnekleri arasında bağırsak mukozasında zedelenme ve hemoraji gibi enterit lezyonlarına benzerlik gösteren bağırsak örneklerinden izole edilen 50 adet *C. perfringens* izolatı alfa toksin üretimi yönünden, ELISA ticari kiti (Biox-Diagnostic, Belgium) kullanılarak kitin prosedürüne göre incelendi. ELISA yöntemindeki diğer aşamalar Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji A.B.D' daki ELISA cihazında gerçekleştirilmiştir.

#### **4.2.6. Kültür Yöntemiyle Elde Edilen *Clostridium perfringens* İzolatlarının PZR Amplifikasyonu ile Toksin Genlerinin Belirlenmesi**

##### **4.2.6.1. Referans Suşlar**

Bu çalışmada *C. perfringens* toksin genlerinin tespiti için pozitif kontrol olarak kullanılan, NCTC 13110 (ATCC 3626), NCTC 8239 ve CCUG 44727

suşları, Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü'nde Yrd. Doç. Dr. H. Şahan GÜRAN, *C.perfringens* Tip A suşu Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, PZR amplifikasyonunda pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere 60 µg NetB toksin gen DNA'sı içeren EHE-NE18 suşu, Avustralya Monash Üniversitesinde Öğretim Üyesi Prof. Dr. Julian Rood'dan temin edilmiştir.

#### 4.2.6.2. DNA İzolasyonu

Kültür yöntemiyle *C. perfringens* olarak identifiye edilen izolatlardan DNA izolasyonu fenol/kloroform ekstraksiyon yöntemiyle gerçekleştirildi. Bu amaçla, -80 °C'de CMM besiyerinde muhafaza edilen *C. perfringens* izolatlarının oda ısısında çözünmesini takiben, CMM besiyerine geçilmesi ile 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası CMM de hazırlanan kültürlerin herbirinden 300 µl alınarak 1.5 ml'lik eppendorf tüpler içerisine aktarıldı. Ardından her bir tüpe eşit hacimde olacak şekilde 300 µl TNES buffer (20 mM Tris- HCl pH: 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, % 0.2 SDS) ve 5 µl Proteinase K (Sigma, 100 µg/ml) ilave edildi. Süspansiyon vortekslenerek 56 °C'de 2 saat su banyosunda inkübasyona maruz bırakıldı. İnkübasyon sonrası Proteinase-K inaktivasyonu için 10 dk. kaynatma işlemi gerçekleştirildi. Kaynatma işleminin ardından eşit hacimde 600 µl fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) ilave edilerek dikkatli bir şekilde elle 5 dakika iyice çalkalandı. Elle iyice çalkaladıktan sonra 13000 rpm de 10 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan iki katmandan alt faza hiç dokunmadan üst faz aynı numaralar verilmiş başka bir tüpe aktarıldı. Alınan

miktarın 2,5 katı kadar % 96'lık etanol ve 1/10'u kadar da 3M sodyum asetat eklenerek, vortekslenip -20 °C'de bir gece bekletildi.

Süspansiyon 10 dakika 13000 rpm de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Elde edilen pelet sırasıyla % 90 ve % 70'lik etanol ile yıkanarak her basamaktan sonra 13.000 rpm'de 5 dk'lık bir santrifüj işlemi uygulandı. Santrifüj sonrası alkol uzaklaştırıldı ve pelet kurumaya bırakıldı. Kuruyan pelet 100 µl steril distile su ile sulandırılarak PZR'da hedef DNA olarak kullanıldı.

#### **4.2.6.3. *Cpa* Toksin Geni'nin PZR ile Amplifikasyonu**

Kültür yöntemiyle identifiye edilen *C. perfringens* izolatları PZR amplifikasyonu ile *Cpa* toksin geni yönünden doğrulandı. Toplam 50 µl'lik hacimde hazırlanan PZR karışımına 5 µl 10X PCR buffer (750 Mm Tris-HCl, pH 8.8, 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, % 0.1 Tween- 20), 5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, deoksinükleotidlerin her birinden 250 µM, 5U Taq DNA Polymerase enzimi (MBI, Fermentas) ilave edilerek, Yoo ve ark. (14) tarafından bildirilen ve *Cpa* toksin genine spesifik oligonükleotid primer çiftinin (Tablo 7) her birinden 20 pmol ve 5 µl template DNA ilave edildi. PZR reaksiyonları Techne TC-512 gradient thermalcyler (Techne, İngiltere) cihazında gerçekleştirildi. PZR amplifikasyonunda 94 °C'de 5 dakika ön denatürasyon aşamasını takiben, toplam 30 PZR siklusu olacak şekilde 94 °C'de 1 dakika denatürasyon, 55 °C'de 1 dakika hibridizasyon ve 72 °C'de 1 dakika uzama olarak gerçekleştirildi. Son siklusu müteakip 72 °C'de 3 dakika son uzama işlemi yapıldı.

Amplifiye edilen PCR ürünleri % 1.5' luk agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra ethidium bromide (10 mg/ml) ile 25 dk süreyle

boyandı ve UV transilluminatörde incelenerek sonuçlar gözlemlendi. Oluşan bantların moleküler ağırlığını saptamak amacıyla 100 bp'lik DNA ladder (MBI, Fermentas SM 0321) kullanıldı. Pozitif kontrol olarak referans *C. perfringens* Tip A suşu (Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü) ve negatif kontrol olarak ise distile su kullanıldı. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi neticesinde oluşan 402 bp uzunluğundaki bantlar *C. perfringens* *Cpa* toksin geni pozitif olarak kabul edildi.

#### **4.2.6.4. *Clostridium perfringens* Toksin Genlerinin Multipleks PZR Yöntemiyle Tespiti**

Bu çalışmada multipleks PZR yöntemiyle *C. perfringens*'in toksin tiplendirmesi için, primer büyüklüğü 196 ile 655 bp arasında değişen gen bölgelerini amplifiye eden spesifik primerler kullanıldı (Tablo 7).

Toplam 50 µl 'lik hacimde hazırlanan PZR karışımına 6 µl 10X PCR buffer (750 Mm Tris-HCl, pH 8.8, 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, % 0.1 Tween - 20), 6 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, deoksinnükleotidlerin her birinden 250 µM, 5U Taq DNA Polymerase enzimi (MBI, Fermentas), 20 pmol'lük *Cpa*, *Cpb*, *Cpb2*, *Etx*, *iA*, *Cpe* toksin genlerine spesifik oligonükleotid primer çiftlerinin her birinden 1 µl ve 5 µl template DNA ilave edildi. PZR reaksiyonları Techne TC-512 gradient thermalcycler (Techne, İngiltere) cihazında gerçekleştirildi. PZR amplifikasyonunda 94 °C'de 2 dakika ön denatürasyon aşamasını takiben, toplam 30 PZR siklusu olacak şekilde 94 °C'de 1 dakika denatürasyon, 55 °C'de 1 dakika hibridizasyon ve 72 °C'de 2 dakika uzama olarak gerçekleştirildi. Son siklusu müteakip 72 °C'de 5 dakika son uzama işlemi yapıldı.

Amplifiye edilen PZR ürünleri % 1.5' luk agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra ethidium bromide (10 mg/ml) ile 25 dk süreyle boyandı ve UV transilluminatörde incelenerek sonuçlar analiz edildi. Oluşan bantların moleküler ağırlığını saptamak amacıyla 100 bp 'lik DNA ladder (MBI, Fermentas SM 0321) kullanıldı. Pozitif kontrol olarak NCTC 13110 (ATCC 3626), NCTC 8239 ve CCUG 44727 suşları ve negatif kontrol olarak ise distile su kullanıldı.

#### **4.2.6.5. NetB Toksin Geni'nin PZR ile Amplifikasyonu**

Elde edilen *C. perfringens* izolatlarında NetB toksin geninin varlığını araştırmak amacıyla Anthony Keyburn ve ark. (64) tarafından bildirilen bir çift spesifik primer kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirildi. NetB toksin gen amplifikasyonu için PZR karışımı, *Cpa* toksin gen amplifikasyonunda bildirilen yoğunluklarda hazırlandıktan sonra amplifikasyon işlemi; 94 °C'de 2 dakika ön denatürasyon aşamasını takiben, toplam 35 PCR siklusu olacak şekilde 94 °C'de 30 saniye denatürasyon, 55 °C'de 30 saniye hibridizasyon ve 72 °C'de 1 dakika uzama olarak gerçekleştirildi. Son siklusu müteakip 72 °C'de 12 dakika son uzama işlemi yapıldı (64). Amplifiye edilen PCR ürünleri % 1.5' luk agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra ethidium bromide (10 mg/ml) ile 25 dk süreyle boyamayı takiben, sonuçlar UV transilluminatör altında incelenerek analiz edildi. Pozitif kontrol olarak Avustralya Monash Üniversitesindeki Prof. Dr. Julian Rood'dan temin edilen EHE-NE18 suşuna ait NetB toksin geni içeren DNA kullanıldı.

**Tablo 7.** PZR analizlerinde toksin genleri için kullanılan primer çiftleri

Genler	Oligonükleotid Sekansı (5'-3')	Uzunluk (bp)	Literatür
<b>Alfa toksin</b> ( <i>cpa</i> )	GTTGTAAGCGCAGGACATGTAAAG CATGTAGTCATCTGTTCCAGCATC	402	14
<b>Beta toksin</b> ( <i>cpb</i> )	GCGAATATGCTGAATCATCTA GCAGGAACATTAGTATATCTTC	196	136
<b><math>\beta</math>2 toksin</b> ( <i>cpb2</i> )	AGATTTTAAATATGATCCTAACC CAATACCCTTCACCAAATACTC	567	146
<b>Epsilon toksin</b> ( <i>etx</i> )	CGGGTGATATCCATCTATTC CCACTTACTTGTCCTACTAAC	655	136
<b>Iota toksin</b> ( <i>iA</i> )	AAACGCATTAAGCTCACACC GTGCATAACCTGGAATGGCT	293	136
<b>Enterotoksin</b> ( <i>cpe</i> )	GGAGATGGTTGGATATTAGG GACAGGGGCATACCCATATA	506	147
<b>NetB toksin</b> ( <i>NetB</i> )	GCTGGTGCTGGAATAAATGC TCGCCATTGAGTAGTTTCCC	384	63

#### **4.2.7. *Clostridium perfringens* İzolatlarının Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) Yöntemiyle Genotiplendirilmesi**

Elazığ ve Malatya illerinde üç farklı kesimhaneye ait kümeslerden elde edilen 61 adet saf *C.perfringens* izolatlarına PFGE yöntemi uygulandı. İzolatlar arasındaki seçim; iki farklı ildeki kümeslerin birbirine olan uzaklık mesafesi ele alınarak incelendi. PFGE metodu, Lukinmaa ve ark. (128)'nin kullandığı metot modifiye edilerek gerçekleştirildi.

Kromozomal DNA önce agaroz dolguların içine gömülüp enzimlerle muamele edilerek protein artıklarından arındırılıp saf DNA elde edildi. Bu dolgular daha sonra belli boyutlarda *SmaI* RE enzimi ile kesilerek ardından jeldeki küçük kuyucuklara aktarıldı. PFGE analizleri sonucunda oluşan bant profilleri suşlar arasındaki genetik ilişkilere göre kategorilere ayrılarak yorumlanması için Gel Compare II yazılım sistemi (version3.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edildi (Şekil 10). PFGE profillerinin, dendogramı oluşturularak kümeleşme analizi yapıldı (Şekil 11).

##### **4.2.7.1. İzolatların Hazırlanması**

Daha önceden biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle *C. perfringens* olduğu tanımlanan ve -80 °C'de kriyoviallerde saklanan bakteriler oda sıcaklığında çözdürüldükten sonra kanlı agara ekim yapılarak 37 °C'de anaerobik ortamda 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun 24 saati geçmemesine özen gösterildi. Kanlı agarda saf olduğu kontrol edilen kolonilerden bir öze dolusu toplanarak 3 ml Brain Heart Infusion Broth'a (BHI) süspanse edildi. Süspanسیون

spektrometrede 620 nm'de 1.5 absorbans olacak şekilde bakteri yoğunluğu ayarlandı. Süspansiyon 3.000 rpm'de 2 dk boyunca 4 °C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atılıp üzerine 1 ml soğuk hücre süspansiyon tamponu (HST) (100 mM Tris-HCL (Sigma), 100mM EDTA (Sigma), pH: 8.0) içinde süspanse edildi. Bu hücre süspansiyonu 2500 rpm'de 4 °C'de, 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstteki sıvı atıldı. Peletin üzerine tekrar 1 ml soğuk HST eklenerek kısa süreli vorteks yapıldı. Bakteri süspansiyonu agaroz gömölünceye kadar kırık buz içerisinde bekletildi.

