



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**KESİMHANELERDEKİ SIĞIR KARKASLARINDA
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS'İN VARLIĞI VE
MOLEKÜLER TIPLANDIRILMESİ**

Meriç Pelin TUNALI GÖKALP

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

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Özlem KÜPLÜLÜ**

ANKARA

2018

Meriç Pelin TUNALI GÖKALP

GIDA HİJYENİ ve TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

2018

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KESİMHANELERDEKİ SIĞIR KARKASLARINDA
***CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*'İN VARLIĞI VE**
MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ

Meriç Pelin TUNALI GÖKALP

GIDA HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Özlem KÜPLÜLÜ

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
11B3338004 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
2018

ETİK BEYAN

T.C.

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

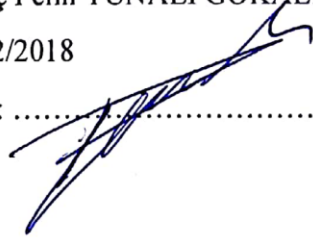
Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Kesimhanelerdeki Sığır Karkaslarında *Clostridium perfringens*'in Varlığı ve Moleküler Tiplendirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle önceki danışman hocam Prof. Dr. İrfan EROL ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Meriç Pelin TUNALI GÖKALP


24/12/2018

İmza:



Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalında
Meriç Pelin TUNALI GÖKALP tarafından hazırlanan
“Kesimhanelerdeki Sığır Karkaslarında *Clostridium Perfringens*’in Varlığı ve
Moleküler Tiplendirilmesi.” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir

Tez Savunma Tarihi : 24.12.2018



Prof.Dr. Özlem KÜPLÜLÜ
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı



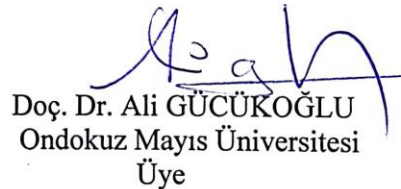
Prof.Dr. Hakan YARDIMCI
Ankara Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Muammer GÖNCÜOĞLU
Ankara Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. N. Deniz AYAZ
Kırıkkale Üniversitesi
Üye



Doç. Dr. Ali GÜCÜKOĞLU
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır

İmza
Prof.Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xi
Çizelgeler	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tarihçe	2
1.2. <i>Clostridium</i> Genusu	4
1.3. <i>Clostridium perfringens</i> 'in Genel Özellikleri	5
1.3.1. Hücre Yapısı, Metabolizma ve Virülens Özellikler	5
1.3.2. Gelişimini Etkileyen Faktörler	10
1.3.2.1. Besin Elementleri	10
1.3.2.2. pH	11
1.3.2.3. Su aktivitesi (a_w)	11
1.3.2.4. Redoks Potansiyeli (Eh)	12
1.3.2.5. Sıcaklık	12
1.3.2.6. Gaz ve Atmosfer	13
1.3.2.7. İnhibitör ve Antimikrobiyel Maddeler	14
1.3.2.8. Antibiyotik Duyarlılık	15
1.4. <i>Clostridium perfringens</i> Toksinlerinin Özellikleri ve Oluşturduğu Hastalıklar	17
1.4.1. Alfa Toksin	20
1.4.2. Beta Toksin	22
1.4.3. Epsilon Toksin	23
1.4.4. İota Toksin	25
1.4.5. Enterotoksin	25
1.5. Gıda Kaynaklı <i>Clostridium perfringens</i> İnfeksiyonları	28
1.5.1. Rezervuarlar ve Epidemiyolojik Veriler	31
1.5.2. Tespit için Kullanılan Yöntemler	37
1.5.3. Ekonomik Kayıplar	44
1.5.4. Korunma ve Kontrol	45
2. GEREÇ ve YÖNTEM	
2.1. Gereç	47
2.1.1. Numune ve Örneklemeye için Kullanılan Gereçler	47

2.1.2. Klasik Kültür Yöntemi ile İzolasyon ve İdentifikasyon için Kullanılan Gereçler	47
2.1.2.1. Thioglycollate Medium	47
2.1.2.2. <i>Perfringens</i> (TSC) Selective Supplement	48
2.1.2.3. Tryptose Sulphite Cycloserin (TSC) Agar	49
2.1.2.4. Koyun Kanlı Agar	49
2.1.2.5. Cooked Meat Medium	50
2.1.2.6. Gram Boyama Gereçleri	51
2.1.2.6.1. Kristal Viyole	51
2.1.2.6.2. İyodin Solüsyonu	51
2.1.2.6.3. Alkol	51
2.1.2.6.4. Safranin	52
2.1.2.6.5. İmmersiyon yağı	52
2.1.2.6.6. Işık Mikroskop	52
2.1.2.7. Laktoz Jelatin Medium	52
2.1.2.8. Nitrat Motilite Medium	53
2.1.2.9. Griess İlosvay Ayraçları	54
2.1.2.9.1. Griess İlosvay Solüsyonu A	54
2.1.2.9.2. Griess İlosvay Solüsyonu B	54
2.1.2.9.3. Çinko Tozu	55
2.1.2.10. Asit Fosfataz Ayracı	55
2.1.2.11. Hidrojen Peroksit Solüsyonu	56
2.1.2.12. Brain Heart Infusion Broth	56
2.1.2.13. Reverse CAMP Test Suşu	57
2.1.2.14. Jar, Anaerojen Kit ve İndikatörü ile Parafin	57
2.1.2.15. Gliserol	57
2.1.3. PCR için Kullanılan Gereçler	58
2.1.3.1. Santrifüj ve Su Banyosu	58
2.1.3.2. Nanodrop Spektrofotometre	58
2.1.3.3. Real-time PCR Cihazı ve Ekipmanları	58
2.1.3.4. Thermocyclers	61
2.1.3.5. Taq DNA Polimeraz	61
2.1.3.6. PCR Buffer	61
2.1.3.7. MgCl ₂	62
2.1.3.8. dNTPs	62
2.1.3.9. Primer Çiftleri	63
2.1.3.10. Pozitif Kontrol Suşları	63
2.1.3.11. Negatif Kontrol	64
2.1.3.12. Mineral Yağ	64
2.1.3.13. Tris-Borik Asit EDTA Buffer	64
2.1.3.14. Etidyum Bromit	65
2.1.3.15. Agaroz Jel ve Tablası	65
2.1.3.16. Bromphenol Blue Loading Dye	66
2.1.3.17. DNA Marker	66
2.1.3.18. Elektroforez Güç Kaynağı	66
2.1.3.19. UV Transilluminatör	66
2.1.4. Antibiyotik Duyarlılık için Kullanılan Gereçler	67
2.1.4.1. Mueller-Hinton Agar	67