#### **4.2.7.2. İzolatların Agaroz Gömölmesi**

HST içerisinde %2'lik düşük erime ısılı agaroz (SeaKem Gold Agarose) hazırlandı. Agaroz karışımından 250 µl alınarak 50 °C'deki kuru ısı bloğunda bekleyen eppendorf tüplere dağıtıldı. Her suş için bir agaroz kalıbı işaretlenip buz kabına oturtuldu. HST içinde hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 250 µl alınarak, 50 °C'de tutulan ve içerisinde 250 µl düşük erime ısılı agaroz bulunan eppendorf tüplere eklendi. Birkaç defa pipetaj yapılarak hücrelerin agaroz içinde homojen dağılması sağlandı. Bekletilmeden hücre-agaroz karışımından hava kabarcığı olmayacak şekilde agaroz kalıbına (10 mm x 5 mm x 1.5 mm, Bio Rad Laboratories) 100 µl olacak şekilde dağıtıldı. Kalıplar agaroz katılaşıncaya kadar + 4 °C' de 15 dk bekletildi.

#### 4.2.7.3. Agaroz İçindeki Hücrelerin Parçalanması

5 ml'lik steril kapaklı tüplere 1 ml hücre Lizis solüsyonu I (1 M NaCl, 10 mM Tris ph:8.0, 5gr/lt N-Lourylsarcosine (Sigma), 2gr/lt Sodium deoxycholate (sigma), 2.5mg/ml lizozim (sigma), 20 µg/ml Rnase (Thermo Scientific) konuldu. İçerisinde bakteri bulunan agaroz, kalıptan çıkarılarak Lizis I solüsyonuna yerleştirildi. 37 °C'de 18 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi. Lizis I solüsyonu dökülerek, yerine 1 ml Lizis II (0.5 M EDTA (ph: 8.0), 10 gr/lt N-lourylsarcosine, 1 mg/ml Proteinaz K) solüsyonu konuldu. 54 °C'de 1 gece bekletildi. Daha sonra Lizis II solüsyonu dikkatlice aspire edildi. İçinde agaroz kalıp bulunan tüpler, 3 kez ultra steril saf su ile 3 kez de TE (10mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, ph:7.6) tamponuyla 15 dk'lık aralarla yıkanarak 50 °C'ye ısıtılmış olan çalkalamalı su banyosunda bekletildi.

#### 4.2.7.4. Agaroz Kalıpları İçindeki DNA'nın Restriksiyon Enzimi (RE) ile Kesilmesi

*C. perfringens* izolatları için daha önce araştırmacılar arasında en etkili RE'nin *SmaI* (Thermo Scientific 10U/µl) enzimi olduğu ortaya konulmuş (129) ve bu çalışmada da *SmaI* RE enzimi kullanılmıştır.

DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistüri yardımıyla 1/3 oranında kesildi. Parçalardan biri 100 µl 1X *SmaI* tamponu içerisinde çalkalamalı su banyosunda 25 °C'de 30 dk bekletildi. Diğer parçalar sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere TE tamponu içinde +4 °C'de saklandı. Sonra sıvı aspire edildi. Her agaroz kalıbı için hesaplanan 1X 40U *SmaI* enzimi, steril ultra

saf su içine ilave edilerek, enzimin tamponu ile yıkanmış agaroz kalıba konulup, çalkalamalı su banyosunda 25 °C’de 6 saat inkübe edildi.

#### **4.2.7.5. Elektoroforez Jelinin Hazırlanması ve Kalıpların Jele Yüklenmesi**

0.5 TBE (44.5 mM Trisma base, 44.5mM Borik asit, 1mM EDTA, ph: 8.0) içinde 100 ml olacak şekilde %1’lik agaroz (Pulsed Field Certified Agarose, Bio Rad Labotatories) hazırlandı. RE ile kesilmiş agarozla gömülü kalıpların her biri, 15 dişli tarağın uç kısmına yerleştirildi. Örnek konulan kısım DNA’nın yürüyeceği yöne gelmek kaydıyla, tarak agaroz dökülecek kasetin içine yerleştirildi. Su banyosundan çıkarılmış ve sıcaklığı yaklaşık 45-50 °C olan agaroz dikkatli bir şekilde hava kabarcığı oluşturulmadan kaset içine döküldü. Oda ısısında 20-30 dakika katılaşmaya bırakıldı. Sonra agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarılıp, tabla üzerindeki agaroz içerisinde 2000 ml 0.5 X TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirildi. CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad Laboratories, Belgium) uygulanan elektroforez koşulları: Başlangıç vuruş süresi 0.5 saniye, bitiş vuruş süresi 40 saniye, vuruş açısı 120°, akım 6V/cm<sup>2</sup>, sıcaklık 14 °C, süre 21 saat olarak ayarlandı.

#### **4.2.7.6. Sonuçların Gözlenmesi ve Analizi**

Elektroforezden sonra jel, 5 µg/ml ethidium bromide (10 mg/ml) içeren 400 ml ultra saf su içine alınıp 20 dakika boyanarak UV transilluminatör altında görüntülendi. DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekilerek TIFF formatında kaydedildi. Gel Compare II yazılım sistemi (version3.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edildi. PFGE profillerinin, dendogramı oluşturularak kümeleşme analizi yapıldı. Bantlara bağlı

''Dice'' benzerlik katsayısına göre farklı kümeslerden elde edilen suşlar arasındaki ilişkiler belirlendi. Benzerlik katsayısı hesaplamasında bant ve profil toleransı %1.3 olarak alındı. PFGE profillerinin dendogram analizi İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Mikrobiyoloji A.B.D'da gerçekleştirilmiştir.



## 5. BULGULAR

### 5.1. *Clostridium perfringens*'in Kültür Yöntemiyle İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Üç farklı kesimhaneden toplanan 500 adet bağırsak içeriğinden %60.8'inde (304/500) ve 500 adet karaciğer örneğinden %71.2'sinde (356/500) uygulanan konvansiyonel kültür yöntemi neticesinde *C. perfringens* yönünden pozitiflik saptandı. Kesimhaneler arasındaki bakteri üreme oranları ele alındığında Elazığ B kesimhanesinde toplam 300 örnekten %73.3 oranında (220/300), Malatya A kesimhanesinde toplam 450 örnekten %69.3 oranında (312/450), Malatya C kesimhanesinde toplam 250 örnekten %51.2 oranında (128/250) *C. perfringens* yönünden pozitiflik saptandı (Tablo 8).

Kültür yöntemiyle elde edilen *C. perfringens* izolatlarının kesimhaneler arasındaki *C. perfringens* izolasyon oranlarındaki farklılıklar Pearson Chi-Square ( $\chi^2$ ) testi ile değerlendirilerek istatistiksel anlamda önemli bulundu ( $P<0,01$ ) (Tablo 9). *C. perfringens* izolasyonu yönünden pozitiflik saptanan örnek türü (karaciğer ve ince bağırsak) arasındaki farklılıklar da Pearson Chi-Square ( $\chi^2$ ) testi ile değerlendirilerek istatistiksel anlamda önemli bulundu ( $P<0,01$ ) (Tablo 11).

**Tablo 8.** Kesimhanelere göre toplam *C. perfringens* izolatlarının dağılımı

Numune	İller	Toplam	İzolasyon	%*
		Örnek Sayısı	Sayısı	
Bağırsak	Elazığ- B	300	220	73.3
İçeriği ve	Malatya- A	450	312	69.3
karaciğer	Malatya- C	250	128	51.2
<b>Genel toplam</b>		<b>1000</b>	<b>660</b>	<b>66</b>

\*P<0,001

**Tablo 9.** Toplam *C. perfringens* izolatlarının kesimhanelere göre prevalansı

Numune	İller	<i>C. perfringens</i> Pozitif Örnek Sayısı ve Yüzdesi		
		N	(X <sup>2</sup> ) *	%
Bağırsak	Elazığ- B	300	220 <sup>a</sup>	73.3
İçeriği ve	Malatya- A	450	312 <sup>a</sup>	69.3
karaciğer	Malatya- C	250	128 <sup>b</sup>	51.2
<b>Genel toplam</b>		<b>1000</b>	<b>660</b>	<b>66</b>

\* Pearson Chi-Square

a, b: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılık önemlidir (P<0,01)

**Tablo 10.** Broyler'lerden elde edilen *C. perfringens* izolatlarının örnek türüne ve yerleşim yerine göre dağılımı

İl	Örnek türü		İzolat sayısı
	Karaciğer	İnce bağırsak	
Elazığ-B	120	100	220
Malatya-A	165	147	312
Malatya-C	71	57	128
<b>Toplam</b>	<b>356</b>	<b>304</b>	<b>660</b>

**Tablo 11.** Broyler'lerden elde edilen *C. perfringens* izolatlarının örnek türüne göre prevalansı

Örnek türü		
	Karaciğer	İnce bağırsak
f/n - (X <sup>2</sup> ) *	356 <sup>a</sup> /660	304 <sup>b</sup> /660
(%)	(54)	(46.06)

f/n ( f: *C.perfringens* örnek tipine göre elde edilen izolat sayısı; n:Toplam örnek sayısı)

\* Pearson Chi-Square

a, b: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılık önemlidir (P<0,01).

## **5.2. Bağırsak İçeriklerinin Koksidiyoz Varlığı Yönünden İncelenmesinde Elde Edilen Bulgular**

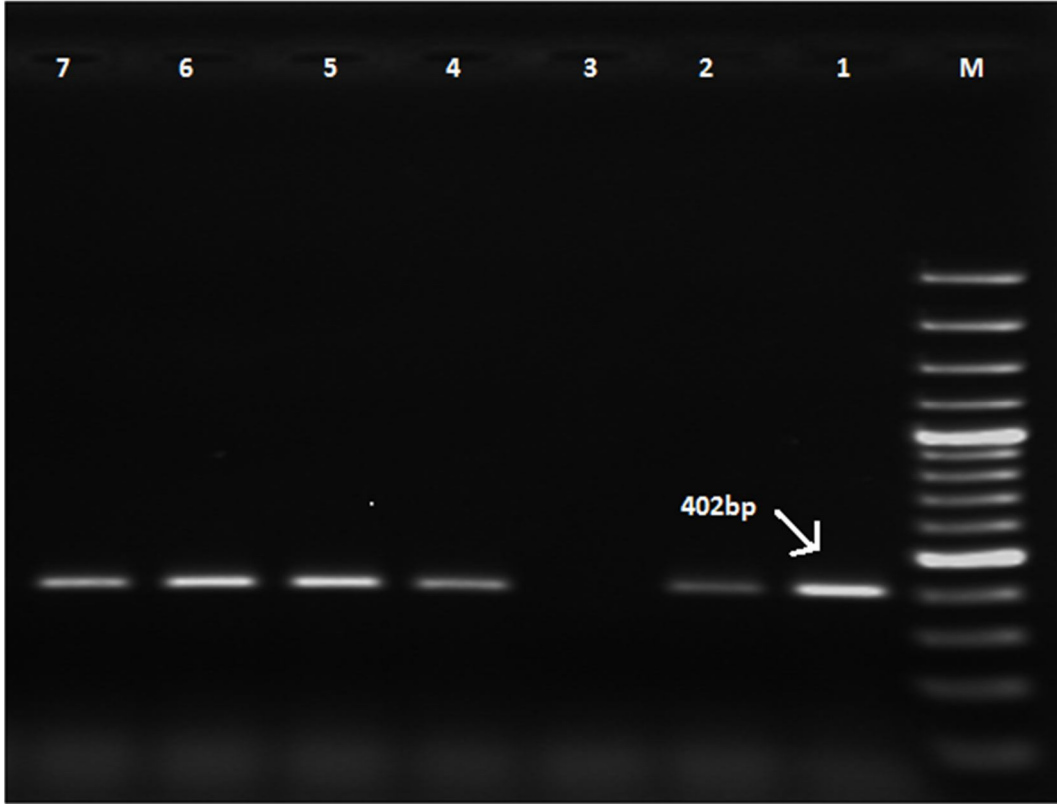
Bağırsak örnekleri koksidiyoz etkenleri yönünden tuzlu su ile flotasyon tekniği kullanılarak incelendi. Yapılan mikroskopik incelemeler sonucunda hiçbir örnekte *Eimeria* ookistlerine rastlanmadı.

## **5.3. *Clostridium perfringens* İzolatlarının ELISA ile Alfa Toksin Yönünden İncelenmesinde Elde edilen Bulgular**

Toplanan bağırsak örnekleri arasında bağırsak mukozasında zedelenme ve hemoraji gibi enterit lezyonlarına benzerlik gösteren bağırsak örneklerinden izole edilen 50 adet *C. perfringens* izolatları Alfa toksin yönünden ELISA ticari kiti ( Biox-diagnostic Belgium) ile kit de anlatılan prosedüre göre incelendi. İncelenen 50 adet *C. perfringens* izolatı alfa toksin varlığı yönünden pozitif reaksiyon verdi.