2.1.4.2. Antibiyotik Diskler	67
2.2. Yöntem	68
2.2.1. Örneklerin Alınması	68
2.2.2. Klasik Yöntemle <i>C. perfringens</i> 'in İzolasyon ve İdentifikasyonu	68
2.2.2.1. Zenginleştirme ve İzolasyon	68
2.2.2.2. Gram Boyama	71
2.2.2.3. Katalaz Testi	71
2.2.2.4. Reverse CAMP ve Asit Fosfataz Testi	71
2.2.2.5. Laktoz Jelatin Testi	72
2.2.2.6. Nitrat Motilite Testi	73
2.2.3. PCR ile Toksin Genlerin Tespiti	75
2.2.3.1. DNA Ekstraksiyonu ve Miktar Tayini	75
2.2.3.2. Real-Time PCR ile <i>cpa</i> Geninin Tespiti	77
2.2.3.3. Multipleks PCR ile Toksin Genlerinin Tespiti	79
2.2.4. Antibiyotik Duyarlılık	83
3. BULGULAR	83
4. TARTIŞMA	86
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	93
ÖZET	96
SUMMARY	97
KAYNAKLAR	98
ÖZGEÇMİŞ	109

ÖNSÖZ

Gıda infeksiyonlarından sıklıkla izole edilen ve önemli bir halk sağlığı sorunu olan *C. perfringens* prevelansının araştırıldığı bu çalışmada, klasik kültür tekniği, RT-PCR ve multipleks PCR ile 120 sığır karkas örneğinin 63'ünde (% 52,5) *C. perfringens* bulunduğu bildirilmiştir. Pozitif örneklerin tamamı *cpa* genine sahip olup yalnızca 1 tanesinde (% 1,5) beta 2 gen tespit edilmiştir.

Doktora çalışmam süresince tecrübe ve birikimlerini benden esirgemeyip kıymetli vaktini ayıran değerli hocam Sayın Prof. Dr. İrfan EROL ve son dönem tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Özlem KÜPLÜLÜ'ye emekleri için teşekkür ederim. Doktora sürecinde keyifle çalışma fırsatı bulduğum, tüm zorluklarda ve güzelliklerde desteğini gönülden hissettiğim sevgili çalışma arkadaşım Murat ULUDAĞ'a katkılarından dolayı özellikle teşekkür etmek isterim. Ayrıca mezbaha yolculuğumda bana eşlik eden Azam AZIMI MAHALLEH ve Alireza HANIFEHNEZHAD ile laboratuvar çalışmalarında güleryüzünü ve desteğini esirgemeyen Sema KOÇAK BAL'a ve doktora sonuçlandırma sürecimde desteğini esirgemeyen Araş. Gör. Dr. Farah Gönül AYDIN'a teşekkür ederim.

Ayrıca T.C. Uşak Üniversitesi Eşme MYO değerli Öğretim Görevlileri ve T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Ankara Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü Mikrobiyoloji Birimi çalışma arkadaşlarıma destekleri için teşekkür ederim.

Teşekkür ve minnet duygularımın en özeli güzel aileme... Doktoraya başlamamda ve doktora süresince maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen çok özel insan, babam Mehmet Kemal TUNALI'ya, erken saatlerde beni kilometrelerce uzaklıktaki mezbahaya götürerek hayatımın her anında bana sabırla eşlik eden canım annem Dilek TUNALI'ya, canım abilerim Balkan ve Erkan TUNALI'ya ve hayat arkadaşım sevgili eşim Ufuk Kaan GÖKALP'e ve Mitra'ya varlıkları ve destekleri için sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Bu tez 11B3338004 proje numarası ve “Koyun ve Sığır Karkas ve Dışkısında *Clostridium perfringens*'in İnsidensi ve Moleküler Karakterizasyonu” proje başlığı kapsamında birinci danışmanım Prof. Dr. İrfan EROL öncülüğünde kabul edilerek başlatılmıştır. Ancak değerli hocamın T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı'na Gıda ve Kontrol Genel Müdürü olarak atanması nedeniyle projenin tüm sonuçları tamamlandıktan sonra proje yürütücülüğü devredilerek Prof. Dr. Muammer GÖNCÜOĞLU tarafından sonuçlandırılmıştır.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	: Alfa
β	: Beta
δ	: Delta
ϵ	: Epsilon
ι	: İota
κ	: Kappa
λ	: Lambda
θ	: Teta
AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism
ATCC	: American Type Culture Collection, Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
a_w	: Activity of water, su aktivitesi
bp	: Base pair, baz çifti
CAMP	: Christie-Atkins-Munch-Petersen
CCUG	: Culture Collection of the University of Gothenburg, Götenburg Üniversitesi Kültür Koleksiyonu
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention, Amerika Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi
<i>cpe</i>	: <i>Clostridium perfringens</i> enterotoksin geni
CPE	: <i>Clostridium perfringens</i> Enterotoksini
DNA	: Deoxyribonucleic acid, Deoksiribonükleik asit
dNTP	: 3'-dideoxyribonucleoside 5'-triphosphate
FAO	: Food and Agriculture Organization, Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	: Food and Drug Administration, Amerika Gıda İlaç Dairesi
FSA	: Food Standards Agency, Gıda Standartları Ajansı
HACCP	: Hazard Analysis and Critical Control Points, Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları
IDT	: Integrated DNA Technologies

IMS	: İmmunomanyetik Separasyon
kDA	: Kilo Dalton
kob	: Koloni oluşturan birim
Mb	: Megabase pair, Mega baz çifti
MID	: Minimal İnfeksiyon Dozu
µm	: Mikrometre
mM	: Milimolar
NCTC	: National Collection of Type Cultures
PCR	: Polymerase Chain Reaction, Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEM	: Perfringens Enrichment Medium
PFGE	: Pulsed Field Gel Electrophoresis
Pmol	: Pikomolar
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA
TSC	: Tryptose Sulphite Cycloserine
WHO	: World Health Organization, Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Sığır karkasında svap örneklerinin alındığı bölgeler	69
Şekil 2.2. TSC agarda <i>C. perfringens</i> şüpheli koloniler	70
Şekil 2.3. <i>C. perfringens</i> şüpheli koloniler ile yapılan Reverse CAMP ve asit fosfataz testi	72
Şekil 2.4. <i>C. perfringens</i> şüpheli kolonilerde laktoz fermentasyonu testi	73
Şekil 2.5. <i>C. perfringens</i> şüpheli kolonilerde jelatinaz aktivitesi testi	73
Şekil 2.6. <i>C. perfringens</i> şüpheli kolonilerde motilite ve nitrat redüksiyonu testi	74
Şekil 2.7. Cooked Meat Medium besiyerinde anaerobik suş muhafazası	75
Şekil 2.8. DNA ekstraksiyon aşamasında kullanılan santrifüj ve su banyosu	76
Şekil 2.9. Thermocycler	80
Şekil 2.10. Güç kaynağı ile elektroforez işlemi	81
Şekil 2.11. Multipleks PCR sonucu <i>C. perfringens</i> toksin genlerinin agaroz jel elektroforezde oluşan görüntüleri	81
Şekil 2.12. Mueller Hinton agarda disk difüzyon antibiyotik duyarlılık değerlendirme	82
Şekil 3.1. Sığır karkaslarında <i>C. perfringens</i> ve toksin gen varlığı	83
Şekil.3.2. Sığır karkaslarında <i>C. perfringens</i> 'in antibiyotik duyarlılığı	84

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. <i>C. perfringens</i> 'in virülensi ile ilişkilendirilen genleri	8
Çizelge 1.2. <i>C. perfringens</i> toksinlerinin aktivitesi	10
Çizelge 1.3. Anaerob bakterilerde etki spektrumuna göre kullanılan antibiyotikler	16
Çizelge 1.4. <i>C. perfringens</i> 'in neden olduğu hastalıklar	18
Çizelge 1.5. <i>C. perfringens</i> toksinlerinin genel özellikleri	19
Çizelge 1.6. ABD'de 1976 ve 1996 yılları arasında bildirilen gıda kaynaklı <i>C. perfringens</i> vakalarının nedeni ve kaynağı	35
Çizelge 1.7. <i>C. perfringens</i> tespitinde kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması	42
Çizelge 2.1. Real time PCR parametreleri	60
Çizelge 2.2. Primer çiftleri	63
Çizelge 2.3. DNA saflığının nanodrop spektrofotometre ile tespiti	76
Çizelge 2.4. Real-time PCR ile <i>cpa</i> geni amplifikasyon eğrisi tespiti	77
Çizelge 2.5. Real-time PCR sonucu izolatların erime eğrisi analizi	78
Çizelge 3.1. Sığır karkaslarında <i>C. perfringens</i> 'in antibiyotik duyarlılığı	84

1. GİRİŞ

İnsanların yaşamlarını sürdürmek ve sağlıklarını iyileştirmek için yeterli miktarda güvenli ve besleyici gıdaya erişmeleri gerekmektedir. Bakteriler, virüsler, parazitler, prionlar gibi infeksiyöz ve kimyasal maddeler gibi infeksiyöz olmayan etkenler ile kontamine gıdalar diyareden kansere kadar değişen 200'den fazla hastalığa neden olmaktadır. Bu kapsamda Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ, World Health Organisation, WHO) kontamine yiyecekler nedeniyle her yıl yaklaşık olarak 600 milyon kişinin (10 kişiden 1'inin) hastalandığını ve 420 000 kişinin öldüğünü bildirmiştir. Ölümle sonuçlanan vakaların % 40'ını beş yaşın altındaki çocuklar oluşturmaktadır (Anon, 2017).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) verilerine göre ABD'de 1998-2008 yılları arasında 13 405 gıda kaynaklı hastalık salgını, 273 120 hastalık vakası, 9 109 hospitalizasyon ve 200 ölüm tespit edilmiştir. Salgınlardan 7 998'inin (% 60) etiyojisi; virüsler 3 633 (% 45), bakteriler 3 613 (% 45), kimyasal ve toksik ajanlar 685 (% 5) ve parazitler 67 (% 1) olduğu rapor edilmiştir. Bu salgınlardan % 89'unun sekiz etkenden kaynaklandığı bildirilmiştir. Bunlar; Norovirüs (% 39), *Salmonella* (% 26), *shiga* toksin üreten *Escherichia coli* (STEC) (% 6), skombroid toksin/histamin (% 5), *C. perfringens* (% 5), *Staphylococcus enterotoksini* (% 3), *ciguatoksini* (% 3) ve *Campylobacter jejuni* (% 2)'dir. Yapılan değerlendirmeler, ölümle sonuçlanan gıda kaynaklı infeksiyonların % 77'sinin bakteriyel kaynaklı olduğunu göstermektedir (CDC, 2013).