#### 5.4. *Cpa* Toksin Geni PCR Amplifikasyon Bulguları

Kültür yöntemi ile belirlenen toplam 660 *C. perfringens* izolatından ekstrakte elde edilen DNA örneklerinde *Cpa* geni için PZR reaksiyonu sonrası yapılan agaroz jel elektroforezinde *Cpa* için 402 bp büyüklüğünde bantların oluşumu beklendi. PZR işlemi sonucunda 660 izolatın 657'sinin *Cpa*, (%99.5) toksin genini içerdiği tespit edildi. Dolayısıyla alfa toksin geni *C.perfringens*'in tüm tiplerinde bulunduğundan, PZR ile 657 izolat *C. perfringens* olarak tanımlandı. (Şekil 7).



**Şekil 7.** *C. perfringens* olarak tanımlanan kültürlerden elde edilen DNA'ların *C.perfringens Cpa* toksin genine spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR analizi sonucunda oluşan ürünlerin etidium bromide ile boyanmış bir agaroz jelde görünümü.

M: DNA ladder (100 bp)

1: *C. perfringens* Tip A pozitif kontrol

2: *C. perfringens* izolatu (*Cpa* toksin geni yönünden pozitif)

3: Negatif kontrol

4: *C. perfringens* izolatu (*Cpa* toksin geni yönünden pozitif)

5: *C. perfringens* izolatu (*Cpa* toksin geni yönünden pozitif).

6: *C. perfringens* izolatu (*Cpa* toksin geni yönünden pozitif)

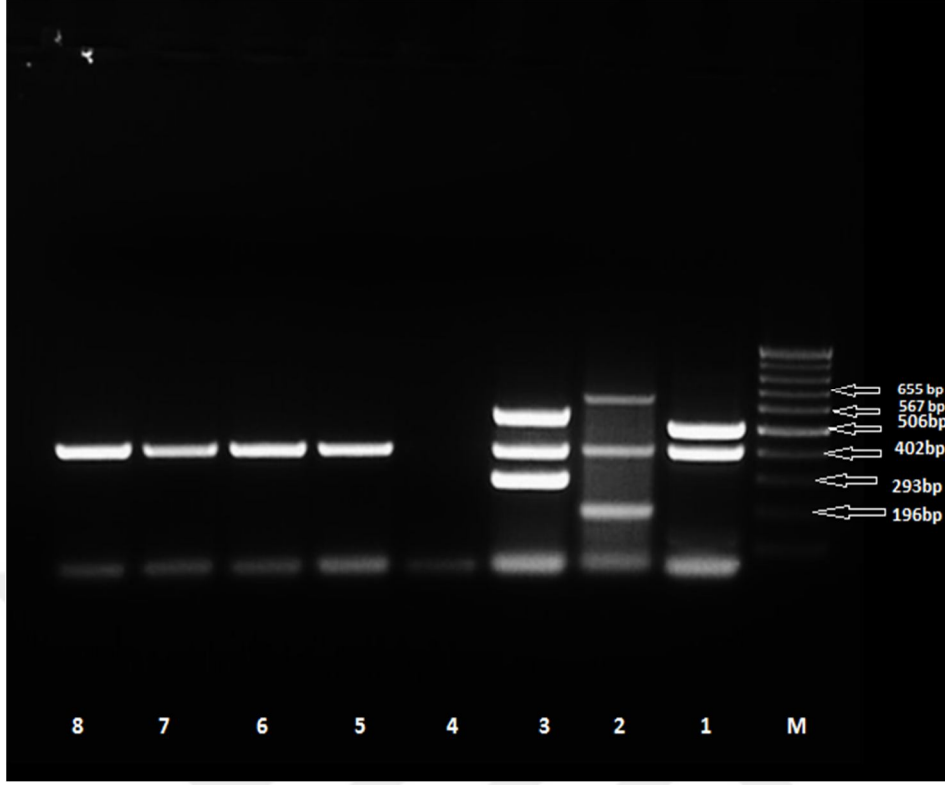
7: *C. perfringens* izolatu (*Cpa* toksin geni yönünden pozitif)

### 5.5. *Clostridium perfringens* İzolatlarının Toksin Genlerinin Multipleks PZR

#### Bulguları

Kültür yöntemi ile belirlenen toplam 660 *C. perfringens* izolatından ekstrakte elde edilen DNA örneklerinde multipleks PZR reaksiyonu sonrası yapılan agaroz jel elektroforezinde *cpa* için 402 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 PZR işlemi sonucunda 657 izolatın tamamının *cpa*, (%99.5) toksin genini içerdiği tespit edildi (Şekil 8). Ayrıca izolatların hiçbirinin *cpb*, *etx*, *iA*, *cpe*, *cpb2* toksin genlerinden herhangi birini bulundurmadığı saptandı. Bu sonuçlar ile 657 *C. perfringens* izolatının (% 99.5) tip A olduğu belirlendi.



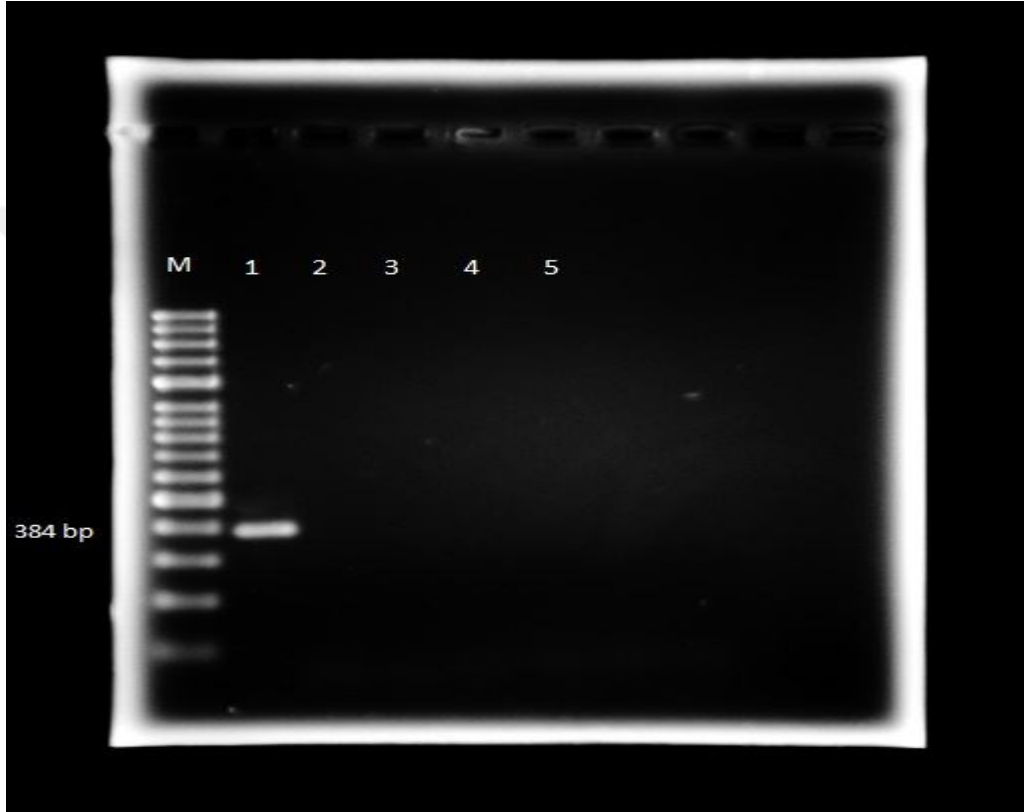
**Şekil 8.** Çalışmada kullanılan pozitif kontroller ve Alfa toksin geni pozitif çıkan *C. perfringens* DNA'larının Ethidium Bromide ile boyanmış agaroz jeldeki görüntüsü.

196 bp : <i>Cpb</i> toksin geni	M. Marker	6. <i>Cpa</i> pozitif izolat
402 bp: <i>Cpa</i> toksin geni	1. CCUG 44727	7. <i>Cpa</i> pozitif izolat
655 bp: <i>Etx</i> toksin geni	2. NCTC 13110	8. <i>Cpa</i> pozitif izolat
293 bp: <i>iA</i> toksin geni	3. NCTC 8239	
506 bp: <i>Cpe</i> toksin geni	4. Negatif kontrol (distile su)	
567 bp: <i>Cpb2</i> toksin geni	5. <i>Cpa</i> pozitif izolat	

### 5.6. NetB Toksin Geni PZR Bulguları

Elde edilen *C. perfringens* izolatlarında NetB toksin geninin varlığını araştırmak amacıyla Anthony Keyburn ve ark. (64) tarafından bildirilen bir çift spesifik primer kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirildi. PZR amplifikasyonunda

pozitif kontrol olarak Avustralya Monash Üniversitesi'ndeki Prof. Dr. Julian Rood'dan temin edilen EHE-NE18 suşu kullanıldı (Şekil 9). PCR reaksiyonu sonrası yapılan agaroz jel elektroforezinde *NetB* için 384 bp büyüklüğünde bant oluşumu beklendi. Ancak 657 adet *C. perfringens* izolatlarının hiçbirinin *NetB* toksin genini bulundurmadığı saptandı.



**Şekil 9.** Çalışmada kullanılan *NetB* pozitif kontrolü ve *NetB* toksin geni içermeyen *C. perfringens* DNA'larının ethidium bromide ile boyanmış agaroz jeldeki görüntüsü.

M: DNA ladder(100 bp)

1. Pozitif kontrol ( EHE-NE18 –*NetB* toksin geni pozitif)
2. Negatif kontrol (Distile su)
3. *C. perfringens* izolatı (*NetB* negatif)
4. *C. perfringens* izolatı (*NetB* negatif)
5. *C. perfringens* izolatı (*NetB* negatif)

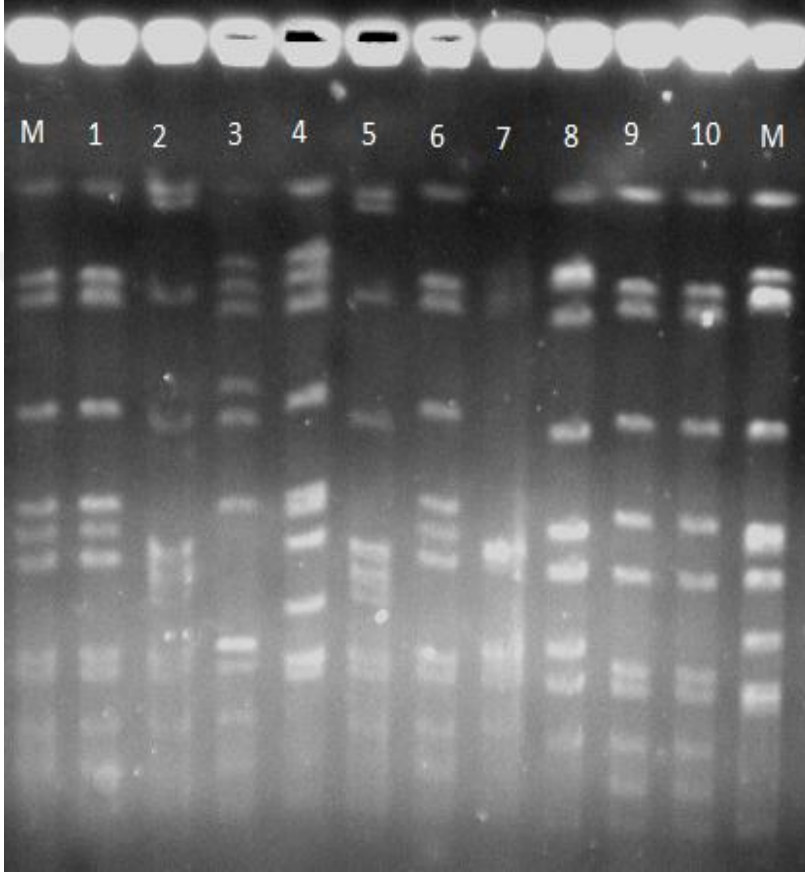
## 5.7. *Clostridium pefringens* İzolatlarının PFGE Yöntemi ile Genotiplendirme Bulguları

Farklı kümeslerden elde edilen *C. pefringens* izolatlarından kümeslere göre dağılımını, kümesler arası klonal ilişkiyi belirlemek adına 61 adet alfa toksin yönünden pozitif bulunmuş izolat seçildi. İzolat seçimi, kümes ve kesimhane farklılığını ortaya koymak adına belirlendi. Farklı kesimhanelerden elde edilen seçilmiş saf izolatlar arasındaki genetik ilişkiyi ortaya koymak amacıyla PFGE metodu uygulandı (146). 61 adet İzolat Elazığ ve Malatya illerinde birbirlerine en uzak mesafedeki kümeslerden seçilmiştir. PFGE analizleri sonucunda oluşan bant profillerinin suşlar arasındaki genetik ilişkilere göre kategorilere ayrılarak yorumlanması için Gel Compare II yazılım sistemi (version3.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edildi. PFGE profillerinin, dendogramı oluşturularak kümeleşme analizi yapıldı. Bantlara bağlı "Dice" benzerlik katsayısına göre farklı kümeslerden elde edilen suşlar arasındaki ilişkiler belirlendi. Benzerlik katsayısı hesaplamasında, bant ve profil toleransı %1.3 olarak alındı.

Yapılan dendogram analizi sonucunda "Dice" benzerlik katsayısı %100 olarak belirlendi. İncelenen 61 izolattan toplam 30 genotip bulundu. Bu 30 genotipi içinde bulunduran toplam 17 küme (cluster) saptandı. Küme I; 9 elmanı ile en büyük küme, onu 7 elemanlı küme 7 takip etmektedir (Şekil 11).

Küme I'in tamamı Elazığ B kesimhanesinden elde edilmiş izolatlar (Kümes no:15, 19, 40, 7, 2, 5, 11, 16, 44) olup 9 farklı kümesi içine almıştır. Bunların kendi içerisinde heterojen kümes dağılımına sahip olduğu görülmektedir. Yine

Küme 7 nin tüm elemanları Malatya A kesimhanesinden elde edilmiş izolatlar (kümes no: 78, 85, 25, 30, 42, 12) heterojen küme dağılımı vermektedir. Bunun yanında 2 elemanlı küme 12'nin elemanlarından biri Elazığ'a ait, diğeri Malatya kümeslerinden birine ait olarak bulunmuştur (Şekil 11).



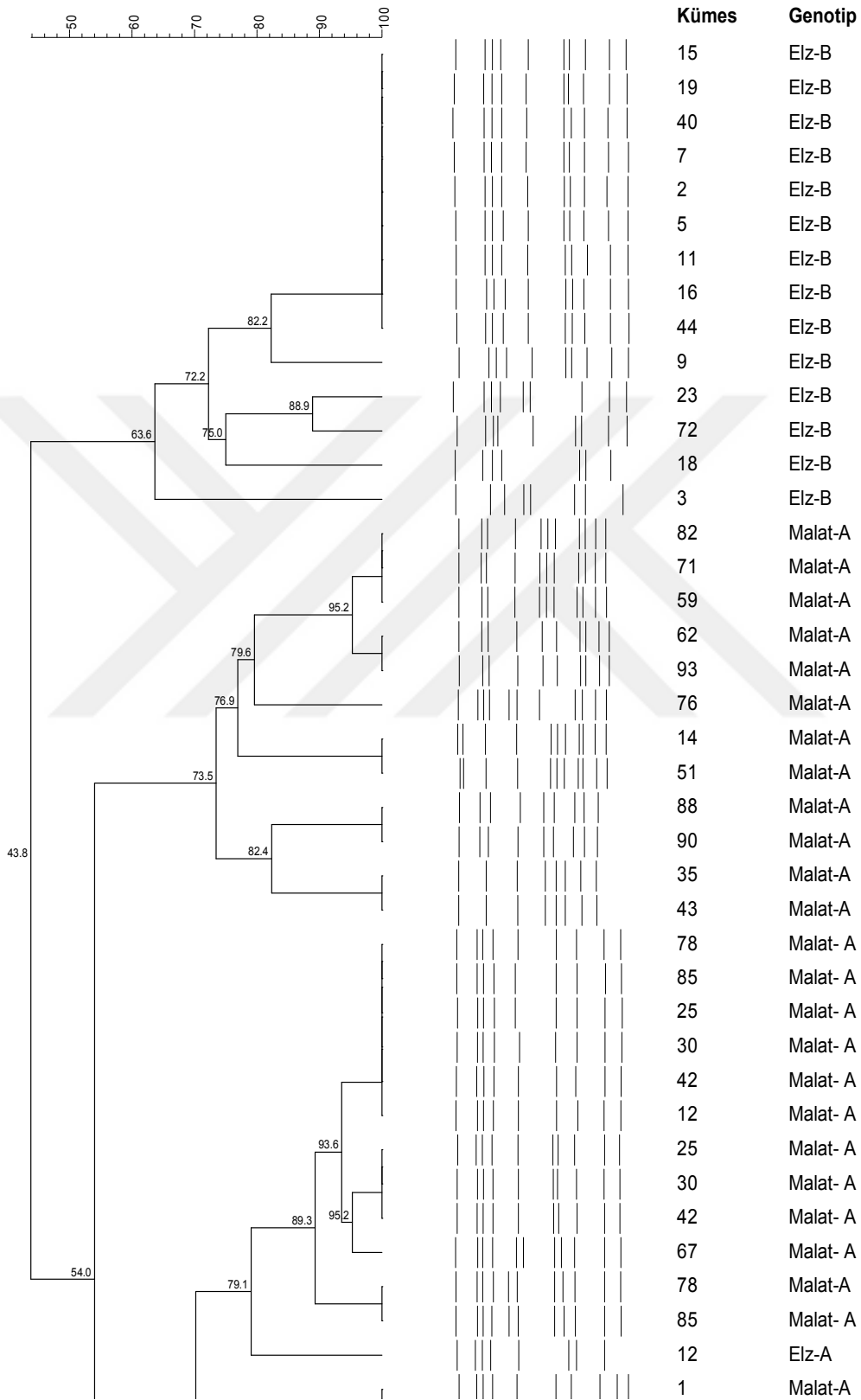
**Şekil 10.** *SmaI* enzimi ile kesilen *C. perfringens* saf izolatlarına ait PFGE ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jelde görünümü.

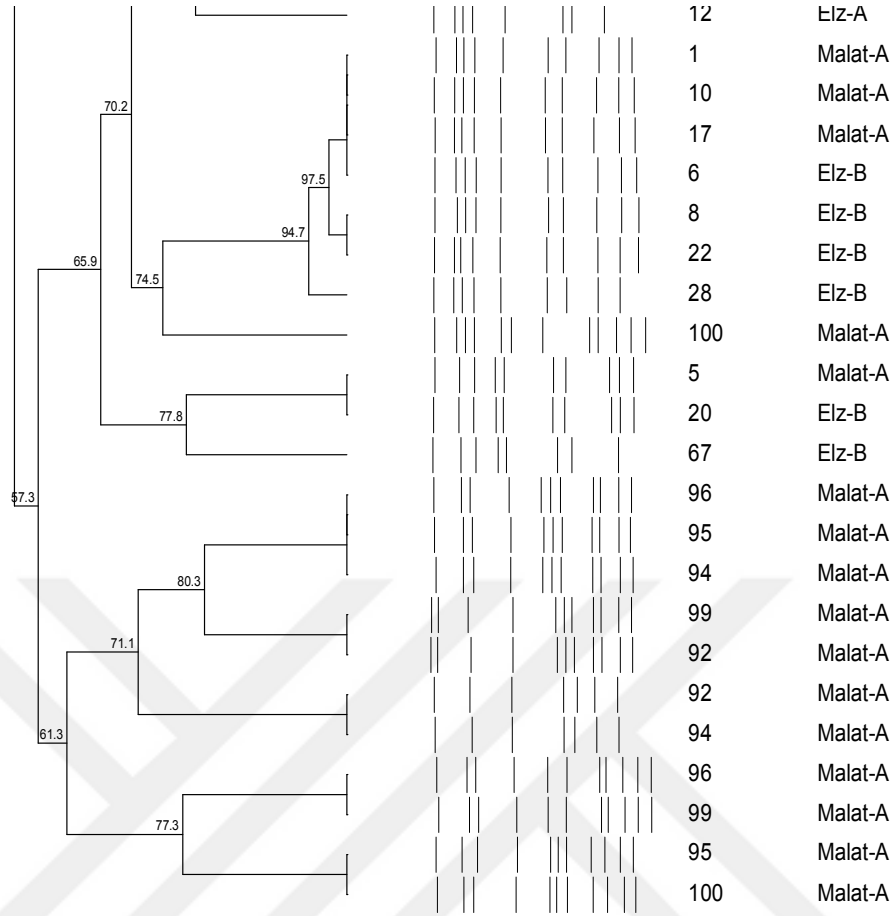
M: *C. perfringens referens* tip A (alfa toksin) suşu

- |                             |                             |
|-----------------------------|-----------------------------|
| 1) A-bağırsak-82 nolu kümes | 6) B-bağırsak-5 nolu kümes  |
| 2) A-bağırsak-51 nolu kümes | 7) B-bağırsak-3 nolu kümes  |
| 3) A-bağırsak-76 nolu kümes | 8) B-bağırsak-20nolu kümes  |
| 4) A-bağırsak-42 nolu kümes | 9) B-bağırsak-28 nolu kümes |
| 5) A-bağırsak-14 nolu kümes | 10) B-bağırsak-6 nolu kümes |

C. perfringens Sma-I

C. perfringens Sma-I





Şekil 11. PFGE yöntemi sonucu *C. perfringens* izolatlarına uygulanan dendrogram grafiği.

## 6. TARTIŞMA

*C. perfringens* kanatlılarda normal bağırsak flora bakterisi olarak bulunmaktadır. Ancak bazı çevresel faktörlerin de etkisiyle kendisine uygun bir ortam bulduğu andan itibaren floranın sessiz sakini iken birden patojen hale geçebilmektedir. Avrupa Birliği ve ülkemizde 2006 yılından itibaren kanatlı yemlerinde antibiyotiklerin büyütme faktörü olarak kullanımının yasaklanması ile birlikte, Dünya’da kanatlılarda yapılan birçok çalışmada NE vakalarında artışlar görülmüştür (91, 93). Bu NE’deki yüksek insidens NE salgınlarını tedavi etmek için bu kezde terapötik amaçlı antibiyotik kullanımının artışına neden olmuştur (91, 120).

Ancak halen Amerika Birleşik Devletleri’nde ve Kanada’da yemlerde büyütme faktörü olarak kullanılmasına devam edilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri’nde FDA (Food and Drug Admisitration)’nın 1951 yılında hayvan yemlerinde antibiyotik kullanımına izin verdiği tarihten itibaren tüm dünya’da hayvanlarda antibiyotik kullanımı hızlı bir şekilde artış göstermiştir. Avrupa birliğinde de antibiyotik kullanım oranı neredeyse %50’yi bulmuştur (82). Hollanda’da 1990 yılında insanların bir yıl içinde toplam olarak kullandığı antibiyotik miktarı 80.000 kg iken, hayvanlarda kullanılan antibiyotik miktarının 300.000 kg olduğu tahmin edilmektedir (87). Ülkemizde gerek geçmişte yemlerde büyütme faktörü olarak, gerekse terapötik amaçlı antibiyotik kullanımı ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır.

Antibiyotik büyütme faktörleri, kanatlılarda NE subklinik vakalarının meydana gelmesini engellediği için kullanım yasaklandığı andan itibaren kanatlı

sektörü büyük bir alarm vermiştir. Bunlar bağırsak mikroflorasında özellikle Gram pozitif bakteriler üzerine inhibe edici veya öldürücü etkiye sahiptir (85, 127).

NE oluşumundaki muhtemel risk faktörler ele alındığında koksidiyoz, ani yem değişiklikleri, yemlerdeki NOP miktarının çok yüksek olması, çevresel faktörlerden; kullanılan altlığın kalitesi, kümes şartları, yetersiz havalandırma gibi daha birçok faktör karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmada firmalardan alınan izinler doğrultusunda Malatya'daki bir işletmeye ait 30 adet kümes ziyaret edilmiş, kümes şartları ile ilgili veriler toplanarak muhtemel risk faktörleri açısından değerlendirmeye tabi tutulmuştur.

Ziyaret edilen kümeslerde; kümes şartlarının oldukça iyi düzeyde olduğu görülmüştür. İşletmenin verdiği bilgilere göre ani yem değişiklikleri söz konusu olmamıştır. Kümeslerde havalandırma koşulları güncel sistemlerin kullanılması ile sorun teşkil etmeyecek düzeydedir. Dolayısıyla kümes takipleri sırasında NE oluşumuna sebep olabilecek herhangi bir risk faktörü ile karşılaşılmamıştır. Antikoksidiyal olarak salinomisin kullanılmıştır. Nitekim kümes ziyaretlerinde karşılaşılan tablo ile kesimhaneden toplanan karaciğer ve bağırsak örneklerinden izole edilen *C. perfringens* oranları uyumluluk göstermektedir. Ayrıca bu çalışmada toplanan bütün ince bağırsak içerikleri tuzlu su ile flotasyon tekniği kullanılarak Eimeria ookistleri yönünden incelenmiş ve mikroskopik inceleme sonucunda hiçbir örnekte koksidiyoz etkenlerine rastlanmamıştır.