C. perfringens, ABD'de gıda kaynaklı bakteriyel infeksiyonlar arasında en yaygın üç bakteriden biri olarak rapor edilmiştir. ABD yerel ve bölgesel sağlık birimlerinin gönüllü verileri ile gıda kaynaklı hastalık salgınları surveyans sistemi ve CDC'nin 1998-2010 yılları arasında doğruladığı 289 rapor edilmiş *C. perfringens* salgın verisi değerlendirilmiştir. Bu salgınlarda gıda kaynaklı *C. perfringens*

infeksiyonları 15 208 kişinin hastalanmasına, 83 kişinin hospitalizasyonuna ve 8 kişinin ölümüne neden olmuştur. Salgın kaynakları; restoranlar (% 43), hazır yemek sunan işletmeler (% 19), şahıs evleri (% 16), ceza evleri (% 11) ve diğer yerler (% 10) olarak bildirilmiştir. Bu infeksiyonların; sığır eti (66 salgın: % 46), kanatlı eti (43 salgın: % 30) ve domuz eti (23 salgın: % 16) kaynaklı olduğu tespit edilmiştir. Gıdalar çiftlikten sofraya süregelen gıda üretim zincirinin herhangi bir aşamasında kontamine olabilmektedir. Ancak, yapılan değerlendirmelerde; *C. perfringens*'in en sıklıkla bildirilen gıda infeksiyon etkenlerinden olma sebebinin çiğ kırmızı et ve kanatlı etinin kesimhanelerde dışkı ile bulaşması ve gıdaların hazırlanması ve muhafazasında yeterince ve doğru sıcaklık uygulamalarının yapılmaması olduğu bildirilmiştir (Grass ve ark., 2013).

C. perfringens İngiltere'de gıda kaynaklı hastalıkları izlemek için FSA (Food Standards Agency, Gıda Standartları Ajansı) tarafından seçilen beş anahtar patojenden biridir. Buna karşın hastalık çoğu zaman hafif ve kendini sınırlayan seyir izlediği için çoğu vaka rapor edilememektedir (Anon, 2015).

C. perfringens, zorlu koşullarda spor formda olup çevrede, deniz sedimentlerinde, insektlerde ve sıklıkla da insan ve hayvanların bağırsakları ile dışkılarında bulunmaktadır. *C. perfringens*; insanlarda gazlı gangrene (klostridial miyonekrozis, fatal yara infeksiyonu), gıda zehirlenmesine, infantların nekrotik enterokolitisine ve pig bel olarak da bilinen nekrotik enteritise neden olmaktadır. Ayrıca kuzu dizanterisi, koyun enterotoksemisi ve yumuşak böbrek hastalığı ile koyun ve sığırların diğer enterotoksemik hastalıkları gibi birçok hayvan hastalığına yol açmaktadır (Shimizu ve ark., 2002).

1.1 Tarihçe

Louis Pasteur 1861'de, ilk keşfedilen *clostridia* türü olarak *Clostridium butyricum*'u tanımlamıştır. Daha sonra 1892 yılında Welch, Nuttall ve diğer bilim

adamları gangrenöz bir yaradan Gram pozitif anaerob basil izole etmişlerdir. Bu organizma önce *Bacillus aerogenes capsulatus* olarak, daha sonra *Bacillus perfringens*, *Clostridium welchii* ve günümüzde ise *C. perfringens* olarak isimlendirilmiştir. *C. perfringens*'in gıda infeksiyonu etkeni olduğu ilk kez 1895 yılında Londra'da bir hastanede E. Klein isimli bir bilim adamı tarafından bildirilmiştir. E. Klein bulantı, karın ağrısı ve kimi zaman kanlı ishal ile seyreden bu infeksiyonda etken olarak Gram-pozitif, anaerob, spor forma dönüşebilen hareketsiz, mezofil, kenarları köşeli ve çubuk (rod) şeklinde bir mikroorganizmayı izole etmiştir. Dört yıl sonra aynı hastanede çalışan FW Andrews isimli bir bilim adamı pirinçli sütlü tatlı yedikten sonra hastaneye başvuran ishal vakalarından yine *C. perfringens*'i izole etmesine karşın birçok araştırmacı yaklaşık 50 yıl süresince *C. perfringens*'in gıda yoluyla infeksiyona neden olduğu görüşünü reddetmiştir. McClun isimli bilim adamı ise 1945'de, İndiana Üniversitesi öğrenci kafeteryasında meydana gelen salgınların nedeni olarak tavuk etlerinde çok sayıda *C. perfringens* izole etmiştir. Yapılan araştırma sonucunda bu gıda salgınlarına neden olan tavuk etlerinin önceki gün hazırlandığı ve gece boyunca ortam sıcaklığında bekletildiği tespit edilmiştir. İnfeksiyonun inkübasyon süresinin 8-20 saat olduğu ve 12-24 saat boyunca karın ağrısı, ishal ve nadiren kusmaya neden olduğu, buna karşın ateşe neden olmadığı bildirilmiştir. Yıllar sonra Hobbs ve ark. (1953) Londra'da meydana gelen *C. perfringens* gıda zehirlenmelerinden izole ettikleri suşların spor formlarının sıcaklığa dirençli olduklarını tespit etmişlerdir. İnfeksiyonlarda çoğunlukla kontamine et ve et içeren yemeklerin sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. Londra ve Kanada'da yapılan araştırmalarda ise *C. perfringens*'in gıda kaynaklı infeksiyona neden olabilmesi için çok sayıda (10^{6-9} kob) canlı vejetatif formunun gıda yoluyla alınması gerektiği saptanmıştır (Shimizu ve ark., 2002; Smith, 1973).

C. perfringens, gıda zehirlenmelerinin yanı sıra özellikle savaş dönemlerinde gazlı gangrene neden olan etken olarak da bildirilmiştir. Birinci Dünya Savaşı sırasında yüz binlerce askerin yaralı bölgelerinin *C. perfringens* ile komplikasyonu sonucunda gazlı gangrenden öldüğü tahmin edilmektedir (Shimizu ve ark., 2002).