Dolayısıyla Malatya ve Elazığ'daki işletmelerin, kanatlılarda koksidiyoz ile mücadele konusunda başarılı olduğu sonucuna varılabilir. Koksidiyoz etkenlerine

rastlanılmaması sonucu *C. perfringens*'in NE oluşumunu da engelleyebildiğini söyleyebiliriz. Ancak bu çalışmada çok kısıtlı bir bölgedeki kümesler ziyaret edildiği için ve tek bir işletmeye ait kümesler incelendiğinden dolayı elimizdeki verilerin bölgedeki kümes şartları hakkında yorum yapabilmek için yeterli olmadığı düşünülmektedir.

Bu çalışmamızda üç farklı kesimhaneden toplanan 500 adet bağırsak içeriğinden %60.8' inde (304/500) ve 500 adet karaciğer örneğinden %71.2'sinde (356/500) uygulanan konvansiyonel kültür yöntemi neticesinde *C. perfringens* yönünden pozitiflik saptandı. Kesimhaneler arasındaki üreme oranları ele alındığında Elazığ B kesimhanesinde toplam 300 örnekten %73.3 oranında (220/300), Malatya A kesimhanesinde toplam 450 örnekten %69.3 oranında (312/450), Malatya C kesimhanesinde %51.2 oranında (128/250) *C.perfringens* yönünden pozitiflik saptandı (Tablo 8).

Kalender ve Ertaş (130), Elazığ ilinde yaptıkları bir çalışmada, 8 işletmeye ait 160 adet tavuğun bağırsak içeriğini incelemiş ve örneklerin 8'inden (%5) *C. perfringens* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Elde edilen izolatların multipleks PZR ile analiz edilmesi sonucu 8 örnekten 6'sının tip A olduğunu bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda da, 500 adet bağırsak örneğinden kültür yöntemiyle 304 adet *C. perfringens* izolatı elde edilmiş (%60.8), bağırsak içeriklerinden elde edilen 304 adet *C. perfringens* izolatları multipleks PZR analizi sonucunda 302 tanesi Tip A olarak tiplendirilmiştir. *C. perfringens* tip A insanlarda gıda kaynaklı infeksiyonlara neden olması sebebiyle, bu araştırma, tavukların *C. perfringens* tip A yönünden halk sağlığı yönünden potansiyel bir tehlike olarak önem taşıdığını göstermektedir.

Miwa ve ark. (131) yapmış oldukları bir çalışmada; tavuk, sığır ve domuz bağırsak içeriklerini incelemişlerdir. 50 tavuk bağırsak örneğinin 40'ından (% 80), 50 sığır örneğinin 38'inden (% 76), 50 domuz örneğinin 22'sinden (% 44), *C. perfringens* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bazı çalışmalarda tavuk bağırsak içeriklerinde *C. perfringens* insidensinin % 75- 95 oranlarında bulunduğu bildirilmiştir (131,132). Başka bir çalışmada ise; (133), 609 tavuk bağırsak örneğinin 112'sinden (%18.39) *C. perfringens* izole edilmiştir. Yapılan çalışmalarda *C. perfringens* izolasyon oranları değişkenlik göstermektedir. Bu bulgulardaki farklılık, örnekleme sayısı ve tekniği, uygulanan izolasyon ve identifikasyona dayalı metodolojik farklılıklardan ve kesimhaneler arasındaki teknolojik imkanların ve uygulamaların farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmamızda da, incelenen bağırsak örneklerinden *C. perfringens* izolasyon oranı karaciğer örneklerinden daha düşük çıkmıştır. Bu durum kesim sırasında hijyenik koşulların yetersiz olması, iç organların çıkarılması sırasında karkaslar ve karaciğer gibi yenilebilir organların dışkı ve bağırsak içeriği ile kontamine olabileme ihtimali ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca safra kesesinin de potansiyel bir kontaminasyon kaynağı olduğu düşünülürse, karaciğerde *C. perfringens*'in daha yüksek düzeyde izole edilmesini destekler niteliktedir. Yapılan bazı araştırmalarda safra kesesinden *C. perfringens* izolasyonu da gerçekleştirilmiştir (13, 94, 134)

Heikinheimo ve Korkeala (135), tavuk dışkılarından izole edilen 118 *C. perfringens*'in tamamının *cpa* geni içerdiğini ve hiçbirinin diğer toksin genlerine (*cpb*, *etx*, *iA*, *cpe*) sahip olmadığını ortaya koymuşlardır. *C. perfringens* tip A kanatlı hayvanlarda predominant olduğu değişik araştırmacılar tarafından

bildirilmiştir. Ayrıca gıda kaynaklı enfeksiyona sebep olmasından dolayı önemi de vurgulanmıştır (106, 136).

Bu çalışmamızda; Moleküler tiplendirme amacıyla yapılan multipleks PZR analizi neticesinde tüm izolatların *cpa* geni taşıdığı ve tip A olduğu ortaya konmuştur. İzolatların hiçbirinin *cpb*, *etx*, *iA*, *cpe* *cpb2* toksin genlerini taşımadığı belirlenmiş olup yapılan diğer araştırmalarla (130, 135) uyum sağladığı görülmektedir.

Svobondova ve ark. (133), tavuk bağırsak örnekleri üzerinde yaptıkları çalışmada *C. perfringens* izolatlarının multipleks PZR kullanılarak yapılan moleküler tiplendirilmesi sonucu tüm izolatların *cpa* geni içerdiği, izolatların hiçbirinin *cpe* genini içermediği ve 4'ünün ise *cpb2* geni taşıdığını tespit etmişlerdir.

Engström ve ark. (106), yaptıkları bir araştırmada tavuk bağırsaklarından elde edilen 53 *C. perfringens* izolatının, multipleks PZR kullanılarak yapılan moleküler tiplendirilmesi sonucunda tüm izolatların *cpa* geni ve izolatların ikisinin *cpb2* geni içerdiğini belirlemiştir (137). Sağlıklı broyler bağırsağı örneklerinden elde edilen 27 izolatın 4'ünde *cpb2* ve 2'sinde *cpe* geni tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışma ile multipleks PZR kullanılarak moleküler tiplendirilmesi yapılan izolatların hiçbirinde *cbp2* toksin geni tespit edilememiştir.

*C. perfringens* kesim sırasında iç organların çıkarılmasıyla kanatlı karkaslarının ve yenilebilir iç organlarının dışkı ve bağırsak içeriği ile kontamine olmasından dolayı, kanatlı etlerinde de *C. perfringens*'in varlığı incelenmiştir. Yapılan birçok çalışmada tavuk etinin farklı düzeylerde kontaminasyona maruz kaldığı ortaya konulmuştur. Bazı araştırmalarda *C. perfringens*'in %100 oranında

bazılarında ise %30 oranında tespit edildiği bildirilmektedir (132, 138). İnsanlarda *C. perfringens* tip A kaynaklı zehirlenme vaka ve salgınlarının *cpe* (+) *C. perfringens* tip A izolatları tarafından sentezlenen enterotoksin ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (139).

Engström ve ark. (106), 53 *C. perfringens* izolatının, multipleks PZR kullanılarak yapılan moleküler tiplendirilmesinde tüm izolatların *cpa* geni taşıdığını, izolatların 2'sinin  $\beta 2$  geni içerdiğini ve izolatların hiçbirinde *cpe* geni bulunmadığını bildirmişlerdir.

*C. perfringens* kaynaklı gıda infeksiyonları, *cpe* geni taşıyan Tip A ile kontamine gıdaların tüketilmesi sonucu oluşmaktadır. Ancak *C. perfringens*'lerde bu genin bulunma oranı % 0-5 arasında değişmektedir (140).

Güran ve Öksüztepe (141) yapmış oldukları bir çalışmada; tavuk parça etlerinden toplam 558 adet *C. perfringens* izolatı elde etmiş, 558 *C. perfringens* izolatından 545 tanesi (% 97.6) alfa toksin geni yönünden pozitif bulunup tip A olarak tiplendirmişlerdir. Sadece 1 tanesinde *cpe* toksin geni (% 0,5) tespit etmişlerdir.

Wen ve McClane (142)'in tavuk etlerinde yaptığı bir araştırmada 56 adet *C. perfringens* izolatı elde edilmiş ve bu izolatlara multipleks PCR ile toksin tiplendirmesi yapılmıştır. İzolatlardan sadece 1 (%1,7) tanesinde *cpe* geni bulunduğu, 29 tanesinin de *cpb2* (%51,7) geni taşıdığı, diğer toksin genlerinin hiçbir izolatta bulunmadığı bildirilmiştir.

*C. perfringens*'in salgıladığı majör toksinlerin dışında son yıllarda NetB toksin geni keşfedilmiştir (63). Uzun zamandan beri NE oluşmasında alfa toksin en önemli virulens faktör olarak bilinmektedir (3). Ancak bundan birkaç yıl önce

yapılan bazı çalışmalar neticesinde birçok araştırmacı alfa toksinin NE oluşumunda primer etken olması konusunda fikir ayrılığına düşmüşlerdir. NE'e karşı alfa toksin ile yapılan aşı çalışmalarında alfa toksinin kanatlıları kısmi olarak koruduğu rapor edilmiştir (37). Yine bazı çalışmalarda deneysel yollarla oluşturulmuş NE'e karşı diğer proteinlerin de immun sistemi uyarabildiği görülmüştür (143). Son yıllarda Keyburn ve ark. (38) yaptıkları bir çalışmada *C. perfringens* Tip A'nın alfa toksin yönünden negatif (-) mutantlarının deneysel modellerde NE oluşturabildiğini kanıtlamışlardır. Daha sonra broyler'lerde NE ile ilişkili olduğu tahmin edilen ve tespit edilen bu yeni toksin geni NetB olarak adlandırılmıştır (3, 38).

Chalmers ve Keyburn (68) yaptıkları bir araştırmada; sağlıklı ve hasta kanatlı hayvanlar arasında NetB toksin geni prevalansı incelendiğinde, sağlıklı hayvanlar arasındaki oran %0 ile %61 arasında iken hasta hayvanlarda %52 ile %95 olduğunu bildirmişlerdir.

Bu alışmamızda da bağırsak ve karaciğer örneklerinden izole edilen *C. perfringens* izolatlarında, Keyburn ve ark.'nın (68) önerdiği primer çifti ile klasik PZR tekniği uygulanmış ancak hiçbir izolatta NetB toksin geni tespit edilmemiştir. Ülkemizde kanatlı hayvanlarda NetB toksin geni ile ilgili şimdiye kadar herhangi bir çalışma yapılmamış olup bu çalışma ilk olma niteliğini taşımaktadır.

Günümüzde bu NetB toksin geni ile ilgili literatürlerde bilgiler oldukça kısıtlıdır. Beta toksin ile benzer moleküler ağırlığa sahip olduğu için beta benzeri nekrotik enterit toksini (NetB) olarak adlandırılmıştır. Bu gen sadece kanatlılarda bulunmuş olup, beta toksin ile %38 aminoasit benzerliği olduğu bildirilmifir (59).

Keyburn ve ark. (63) yaptıkları diğerk bir çalışmada NE ile infekte edilmiş tavuklardan elde edilen izolatlarda NetB toksin genini bulmalarına rağmen infekte olmamiş hayvanlardan NetB toksin genini bulamamişlardır. İlginç bir Şekilde Cooper ve Songer (37) ise deneysel modellerinde NetB toksin geni yönünden negatif izolatlarla hastalığı oluşturabilmişlerdir. Yine yapılan bazı çalışmalarda NetB toksinin nekrotik enterit patogenezisinde kritik virulens faktör olduğu ortaya konulmasına rağmen (3) NetB toksin geninin nekrotik enterit ile ilişkili olmadığı ileri sürülen çalışmalar da mevcuttur. (68, 69, 144).