1.2 *Clostridium* Genusu

Clostridium genusu, asit üreten bakteriler olarak bilinmekte olup *Clostridiaceae* familyasında yer almaktadır. Çoğu tür çoğunlukla çevrede ve en çok da toprakta saprofit olarak bulunmaktadır. Tespit edilen 200'den fazla türden 152'si isimlendirilmiştir. Bunlardan 30 tanesi insanlarda infeksiyona sebep olmaktadır. *C. perfringens* tüm izolatların % 20-40'ını oluşturmaktadır. *Clostridium* türleri arasındaki spesifikasyon; hücresel morfoloji, spor lokasyonu (sentral, subterminal, terminal), biyokimyasal reaksiyonlar, fermentasyon ürünlerinde gaz-sıvı kromatografisi, lesitinaz (*C. perfringens* alfa toksin) ve lipaz (*Clostridium sporogenes*, *Clostridium novyi* ve *Clostridium botulinum*) aktivitesi tespiti ile yapılmaktadır (Hailegebreal, 2017; Jousimies-Somer ve ark., 2002). Son yıllarda 16S rRNA ve ribozomal protein sekansları fenotipik özelliklere göre evrimsel yakınlığın daha iyi göstergeleri olarak bildirilmektedir. Bu nedenle *Clostridium* genusundan yeni genuslar oluşturulmuştur: *Peptoclostridium*, *Lachnoclostridium*, *Ruminiclostridium*, *Erysipelatoclostridium*, *Gottschalkia* ve *Tyzzera*. Örneğin; *C. difficile*; bazı literatürlerde *Peptoclostridium difficile* olarak da adlandırılmaktadır (Yutin ve Galperin, 2013).

Gıda kaynaklı *Clostridium* infeksiyonlarında sıklıkla bildirilen türler *C. perfringens* ve *C. botulinum*'dur. Bunların dışında; çevrede yaygın olarak bulunan *C. butyricum*, *C. tertium* ve *C. bifermentans* nadiren de olsa gıda infeksiyonları ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, *C. difficile* de potansiyel gıda infeksiyon etkeni olarak bildirilmiştir. Araştırmacılar, antibiyotik tedavisi sonrasında yıkılan bağırsak florası ile ilişkilendirilen ve yalnızca insanlarda infeksiyon etkeni olarak bilinen *C. difficile*'nin zoonoz bir etken olduğunu ve hayvanlarda da infeksiyona neden olduğunu tespit etmişlerdir. Son zamanlarda *C. difficile* ile ilişkilendirilen gıda infeksiyonlarının sayısının arttığı bildirilmiştir. Ancak bulgular bölgelere göre değişkenlik göstermektedir. Örneğin; Kuzey Amerika'da perakende et ve et ürünlerinde *C. difficile* kontaminasyon prevalansı % 4,6 ile % 50 arasında değişmektedir. Avrupa ülkelerinde ise *C. difficile* pozitif örnekler % 0-3 gibi çok düşük yüzdeler ile rapor edilmiştir (Hailegebreal, 2017; Rupnik ve Songer, 2010).

1.3. *Clostridium perfringens*'in Genel Özellikleri

C. perfringens diğer birçok *clostridia* türünün aksine in vitro ortamda çoğalabilme ve özel ortamlarda spor forma dönüşebilme özelliğine sahiptir. *C. perfringens* uygun besi yerlerinde; aseton, butanol, etanol, butirik asit, asetik asit, propiyonik asit, laktik asit, karbon dioksit ve hidrojen üretmektedir. Karbonhidrat içeren besiyerlerinde CO₂ ve H₂ oluşturarak oksijensiz ortam sağlamaktadır. *C. perfringens* oksijenli ortamı tolere edebilme ve hızla çoğalabilme özelliği ile *clostridia* türlerinin genetiğinin açığa çıkarılmasında model organizma olarak kullanılmıştır (Shimizu, 2002; Young ve ark., 1989).

1.3.1. Hücre Yapısı, Metabolizma ve Virülens Özellikler

C. perfringens; Gram pozitif, fakültatif anaerob (mikroaerofil, aerotolerant), hareketsiz, subterminal formda spor oluşturan, çubuk (rod) şeklinde; 0,6-2,5 µm genişliğinde ve 1,3- 19 µm uzunluğunda bir bakteridir. Rodların uzunluğu büyüme ortamına bağlı olarak değişebilmektedir. Örneğin; rodlar glukoz ile zenginleştirilmiş besiyerinde kısa, nişasta ile hazırlanan besiyerinde uzun olarak şekillenmektedir. Spor formu oval ve subterminaldir. Diğer Gram pozitif bakteriler gibi, *C. perfringens* de stoplazmik lipit membran, teikoik asitler ve kapsül polisakkaritlerini içeren kalın bir peptidoglikan katmandan oluşmaktadır (Petit ve ark., 1999; Shimizu, 2002).

Endosporun hücre yapısı, bakterinin vejetatif şekline göre oldukça farklı olup içeriden dışarıya doğru şu kısımlar yer almaktadır: Öz veya spor protoplastı (hücre duvarı, sitoplazmik membran ve nükleoitin bulunduğu yapı), kabuk veya korteks (gevşek olarak çapraz bağlanmış peptidoglikan yapı), spor örtüsü (spora özel protein yapı), ekzosporium (ince proteinden yapılmış örtü). Endosporlarda, vejetatif hücrelerde bulunmayan dipikolinik asit bulunmaktadır. Bakteriyel sporların kuru madde ağırlığının % 5 ile 15'i dipikolinik asit (piridin-2,6-dikarboksilik asit)

bileşeninden oluşmaktadır. Dipikolinik asit, endosporların sıcaklık direncinden sorumludur. Genel olarak sporların vejetatif hücrelerden daha dirençli olması; dış kısmının geçirgen olmaması, fazla miktarda dipikolinik asit ve kalsiyum içermesi, su oranının az olması, metabolizma ve enzim faaliyetlerinin çok az olması ile açıklanmaktadır. Dipikolinik asit endospora spesifik olup öz bölgesinde Ca iyonları ile birleşmekte ve endospor kuru ağırlığının % 10'unu oluşturmaktadır. Endosporun öz bölgesinde sporlanma sırasında oluşan ve buraya özel olan küçük, asit ile eriyebilen spor proteinleri (small, acid-soluble spore proteins: SASPs) vardır. SASPs'nin iki görevi bulunmaktadır: Birinci görevi; sporun öz bölgesindeki DNA'ya bağlanarak DNA'yı UV ışınları, kuruma ve ısı gibi zararlı etkilere korumak ve ikinci görevi ise endospordan vejetatif hücre oluşurken bu proteinleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmak. *C. perfringens*'in sporlanma süresi bulunduğu koşullara göre 8-15 saat arasında değişmektedir (Brown, 2000; Setlow, 2007).

C. perfringens, enerjiyi anaerobik solunum yaparak elde etmektedir. Oksijensiz solunum sırasında son elektron alıcısı olarak nitratı kullanmaktadır. Bu nedenle nitrat varlığında *C. perfringens*'in gelişme hızı artmaktadır. Nitrat, enerji üretiminde artışı sağlayan substrat düzeyinde fosforilasyon oluşumu için daha fazla metabolit molekülleri oluşturmaktadır. *C. perfringens*, glikojen metabolizması ve glikolizis devamlılığını sağlamak için gerekli olan tüm enzimlere sahiptir. Genomunda kodlanan çeşitli glikolitik enzimleri sayesinde şeker bileşiklerini daha basit formlara dönüştürmektedir. Buna karşın *C. perfringens* aminoasit biyosentezi için gerekli olan genlerin hepsine sahip değildir. Bu nedenle *C. perfringens*, esansiyel aminoasit kaynağı bulunmayan ortamda yaşamını sürdürememektedir (Shimizu, 2002).

Sporulasyon başlangıcını kontrol eden faktörlerin aktivasyonundan sonra *C. perfringens*'in stoplazmasında çok miktarda protein yapıda enterotoksin üretimi gerçekleşmektedir. Sporulasyonu tamamlanan ana hücrede toplam hücre proteininin % 30'dan fazlası enterotoksin olduğunda hücre lize olarak toksinler açığa çıkmaktadır. Enterotoksin oluşumu spor oluşumuyla paralellik göstermesine karşın,

ana hücrenin lize olmasıyla yani yaklaşık 10 saat sonra azalmaktadır (De Jong ve ark., 2002).

C. perfringens'in vejetatif formlarının optimum koşullarda jenerasyon süresinin 7 dakika gibi kısa bir süre olduğu rapor edilmiştir. Bu özelliği onu bilinen en hızlı çoğalabilen bakteri yapmaktadır (Gupta, 1998; Labbe, 1989).

C. perfringens'in kromozomunun 3 031 430 baz çiftinden oluştuğu ve bunun da % 28,6'sının guanin-sitozin (GC) olarak hesaplandığı bildirilmiştir. Bu veri, *C. perfringens*'in diğer Gram pozitif bakterilerle kıyaslandığında nispeten düşük GC içeriğine sahip olduğunu göstermektedir. Kromozomu 10 rRNA ve 96 tRNA geni içermektedir. Bu genom “nükleosit/nükleotit ve karbonhidrat, katyon/anyon, aminoasit” taşıyıcıları kodlayan genleri içermektedir (Çizelge 1.1.). Replikasyon, transkripsiyon süreci ile düzenlenmektedir. *C. perfringens*'in genomu, gaz üretimini sağlayan tipik anaerobik fermentasyon enzimlerini içermesine karşın trikarboksilik asit siklusu (TCA siklusu) veya solunum zinciri için enzim bulundurmamaktadır (Shimizu ve ark., 2002).

C. perfringens, sinerjistik etki oluşturan ekstrasellüler enzimler ve toksinler üreterek virülens özellik göstermektedir. Düzenleyici RNA ve hücre-hücre iletişimini sağlayan iki bileşenli sistem bulunmaktadır. Bu sistemde, enerji metabolizması ve virülens genleri düzenleyerek patogenezi kontrol eden en önemli kaskat; VirS/VirR-VR-RNA sinyal iletim dizisidir. VirS, aksesuar gen regülatörü (agr) sistemi tarafından üretilen peptit ile ilişkilendirilmektedir. Toksin genlerin çoğu VirS/VirR iki bileşenli sistem ve bir yardımcı gen regülatörü (agr) quorum sensing (QS) sistemi tarafından düzenlenmektedir. VirS/VirR; çevreyi veya uyarıları algılayan membrana bağlı sensör olan histidin kinaz ve bir transkripsiyonel düzenleyici olan stoplazmik tepki düzenleyicisinden oluşmaktadır. Histidin kinaz, bir fosfat grubunu tepki/yanıt regülatörüne aktararak regülatörü aktive eder. Aktive edilmiş yanıt regülatörü, birçok genin ekspresyonunu düzenlemektedir (Ohtani ve Shimizu, 2015).

Çizelge 1.1. *C. perfringens*'in virülensi ile ilişkilendirilen genleri (Shimizu ve ark., 2002).