*C. perfringens* izolatlarında NetB nin varlığı ülkelere göre farklı profiller ile karşımıza çıkmaktadır. Örneğin; Kanada da yapılan bir çalışmada nekrotik enteritli broyler'lerde, *C. perfringens* izolatlarında %95 NetB pozitif bulunurken, sağlıklı broyler'lerde elde edilen izolatlarda %35 pozitif NetB bulunmuştur. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki oran ise nekrotik enteritli broylerlerde %58, sağlıklı broylerlerde ise %8.75 olarak bulunmuştur (3). Sağlıklı ve hasta kanatlı hayvanlardaki rolü henüz tam olarak ortaya konulamamiş bu toksin gen ile ilgili daha fazla çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Birçok infeksiyonda, benzer klinik bulgular görülmesine rağmen patojeniteleri farklı alt tipler gözlenmektedir. Bu yüzden hastalıklardan izole edilen mikroorganizmaların tiplendirilmesi hastalığın sağaltımına, koruyucu önlemlerin alınmasına ve eradikasyon programlarının hazırlanmasına yardımcı olmaktadır.

Moleküler tiplendirme yöntemlerinden biri olan PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) günümüzde altın standart teknik olarak kabul edilmektedir. Ayırım gücü yüksek, tekrarlanabilirliği olan, güvenilir bir metot olarak kabul

edilmiştir. Bu çalışmada 100 farklı kümeden bağırsak ve karaciğer örnekleri toplanmıştır. Çalışma kapsamında 100 farklı kümesden örnekler alınmış olup, kümesler arasındaki, *C. perfringens* izolatlarının genotiplendirmesi yapılarak aralarındaki klonal ilişkiyi saptamak amaçlandı.

Dolayısıyla bu amaçla farklı kümes ve kesimhanelerden elde edilen 61 saf *C.perfringens* izolatına PFGE yöntemi uygulandı. Uygulama sonucunda PFGE analizleri sonucunda oluşan bant profillerinin suşlar arasındaki genetik ilişkilere göre kategorilere ayrılarak yorumlanması için Gel Compare II yazılım sistemi (version3.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edildi. PFGE profillerinin, dendogramı oluşturularak kümeleşme analizi yapıldı. Bantlara bağlı "Dice" benzerlik katsayısına göre farklı kümeslerden elde edilen suşlar arasındaki ilişkiler belirlendi. Benzerlik katsayısı hesaplamasında bant ve profil toleransı %1.3 olarak alındı.

Yapılan dendogram analizi sonucunda "Dice" benzerlik katsayısı %100 olarak belirlendi. Toplam 30 genotip bulundu. Bu 30 genotipi içinde bulunduran toplam 17 cluster (küme) saptandı. Küme I; 9 elmanı ile en büyük küme, onu 7 elemanlı küme 7 takip etmektedir. Küme I'in tamamı Elazığ B kesimhanesinden elde edilmiş izolatlar ( Kümes no:15, 19, 40, 7, 2, 5, 11, 16, 44) (Şekil 11) olup, 9 farklı kümesi içine almıştır. Bunlar kendi içerisinde heterojen kümes dağılımına sahip olduğu görülmektedir. Bu durum *C. perfringens*'in kümesler arası yayılımının olmadığı, üreticiden kaynaklanan bulaş yolunun olmadığını, kesim sırasında *C. perfringens*'in kontaminasyona maruz kaldığını göstermektedir. Yine Küme 7 nin tüm elemanları Malatya A kesimhanesinden elde edilmiş izolatlar (kümes no: 78, 85, 25, 30, 42, 12) (Şekil 11), heterojen küme dağılımı

vermektedir. Bunun yanında 2 elemanlı küme 12'nin elemanlarından biri Elazığ'a ait, diğeri Malatya kümeslerinden birine ait olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak, aynı işletmenin, aynı üreticinin sahip olduğu kümeslere ait izolatlar birbiri ile yakın ilişkili kabul edildi. *C. perfringens* izolatları arasında Elazığ ve Malatya illerinde bulunan 3 farklı kesimhaneye gelen kümesler arasında salgınlara neden olabilecek bir genotip bulunamadı.

B.Naubery ve ark. (145) yaptıkları bir çalışmada, 25 farklı üreticiden topladığı sağlıklı tavukların bağırsak örneklerinden elde ettiği 48 izolattan birbiriyle yakın ilişkili 25 farklı PFGE kümeleri tespit etmiştir.

Gholamiandekhordi ve ark. (137) yaptıkları bir çalışmada  $\beta_2$  toksin yönünden pozitif izolatların PFGE profillerini incelemiş ve 35 PFGE profilinin 5 tanesini  $\beta_2$  toksin ürettiğini tespit etmiştir. Bizim çalışmamız da elde edilen *C. perfringens* izolatları alfa toksin geni yönünden pozitif diğer bütün toksinler yönünden negatif bulunduğu için, ürettikleri toksin çeşidine göre PFGE analizi yapılamadı.

Engström ve ark. (106) ise sağlıklı tavuklarda PFGE analizi yaptığı bir çalışmada tek bir küme içerisinde birden çok farklı PFGE klonları bulurken, NE'li hasta hayvanlardan elde ettiği *C. perfringens* izolatlarında sadece bir veya iki adet farklı PFGE klonu saptamışlardır.

## 7. SONUÇ ve ÖNERİLER

Antibiyotiklerin 2006 yılından itibaren Avrupa birliği ve Ülkemizde kanatlı yemlerinde büyütme faktörü olarak kullanımı yasaklanmıştır. Bununla birlikte; Dünya genelinde özellikle Avrupa’da yapılan çalışmalarda NE vakalarının hızla artışı kanatlı sektörünü ciddi anlamda endişelendirmiştir ve bu durum kanatlı hayvanlarda bağırsak kanalında *C. perfringens* gelişimini baskılamak amacıyla terapötik amaçlı antibiyotik kullanımının artmasına sebep olmuştur. Ülkemizde ise kanatlı hayvanlardaki bu konu üzerinde yapılan çalışma sayısı sınırlıdır. Kanatlı sektörü günümüzde bu sorunu antikoksidiyallerin kullanılması ile aşmış gibi görünse de ileriki yıllarda kanatlı ve insan sağlığını etkilemesi muhtemeldir.

*C. perfringens* doğada, toprakta, insan ve hayvanların bağırsak florasında bulunan bir mikroorganizma olmasından dolayı, kanatlı kesimhanelerinde kesim sırasında karkasa ve yenilebilir iç organlara bulaşması sonucu halk sağlığını da ciddi anlamda etkileyen potansiyel risk faktörü konumundadır. Bu özelliklerinden dolayı *C. perfringens*’in hem hayvanlarda hem de gıdalarda tiplendirilmesinin bulaş kaynaklarının elimine edilmesi adına olumlu sonuçlar doğurması beklenmektedir. Nitekim Türkiye’de son yıllarda gıdalardaki *C. perfringens*’in varlığına dair birçok çalışma yapılmışken kanatlı hayvanlardaki dağılım ve yaygınlığı hakkında yeterince çalışma yapılmamış olması bu konuda bizleri çalışmaya yapmaya yönlendirmiştir. Bu nedenle mevcut çalışmanın bölgedeki *C. perfringens* yaygınlığı ve *C. perfringens* alt tiplerinin belirlenmesi noktasında güncel veriler sunması bakımından faydalı olduğuna inanılmaktadır. Nitekim kanatlı hayvanların bağırsak ve karaciğer örneklerinden elde edilen izolatlara

PFGE yöntemiyle genotiplendirme yapılması, izolatlar arasındaki genetik ilişkinin saptanması ile literatürdeki boşluklar doldurulmaya çalışılmıştır.

Öncelikle bütün bu çalışmalar dikkate alındığında, sağlıklı kanatlı hayvanlarda *C.perfringens*'in PFGE yöntemiyle genotiplendirilmesi Türkiye'de yapılmış ilk çalışma olması açısından önem arz etmektedir. Ancak bu çalışmayı destekleyici verilerin olması açısından farklı bölgelerdeki PFGE genotiplerinin oluşturulması ile ve daha geniş saha çalışmaları yaparak *C. perfringens*'in bulaş kaynakları hakkında daha fazla bilgi edinilebilir. Farklı bölgelerdeki kümeslerin karşılaştırılması yapılarak daha sağlıklı sonuçlar elde edilebilir. *C. perfringens* yapılan çalışmalarda da görüldüğü gibi kanatlılarda PFGE genotipleri yönünden çok fazla çeşitliliğe sahiptir. Bu çalışma ve Türkiye'de tavuk etleri üzerine yapılan çalışmalarda göstermiştir ki *C. perfringens* Tip A halk sağlığı açısından potansiyel risk teşkil etmektedir. Bu göz önüne alınarak bu çalışmayı destekleyici olarak, ileride yapılacak çalışmalar arasında, hem gıdalardaki hem de insanlardaki *C. perfringens* izolatlarının da bulaş kaynaklarının belirlenmesi açısından PFGE profillerinin ortaya konulması gerekmektedir.

## 8. KAYNAKLAR

1. Songer JG. Clostridia as agents of zoonotic disease. *Vet Microbiol* 2010; 140 (3): 399-404.
2. Allaart JG, Van Asten AJ, Gröne A. Predisposing factors and prevention of *Clostridium perfringens*-associated enteritis. *Comp Immunol Microb* 2013; 36 (5): 449-464.
3. Timbermont L, Lanckriet A, Dewulf J, et al. Control of *Clostridium perfringens* induced necrotic enteritis in broilers by target released butyric acid, fatty acids and essential oils. *Avian Pathol* 2010; 39: 117-121.
4. Songer JG. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9(2): 216.
5. Parish, WE. Necrotic enteritis in the fowl (*Gallus gallus domesticus*). I. Histopathology of the disease and isolation of a strain of *Clostridium welchii*. *J Comp Pathol* 1961; 71: 377-93.
6. Helmboldt CF, Bryant ES. The pathology of necrotic enteritis in domestic fowl. *Avian Dis* 1971; 775-780.
7. Casewell M, Friis C, Marco E, McMullin P, Phillips I. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *J Antimicrob Chemoth* 2003; 52(2): 159-161.
8. Nairn ME, Bamford VW. Necrotic enteritis of broiler chickens in Western Australia. *Aust Vet J* 1967; 43 (2): 49-54.
9. Wages DP, Opengart K. Necrotic enteritis. In: Saif YM. (Editors). *Diseases of Poultry*. Iowa State Press, Ames, Iowa. 2003: 781-785.
10. Van der Sluis W. Clostridial enteritis-a syndrome emerging world wide. *World Poultry* 2000; 16 (5): 56-57.
11. Opengart K, Songer JG. Necrotic enteritis. *Diseases of Poultry* 2008; 12: 872-879.
12. Labbe RG, Harmon SM. *Clostridium perfringens*. In: Vanderzant C, Splittstoesser DF. (Editors). *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Association 1992: 623-632.
13. Hafez HM. Enteric diseases of poultry with special attention to *Clostridium perfringens*. *Pak Vet J* 2011; 31(3): 175-184.
14. Yoo HS, Lee SU, Park KY, et al. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 1997; 35 (1): 228-232.
15. Brendan BL, Grover M, Hutchins MD, William H. Welch, MD, and the Discovery of *Bacillus welchii*. *Arch Pathol Lab Med*. 2004; 128: 1193-1195.
16. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley, et al. Genus *Clostridium*. In: *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. The Williams-Wilkins Co. Baltimore 1994; 15: 560-563.

17. Gross TP, Kamara LB, Hatheway CL, et al. *Clostridium perfringens* food poisoning: use of serotyping in an outbreak setting. J Clin Microbiol 1989; 27 (4): 660-663.
18. Williamson ED, Titball RW. A genetically engineered vaccine against the alpha-toxin of *Clostridium perfringens* protects mice against experimental gas gangrene. Vaccine 1993; 11(12): 1253-1258.
19. Brynestad S, Granum PE. *Clostridium perfringens* and foodborne infections. Int J Food Microbiol 2002; 74 (3): 195-202.
20. Gibbs P, Blackburn CD, McClure PJ. Characteristics of spore-forming bacteria. Foodborne Pathogens: Hazards, Risk Analysis and Control, 417-435.
21. Cato EP, George WL, Finegold SM. Genus *Clostridium*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1986; 2: 1141-1200.
22. Akan M. *Clostridium* infeksiyonları. Aydın N, Paracıkoğlu J.(Editörler) Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). Bölüm 9. İlke Emek Yayınları: Ankara 2006: 73-87.
23. McClane BA. *Clostridium perfringens*. In: Doyle MP, Beuchat LR. (Editors). Food Microbiology Fundamentals and Frontiers, 3rd Edition, Washington DC: ASM Press 2007: 423-455.
24. Byrne B, Scannell AG, Lyng J. et al. An evaluation of *Clostridium perfringens* media. Food Control 2008; 19 (11): 1091-1095
25. Labbe RG, Harmon SM. *Clostridium perfringens*. In: Vanderzant C, Splittstoesser DF.(Editors). Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association 1992: 623-632.
26. Cano RJ, Tiefenbrunner F, Ubaldi M, et al. Sequence analysis of bacterial DNA in the colon and stomach of the Tyrolean Iceman. Am J Phys Anthropol 2000; 112 (3): 297.
27. Canard B, Cole ST. Genome organization of the anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. P Natl Acad Sci 1989; 86 (17): 6676-6680.
28. Shimizu T, Ohshima S, Ohtani K, et al. Genomic map of *Clostridium perfringens* strain 13. Microbiol and immunol 2001; 45 (2): 179-189.
29. Myers GS, Rasko DA, Cheung JK, et al. Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *Clostridium perfringens*. Genome Res 2006; 16 (8): 1031-1040.
30. Lyras D, Rood JI. *Clostridial genetics* in Gram-Positive Pathogens. Fischetti VA, Novic, RP, Ferretti JJ. Portnoy DA, Rood JI. (Editors). American Society for Microbiology, Washington DC: 2000; 529.
31. Güran ŞH. Tavuk parça etlerinde *Clostridium perfringens*'in multipleks PCR metodu ile toksin tiplendirilmesi ve farklı dondurma sıcaklıklarının *Clostridium perfringens* yaşamı üzerine etkisi. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2012.
32. Rood JI. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. Annu Rev Microbiol 1998; 52: 333-360.