Gen ismi	Virülens özelliği	Aminoasit boyu	Benzer sekans kaynağı
CPE0030 <i>hlyA</i>	Hemolizin ile ilişkilendirilen protein	421	<i>Thermotoga maritima</i>
CPE0036 <i>plc</i>	Fosfolipaz C (alfa toksin)	398	<i>C. perfringens</i>
CPE0163 <i>pfoA</i>	Perfringolizin O (θ, teta toksin)	500	<i>C. perfringens</i>
CPE0173 <i>cola</i>	Kollajenaz (kappa toksin)	1 104	<i>C. perfringens</i>
CPE0191 <i>nagH</i>	Hiyaluronidaz (mu toksin)	1 628	<i>C. perfringens</i>
CPE0378	Miyozin, çapraz reaktif antijen	597	<i>Streptococcus pyogenes</i>
CPE0437 <i>hlyB</i>	Hemolizin	445	<i>Streptococcus mutans</i>
CPE0452 <i>entC</i>	Enterotoksin	625	<i>Bacillus cereus</i>
CPE0553 <i>nanJ</i>	Ekzo alfa siyalidaz	1 173	<i>Clostridium septicum</i>
CPE0606 <i>entD</i>	Enterotoksin	635	<i>B. cereus</i>
CPE0725 <i>nanH</i>	Ekzo alfa siyalidaz	694	<i>C. perfringens</i>
CPE0737	Fibronektin ile bağlanan protein	220	<i>Listeria monocytogenes</i>
CPE0846	α clostripain	524	<i>Clostridium histolyticum</i>
CPE0881 <i>nagI</i>	Hiyaluronidaz (mu toksin)	1 297	<i>C. perfringens</i>
CPE1231	Yüzey proteini	1 129	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
CPE1234 <i>nagJ</i>	Hiyaluronidaz (mu toksin)	1 001	<i>C. perfringens</i>
CPE1258 <i>entA</i>	Enterotoksin	955	<i>B. cereus</i>
CPE1279 <i>nagK</i>	Hiyaluronidaz (mu toksin)	1 163	<i>C. perfringens</i>
CPE1354 <i>entB</i>	Enterotoksin	549	<i>B. cereus</i>
CPE1474 <i>hlyC</i>	Hemolizin	215	<i>Deinococcus radiodurans</i>
CPE1523 <i>nagL</i>	Hiyaluronidaz (mu toksin)	1 127	<i>C. perfringens</i>
CPE1818 <i>hlyD</i>	Hemolizin	271	<i>Bacillus halodurans</i>
CPE1847	Fibronektin ile bağlanan protein	575	<i>Bacillus subtilis</i>
CPE1915 <i>hlyE</i>	Hemolizin III	213	<i>B. cereus</i>
PCP17 <i>cpb2</i>	Beta 2 toksin	265	<i>C. perfringens</i>
PCP57 <i>cna</i>	Kollajen adezin	1 368	<i>S. aureus</i>

C. perfringens katalaz, indol ve süperoksit dismutaz negatif, lesitinaz (alfa toksin), ve kollajenaz pozitif, laktozu fermente edebilen, beta hemolitik, nitratı nitrite indirgeme ve sülfid indirgeme özelliğine sahiptir (Hailegebreal, 2017; Petit ve ark., 1999).

C. perfringens dört major toksin oluşturmaktadır. Alfa toksin (*CPA*, *cpa* gen); tüm *C. perfringens* tiplerinde bulunmakta ve kromozomal gen tarafından sentezlenmektedir. Diğer üç major toksin; beta toksin (*CPB*, *cpb* gen), epsilon toksin (*ETX*, *etx* gen), iota toksin (*ITX*, *iap* ve *ibp* gen) bazı *C. perfringens* tiplerinde bulunmakta ve plazmidal genler tarafından sentezlenmektedir. *C. perfringens*'in 16'dan fazla minör toksini bulunmaktadır. Minör toksinlerin çoğu plazmidal genler

tarafından sentezlenmektedir. Yalnızca PFO (perfringolizin O, θ ; teta toksin) kromozomal ve enterotoksin ise hem kromozomal hem de plazmidal genler tarafından sentezlenmektedir (Hassan ve ark., 2015; Uzal ve ark., 2014).

Bakterinin virülensi, çok sayıda toksin üretebilme yeteneğinden kaynaklanmaktadır. *C. perfringens* tarafından üretilen toksinlerin çoğu 45 kb ve 140 kb arasında değişen büyüklükteki plazmitler tarafından kodlanmaktadır. Moleküler Koch postulat analizleri, enteritis veya enterotoksemi oluşturan *C. perfringens* dizilerinden çoğunun plazmit tarafından kodlanan toksinlerin önemi üzerinedir. Toksin plazmitleri, yaygın evrimsel orjin ile yakından ilişkilidir. Özellikle *C. perfringens*'in toksin plazmitlerinin çoğu ve bazı antibiyotik direnç plazmitleri, tcp (transfer of clostridial plasmids, klostridial plazmitleri aktaran) olarak adlandırılan bölgede bulunmaktadır. Bu tcp bölgesi toksin veya direnç plazmitlerinin konjugatif aktarımına büyük ölçüde aracılık eden Tn916'yı içermektedir. Örneğin; infekte diziden normal bağırsak florasındaki *C. perfringens*'e toksin plazmidin konjugatif transferi infeksiyonda ilerlemeye neden olabilmektedir. Konjugatif plazmitlerde toksin genlerin varlığı özellikle bu toksin genlerin hareket edebilmesine neden olan sekansların insersiyonu (eklenmesi) ile ilişkilendirilmektedir (Li ve ark., 2013).