33. Timbermont L, Lanckriet A, Gholamiandehkordi AR, et al. Origin of *Clostridium perfringens* isolates determines the ability to induce necrotic enteritis in broilers. *Comp Immunol Microb* 2009; 32 (6): 503-512.
34. Rood JI, Cole ST. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Rev* 1991; 55: 621–648.
35. Parreira VR. Sequence of two plasmids from *Clostridium perfringens* chicken necrotic enteritis isolates and comparison with *C. perfringens* conjugative plasmids. *PLoS One* 2012; 7 (11): e4975.
36. Jihong LI, Uzal FA, McClane BA, et al. Toxin plasmids of *Clostridium perfringens*. *Microbiol Mol Biol R* 2013; 77 (2): 208-233.
37. Cooper KK, Songer JG. Necrotic enteritis in chickens: a paradigm of enteric infection by *Clostridium perfringens* type A. *Anaerobe* 2009; 15 (1): 55-60.
38. Keyburn AL, Sheedy SA, Ford ME, Williamson, et al. Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. *Inf and immun* 2006; 74 (11): 6496-6500.
39. Shojadoost B, Vince AR, Prescott JF. The successful experimental induction of necrotic enteritis in chickens by *Clostridium perfringens*: a critical review. *Vet res* 2012; 43 (1): 1-12.
40. Petit L, Gibert M, Popoff MR. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol* 1999; 7: 104-110.
41. Naylor CE, Eaton JT, Howells A, et al. Structure of the key toxin in gas gangrene. *Nat Struct Biol* 1998; 5: 738 – 746.
42. Titball RV, Naylor CE, Basak AK . The *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Anaerobe* 1999; 5: 51-64.
43. Flores-Diaz M Alape-Giron A. Role of *Clostridium perfringens* phospholipase C in the pathogenesis of gas gangrene. *Toxicon* 2003; 42: 979-986.
44. Sato H, Yamakawa Y, Ito A, et al. Effect of zinc and calcium-ions on production of alpha-toxin and proteases by *Clostridium-Perfringens*. *Infect Immun* 1978; 20: 325-333.
45. Bullifent HL, Moir A, Awad MM, et al. The Level of Expression of  $\alpha$ -toxin by different strains of *Clostridium perfringens* is dependent on differences in promoter structure and genetic background. *Anaerobe* 1996; 2: 365-371.
46. Uzal FA, McClane, BA. Recent progress in understanding the pathogenesis of *Clostridium perfringens* type C infections. *Vet Microbiol* 2011; 153 (1-2): 37-43.
47. Hughes M.L, Poon R, Adams V, et al. Epsilon-toxin plasmids of *Clostridium perfringens* type D are conjugative. *J Bacteriol* 2007; 189 (21): 7531-7538.
48. Emborg H, Ersboll AK, Heuer OE, et al. The effect of discontinuing the use of antimicrobial growth promoters on the productivity in the Danish broiler production. *Prev Vet Med* 2001; 50: 53-70.

49. Rood JI. The Clostridia: molecular biology and pathogenesis. Academic Press, San Diego, Calif, 1997.
50. Key Zukaite V, Bizulevičius GA. Physico-chemical and catalytic properties of *Clostridium perfringens* hyaluronidase: an update. *Anaerobe* 2000; 6: 347–355.
51. 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.
52. Lindström M, Heikinheimo A, Lahti P, et al. Novel insights into the epidemiology of *C. perfringens* type A food poisoning. *Food Microbiol* 2011; 28 (2): 192–198.
53. 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
54. Popoff MR. Clostridial pore-forming toxins: powerful virulence factors. *Anaerobe* 2014; 30: 220–238
55. Revitt M, Sarah A. Rood JI, Adams V. *Clostridium perfringens* extracellular toxins and enzymes: 20 and counting. *Microbiol Aust* 2015; 36 (3): 114–117.
56. Uzal FA. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. *Future Microbiol* 2014; 9: 361–377.
57. Uzal FA. *Clostridium perfringens* toxins involved in mammalian veterinary diseases. *Open Toxin J* 2010; 2: 24–42.
58. Bannam TL, Keyburn AL, Moore, RJ. Necrotic enteritis-derived *Clostridium perfringens* strain with three closely related independently conjugative toxin and antibiotic resistance plasmids. *M Bio* 2011; 2 (5): e00190-11.
59. Katayama S, Dupuy B, Cole ST, et al. Genome mapping of *Clostridium perfringens* strains with I-CeuI shows many virulence genes to be plasmid-borne. *Mol Gen Genet* 1996; 251 (6): 720-726.
60. Sakurai J. *Clostridium perfringens* alpha-toxin: characterization and mode of action. *J Biochem* 2004; 136: 569–574.
61. Zukaite V, Bizulevičius GA. Physico-chemical and catalytic properties of *Clostridium perfringens* hyaluronidase: an update. *Anaerobe* 2000; 6: 347–355.
62. Chiarezza M. The NanI and NanJ sialidases of *Clostridium perfringens* are not essential for virulence. *Infect Immun* 2009; 77: 4221–4428.
63. Keyburn AL, Boyce JD, Vaz PB et al. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS pathog* 2008; 4 (2): 26.
64. Keyburn AL, Yan, XX, Bannam, TL, et al. Association between avian necrotic enteritis and *Clostridium perfringens* strains expressing NetB toxin. *Vet Res* 2010; 41 (2): 1-8.
65. Yonogi S. BEC, a novel enterotoxin of *Clostridium perfringens* found in human clinical isolates from acute gastroenteritis outbreaks. *Infect Immun* 2014; 82: 2390–2399.

66. Chen, J, McClane, BA. Characterization of *Clostridium perfringens* TpeL toxin gene carriage, production, cytotoxic contributions, and trypsin sensitivity. *Infect Immun* 2015; 83 (6): 2369-2381.
67. Rood JI, Keyburn AL, Moore RJ. NetB and necrotic enteritis: the hole movable story. *Avian Pathol* 2016; 45 (3): 295-301.
68. Chalmers G, Bruce HL, Hunter DB, et al. Multilocus sequence typing analysis of *Clostridium perfringens* isolates from necrotic enteritis outbreaks in broiler chicken populations. *J Clin Microbiol* 2008; 46 (12): 3957-3964.
69. Chalmers G, Martin SW, Prescott JF, et al. Genetic diversity of *Clostridium perfringens* isolated from healthy broiler chickens at a commercial farm. *Vet microbiol* 2008; 127 (1): 116-127.
70. Lovland, A, Kaldhusdal M. Severely impaired production performance in broiler flocks with high incidence of *Clostridium perfringens* associated hepatitis. *Avian Pathol* 2001; 30: 73-81.
71. Johansson KR, Sarles WB. Bacterial Population Changes in the Ceca of Young Chickens Infected with *Eimeria tenella*. *J Bacteriol* 1948; 56: 635-647.
72. Wijewanta EA, Senevirtna P. Bacteriological studies of fatal *Clostridium perfringens* type-A infection in chickens. *Avian Dis* 1971; 15: 654-661.
73. Al-Sheikhly F, Truscott RB. The pathology of necrotic enteritis of chickens following infusion of broth cultures of *Clostridium perfringens* into the duodenum. *Avian Dis* 1977; 21: 230-240.
74. Cowen BS, Schwartz LD, Wilson RA, et al. Experimentally induced necrotic enteritis in chickens. *Avian Dis* 1987; 31: 904-906.
75. Long JR. Necrotic enteritis in broiler chickens. I. A review of the literature and the prevalence of the disease in Ontario. *Can J Comp Med* 1973; 37: 302-308.
76. Ficken MD, Wages D. Necrotic enteritis. In: Saif YM, Calnek BW, Barnes HJ, McDonald LR. (Editors). *Diseases of Poultry*, 10th ed. Iowa State University Press, London. 1997; 261-264
77. Heier BT, Lovland A, Kaldhusdal M, et. Al. A field study of naturally occurring specific antibodies against *Clostridium perfringens* alpha toxin in Norwegian broiler flocks. *Avian Dis* 2001; 45: 724-732.
78. Johansson A, Greko C, Engstrom BE, et.al. Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of *Clostridium perfringens* from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes. *Vet Microbiol* 2004; 99: 251-257.
79. Long JR, Pettit JR, Barnum DA. Necrotic enteritis in broiler chickens. II. Pathology and proposed pathogenesis. *Can J Comp Med* 1974; 38: 467-474.
80. Gardiner MR. Clostridial infections in poultry in Western Australia. *Aust Vet J* 1967; 43: 359-360.

81. Kaldhusdal M, Skjerve E. Association between cereal contents in the diet and incidence of necrotic enteritis in broiler chickens in Norway. *Prev Vet Med* 1996; 28: 1-16.
82. Jones FT, Ricke SC. Observations on the history of the development of antimicrobials and their use in poultry feeds. *Poult Sci* 2003; 82: 613-617.
83. Emborg H, Ersboll AK, Heuer OE, et al. The effect of discontinuing the use of antimicrobial growth promoters on the productivity in the Danish broiler production. *Prev Vet Med* 2001; 50: 53-70.
84. Garrido MN, Skjervheim M, Oppegaard H, et al. Acidified litter benefits the intestinal flora balance of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 5208-5213.
85. Hampson DJ, Murdoch AI. Growth enhancement in broiler chickens receiving chemeqtm polymeric antimicrobial. *Avian Pathol* 2003; 32: 605-611.
86. Fallon R, O'Sullivan N, Maher M, et al. Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from broiler chickens isolated at an Irish poultry processing plant. *Lett Appl Microbiol* 2003; 36: 277-281.
87. Van den Bogaard, Willems AE, London R, et al. "Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J Antimicrob Chemoth* 2002; 49(3): 497-505
88. Takeda T, Fukata T, Miyamoto T, et al. The effects of dietary lactose and rye on cecal colonization of *Clostridium perfringens* in chicks. *Avian Dis* 1995; 39: 375-381
89. Emborg HD, Andersen JS, Seyfarth AM, et al. Relations between the occurrence of resistance to antimicrobial growth promoters among *Enterococcus faecium* isolated from broilers and broiler meat. *Int J Food Microbiol* 2003;84: 273-284.
90. Emborg HD, Andersen JS, Wegener HC. Relations between the consumption of antimicrobial growth promoters and the occurrence of resistance among *Enterococcus faecium* isolated from broilers. *Epidemiol Infect* 2004; 132: 95-105.
91. Grave K, Kaldhusdal M, Kruse H, et al. What has happened in Norway after the ban of avoparcin? Consumption of antimicrobials by poultry. *Prevent Vet Med* 2004; 62 (1): 59-72.
92. Manson JM, Keis S, Smith JM, et al. A clonal lineage of VanA-type *Enterococcus faecalis* predominates in vancomycin-resistant Enterococci isolated in New Zealand. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 204-210.
93. Casewell M, Friis C, Marco E, et al. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 159-161.
94. Immerseel F, Buck V, Pasmans JD et al. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian Pathol* 2004; 33 (6): 537-549.
95. Collier CT, Van der Klis JD, Deplancke B, et al. Effects of tylosin on bacterial mucolysis, *Clostridium perfringens* colonization, and intestinal barrier function in a chick model of necrotic enteritis. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3311-3317.

96. Wise MG, Siragusa GR. Quantitative detection of *Clostridium perfringens* in the broiler fowl gastrointestinal tract by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 3911-3916.
97. Drew MD, Syed NA, Goldade BG, et al. Effects of dietary protein source and level on intestinal populations of *Clostridium perfringens* in broiler chickens. *Poult Sci* 2004; 83 (3): 414-420.
98. Engberg RM, Hedemann MS, Leser TD, et al. Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers. *Poult Sci* 2000; 79: 1311-1319.
99. Brennan JG, Moore SE, Poe A. et al. Efficacy of in-feed tylosin phosphate for the treatment of necrotic enteritis in broiler chickens. *Poult Sci* 2001; 80: 1451-1454.
100. Brennan J, Skinner J, Barnum DA, et al. The efficacy of bacitracin methylene disalicylate when fed in combination with narasin in the management of necrotic enteritis in broiler chickens. *Poult Sci* 2003; 82: 360-363.
101. Droual R, Shivaprasad HL, Chin RP. Coccidiosis and necrotic enteritis in turkeys. *Avian Dis* 1994; 38: 177-183.
102. Craven SE, Stern NJ, Cox NA, et al. Cecal carriage of *Clostridium perfringens* in broiler chickens given mucosal starter culture. *Avian dis* 1999; 43: 484-490.
103. Bernier G, Phaneuf JB, Filion R. Necrotic enteritis in broilers. I. Clinico-pathological aspect. *Can J Comp Med* 1974; 38: 280-285.
104. Porter RE. Bacterial enteritides of poultry. *Poult Sci* 1998; 77: 1159-1165.
105. Eleazer TH, Harrell JS, *Clostridium perfringens* infection in turkey poults. *Avian Dis* 1976; 20: 774-776.
106. Engström BE, Fermer C, Lindberg A, et al. Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. *Vet Microbiol* 2003; 94 (3): 225-235.
107. Williams RB. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. *Avian Pathol* 2005; 34 (3): 159-180.
108. Williams RB, Marshall RN, La Ragione RM, et al. A new method for the experimental production of necrotic enteritis and its use for studies on the relationships between necrotic enteritis, coccidiosis and anticoccidial vaccination of chickens. *Parasitol Res* 2003; 90: 19-26.
109. Uni Z, Argov N. Lipid yolk utilization of late term broiler embryos. *Poultry Sci* 2006; 85: 35.
110. Riddell C, Kong XM. The influence of diet on necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian dis* 1992; 36: 499-503.
111. Kaldhusdal M, Hofsagen M. Barley inclusion and avoparcin supplementation in broiler diets. 2. Clinical, pathological, and bacteriological findings in a mild form of necrotic enteritis. *Poultry Sci* 1992; 71 (7): 1145-1153.

112. Pedersen K, Bjerrum L, Eske Heuer O. Reproducible infection model for *Clostridium perfringens* in broiler chickens. *Avian dis* 2008; 52 (1): 34-39.
113. Collier CT, Hofacre CL, Payne AM. Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting *Clostridium perfringens* growth. *Vet immun immunopathol* 2008; 122 (1): 104-115.
114. Williams RB. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. *Avian Pathol* 2005; 34 (3): 159-180.
115. McDevitt RM, Brooker JD, Acamovic T, et al. Necrotic enteritis; a continuing challenge for the poultry industry. *World Poultry Sci J* 2006; 62 (02): 221-247.
116. Hermans PG, Morgan KL. Prevalence and associated risk factors of necrotic enteritis on broiler farms in the United Kingdom; a cross-sectional survey. *Avian Pathol* 2007; 36 (1): 43-51.
117. Dhillon AS, Roy P, Lauerman L, et al. High mortality in egg layers as a result of necrotic enteritis. *Avian Dis* 2004; 48(3): 675-680.
118. McReynolds JL, Byrd JA, Anderson RC, et al. Evaluation of immunosuppressants and dietary mechanisms in an experimental disease model for necrotic enteritis. *Poultry sci* 2004; 83 (12): 1948-1952.
119. Bywater R, McConville M, Phillips I, et al. The susceptibility to growth-promoting antibiotics of *Enterococcus faecium* isolates from pigs and chickens in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56 (3): 538-543.
120. Wierup M. The Swedish experience of the 1986 year ban of antimicrobial growth promoters, with special reference to animal health, disease prevention, productivity, and usage of antimicrobials. *Microbial Drug Resist* 2001; 7 (2): 183-190.
121. Tuncer HI. Karma yemlerde kullanımı yasaklanan hormon, antibiyotik, antikoksidiyal ve ilaçlar. *Lalahan Hay. Arast. Enst. Derg* 2007; 47 (1): 29- 37.
122. Hofacre CL, Beacorn T, Collett S, et al. Using competitive exclusion, mannan-oligosaccharide and other intestinal products to control necrotic enteritis. *J Appl Poultry Res* 2003; 12 (1): 60-64.
123. Fukata T, Hadate Y, Baba E, et al. Influence of bacteria on *Clostridium perfringens* infections in young chickens. *Avian dis* 1991; 224-227.
124. Jackson ME, Anderson DM, Hsiao HY, et al. Beneficial effect of  $\beta$ -mannanase feed enzyme on performance of chicks challenged with *Eimeria* sp. and *Clostridium perfringens*. *Avian dis* 2003; 47 (3): 759-763.
125. Mitsch P, Zitterl-Eglseer K, Köhler B, et al. The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens. *Poultry Sci* 2004; 83 (4): 669-675.

126. Lanckriet A, Timbermont L, De Gussem M, et al. The effect of commonly used anticoccidials and antibiotics in a subclinical necrotic enteritis model. *Avian Pathol* 2010; 39 (1): 63-68.
127. Knarreborg A, Simon MA, Engberg RM, et al. Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 5918-5924.
128. Lukinmaa S, Takkunen E, Siitonen A. Molecular epidemiology of *Clostridium perfringens* related to food-borne outbreaks of disease in Finland from 1984 to 1999. *Appl Environ Microbiol* 1999; 68 (8): 3744-3749.
129. Maslanka SE, Kerr JG, Williams G, et al. Molecular subtyping of *Clostridium perfringens* by pulsed-field gel electrophoresis to facilitate food-borne-disease outbreak investigations. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (7): 2209-2214.
130. Kalender H, Ertaş, HB. Isolation of *Clostridium perfringens* from chickens and detection of the alpha toxin gene by polymerase chain reaction (PCR). *Turk J Vet Anim Sci* 2005; 29 (3): 847-851.
131. Miwa F, Fishina T, Kubo S, et al. Most probable numbers of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in intestinal contents of domestic livestock detected by nested PCR. *J Vet Med Sci* 1997; 59 (7): 557-560.
132. Craven SE, Cox NA, Stern NJ, et al. Prevalence of *Clostridium perfringens* in commercial broiler hatcheries. *Avian Dis* 2001; 45: 1050-1053.
133. Svobodova I, Steinhäuserová I, Nebola M. Incidence of *Clostridium perfringens* in broiler chickens in the Czech Republic. *Acta Vet Brno* 2007; 76 (8): 25-30
134. Onderka DK, Langevin CC, Hanson JA. Fibrosing cholangiohepatitis in broiler chickens induced by bile duct ligations or inoculation of *Clostridium perfringens*. *Can J Vet Res* 1990; 54 (2): 285.
135. Heikinheimo A, Korkeala, H. Multiplex PCR assay for toxinotyping *Clostridium perfringens* isolates obtained from Finnish broiler chickens. *Lett Appl Microbiol* 2005; 40 (6): 407-411.
136. Meer RR, Songer JG. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *Am J Vet Res* 1997; 58 (7): 702-705.
137. Gholamiandekhordi AR, Ducatelle R, Heyndrickx M, et al. Molecular and phenotypical characterization of *Clostridium perfringens* isolates from poultry flocks with different disease status. *Vet Microbiol* 2006; 113 (1): 143-152.
138. Nowell VJ, Poppe C, Parreira VR, et al. *Clostridium perfringens* in retail chicken. *Anaerobe* 2010; 16 (3): 314-315.
139. Redondo-Solano MA. Effect of sodium nitrite, sodium erythorbate and organic acid salts on germination and outgrowth of *Clostridium perfringens* spores in ham during abusive cooling. Phd Thesis, 2011.

140. Erol I, Goncuoglu M, Ayaz ND, et al. Molecular typing of *C. perfringens* isolated from turkey meat by multiplex PCR. *Lett Appl Microbiol* 2008; 47: 31–34.
141. Guran HS, Oksuztepe G. Detection and typing of *Clostridium perfringens* from retail chicken meat parts. *Lett Appl Microbiol* 2013; 57 (1): 77-82.
142. Wen Q, McClane BA, Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolates in American retail foods. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70 (5): 2685-2691.
143. Kulkarni RR, Parreira VR, Sharif S, & Prescott JF. *Clostridium perfringens* antigens recognized by broiler chickens immune to necrotic enteritis. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 1358-1362.
144. Martin TG & Smyth JA. Prevalence of netB among some clinical isolates of *Clostridium perfringens* from animals in the United States. *Vet Microbiol* 2009; 136: 202-205.
145. Nauerby B, Pedersen K, Madsen M. Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among *Clostridium perfringens* isolates from chickens. *Vet Microbiol* 2003; 94(3): 257-266.
146. Garmory HS, Chanter N, French NP, et al. Occurrence of *C. perfringens*  $\beta$ 2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiol Infect* 2000; 124: 61–67.
147. Herholz C, Miserez R, Nicolet J, et al. Prevalence of  $\beta$ 2-toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (2): 358-361.

## 9. ÖZGEÇMİŞ

Arş. Gör. Burcu KARAGÜLLE

**Doğum Yeri ve Yılı:** Elazığ, 1985

**Medeni Durumu:** Evli

**Yazışma Adresi:** Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ / 4021.

**E-posta:** [burcukaragulle@gmail.com](mailto:burcukaragulle@gmail.com), [bkaragulle@firat.edu.tr](mailto:bkaragulle@firat.edu.tr)

### Eğitim Bilgileri

2011-2016: F.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Veteriner Mikrobiyoloji Doktora Programı-Elazığ

2004-2009: Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi-Elazığ

2000-2003: Malatya Anadolu Lisesi

1997-2003: Malatya Anadolu Lisesi/ Ortaokul bölümü

1996-1997: Kars/Sarıkamış Anadolu Lisesi Hazırlık Bölümü

1992-1996: 29 Eylül ilkokulu

Yabancı Dili: İngilizce

**DOKTORA / Doktora Tez Konusu** Broyler'lerden *Clostridium perfringens* İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu -2016

**Doktora Tez Danışmanı** **Prof. Dr. Adile Muz** / Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD

### Ulusal ve uluslararası dergilerde yayınlanan makaleler

1-Açık MN, Karahan M, Ongor H, **Karagülle B**, Çetinkaya B. Investigation of cytolethal distending toxin production and virulence genes in *Campylobacter* isolates from cattle. *Revue Méd. Vét.*, 2013, **164**, 5, 272-277

2- Açık MN, Karahan M, Ongor H, **Karagülle B**, Çetinkaya B. The First Isolation of *Campylobacter lanienae* from chickens. *Revue Méd. Vét.*, 2013, **164**, 7, 368-373.

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

1-Özbeç G, **Karagülle B**, Yerlikaya Z, Ertaş HB, Muz A. Tatlı su ve tuzlu su balıklarında *Campylobacter* ve *Listeria* Türlerinin Prevalansı. XI. Ulusal Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Antalya, 21-24 Ekim 2014.

2- **Karagülle B**, Muz A. Identification of *Clostridium perfringens* by Using Conventional Culture Method in Broilers in Eastern Turkey. 9<sup>th</sup> International Conference on the Molecular Biology and Pathogenesis of the Clostridia. Freiburg/ Germany. 7-11 September 2015.

**Proje deneyimi**

1- **Karagülle B**, Muz A. Broiler'lerden *Clostridium perfringens* İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. **Tübitak 214O164** No'lu Proje. **Bursiyer**. Doktora Tez Araştırma projesi.

**Uluslararası Akademik Etkinlikleri**

1- 9<sup>th</sup> International Conference on the Molecular Biology and Pathogenesis of the Clostridia. Freiburg/ Germany. 7-11 September 2015. **Katılımcı**.

**Kurs Katılımları**

1-**Karagülle B**. ‘‘ IV.Klonlama Kursu ’’. İnönü Üniversitesi Moleküler Mikrobiyoloji Bölümü, Malatya 27-31 Mayıs 2013.

2-**Karagülle B**. ‘‘ Tübitak-2237- sağlık bilimleri Alanında Tübitak için Araştırma proje Önerisi hazırlama ve yürütme Uygulamalı Eğitimi.’’ Elazığ. 15-17 Eylül 2014.

3-**Karagülle B**. ‘‘Writing great papers in international journal an introduction for researchers. Elazığ, 5-7 may 2014.

4-**Karagülle B**. ‘‘ Temel Bilimlerde 1001 Araştırma Projesi Hazırlama Eğitimi’’ .Elazığ, 01-03 Kasım 2013.