C. perfringens'in sentezlediği toksinler farklı virülens özellikler göstermektedir. Alfa toksin; sitolitik, hemolitik, dermonekrotik ve letal etkiye sahiptir. Beta toksin sitolitik, dermonekrotik ve letal etkileri yanında bağırsak mukozasında hemorajik nekroza sebep olmaktadır. Epsilon toksin, dermonekrotik ve letal etkinin yanı sıra böbrek, karaciğer ve merkezi sinir sisteminde ödem oluşturmaktadır. İota toksin, dermonekrotik ve letal etkileriyle hücre duvarı bütünlüğünü bozmaktadır. Enterotoksin; sitotoksik, eritamatöz ve letal etki göstererek bağırsak hücrelerindeki iyon dengesini bozmaktadır (Çizelge 1.2.). *C. perfringens*'in toksin ve hidrolitik enzimleri, diğer gıda patojenlerinin sentezledikleri metabolitlerle homoloji göstermektedir. Alfa toksinin *Clostridium novyi*'nin sentezlediği alfa toksin ile % 60,8, *Clostridium bifermentans*'ın sentezlediği alfa toksin ile % 50,8, *Bacillus cereus*'un sentezlediği fosfolipaz C ile % 26,5, *Listeria monocytogenes*'in sentezlediği lesitinaz ile % 20,9, *Bacillus thuringiensis*'in

sentezlediği fosfolipaz C ile % 20,4 benzer olduğu tespit edilmiştir (Brynstad ve Granum, 2002; McClane, 2001; Petit ve ark., 1999).

Çizelge 1.2. *C. perfringens* toksinlerinin aktivitesi (Juneja ve ark.,2010; Petit ve ark., 1999; Uzal ve ark., 2014'ten modifiye edilmiştir).

Letal Toksin Tipi	İnfeksiyon Tipi	Toksin Aktivitesi	
Major Toksinler	Alfa toksin	A, B, C, D, E	Nekrotik, hemolitik, lesitinaz C, sfingomiyelinaz
	Beta toksin	B, C	Nekrotik, por oluşturma
	Epsilon toksin	B, D	Nekrotik (tripsin ile aktive olur), por oluşturma
	İota toksin	E	Nekrotik (tripsin ile aktive olur), aktin-spesifik ADP-ribosiltransferaz
Minor Toksinler	Gama toksin	*B, *C	Letal
	Delta (δ) toksin	*B, *C	Hemolitik
	Eta toksin	*A	Letal (geçerliliği sorgulanabilir)
	Teta (θ) toksin (PFO)	*A, B, C, D, E	Hemolitik (oksijen labil), por oluşturma
	Kappa toksin	A, C, D, E	Nekrotik, jelatinaz, kollajenaz
	Lambda toksin	B, D, E	Proteinaz (Azocoll parçalayıcı, jelatinaz)
	Mu toksin	*A, B, *C, *D, *E	Hiyaluronidaz
	Nu toksin	*A, B, C, *D, *E	Deoksiribonükleaz
	Nöraminidaz	A, B, C, D, E	N-asetil nöraminik asit glikohidrolaz
	Enterotoksin	A, B, C, D, E	Enterotoksik, sitotoksik, plazma membran ile kompleks oluşturma
	Beta 2 toksin	A	Por oluşturma
	TpeL (Toksin perfringens large)	B	Ras'a özel mono glikoziltransferaz
	Nekrotik enteritis toksin B-benzeri (netB)	A	Nekrotik

* Bazı *C. perfringens* suşlarında tespit edilmiştir.

1.3.2. Gelişimini Etkileyen Faktörler

1.3.2.1. Besin Elementleri

C. perfringens gelişmek ve çoğalmak için 13-14 aminoasit, 5-6 vitamin ve birçok mineral maddeye ihtiyaç duymaktadır. Besin elementlerini bulunduğu dokuda

kitlesele imha ile sonuçlanan çok sayıda yıkımlayıcı enzim ve toksinleri sayesinde elde etmektedir. Gelişimi için gerekli olan tüm aminoasitleri sentezleyemediğinden proteince zengin ortamlarda sıklıkla izole edilmektedir. *C. perfringens*, basit şekerlerin çoğunu, nişastayı, glikojen ve bazı aminoasitleri parçalamaktadır (Shimizu ve ark., 2002).

C. perfringens'in farklı suşlarının gelişimi için ihtiyaç duydukları besin elementleri değışkenlik göstermektedir. Buna karşın yaşamlarını sürdürmeleri için gerekli olan minimal ortam; alanin, arginin, aspartik asit, sistin, glutamik asit, histidin, izolösin, lösin, metiyonin, fenilalanin, treonin, triptofan, tirozin ve valin, amonyum klorür, magnezyum klorür, demir klorür, sodyum-potasyum fosfat tamponu, glukoz, adenin, biotin, kalsiyum pantotenat ve piridoksin içermelidir. Tüm bu bileşenler et ve karaciğer gibi besinlerde bulunmaktadır (Fuchs ve Bonde, 1957).

1.3.2.2. pH

C. perfringens gelişimini 5,1- 9,7 aralığındaki pH'de sürdürebilmektedir. Optimum pH 6-7 aralığında değışmektedir. Sporlanma 5,1 ile 9,9 pH aralığında gerçekleşmektedir (Li ve McClane, 2006a).

1.3.2.3. Su aktivitesi (a_w)

C. perfringens 0,94-0,97 aralığındaki su aktivitesinde gelişim göstermektedir. Bu aralıktaki gelişimi; pH, sıcaklık, oksidasyon redüksiyon potansiyeli ve çeşitli besinlerin varlığı ile ilişkilendirilmektedir (ICMSF, 1996).

1.3.2.4. Redoks Potansiyeli (E_h)

Clostridium perfringens +200 mV E_h 'de üremeye başlamaktadır. Ancak, tuz gibi bazı maddeler arttığında E_h artışı da sınırlanmaktadır (Morris, 2000). Gıdada E_h veya a_w değişimleri simbiyotik etki oluşturabilmektedir. *C. perfringens* yüksek sıcaklıklarda, örneğin; mezbahada yeni kesilmiş hayvanların dokularındayken redoks potansiyelini düşürebilmektedir. Yaklaşık 300 mV E_h 'de gelişimleri inhibe olmaktadır (Juneja ve ark., 2010).

1.3.2.5. Sıcaklık

C. perfringens'in gelişimi için optimum sıcaklık 43-45 °C olup 15-50 °C aralığında gelişimini sürdürebilmektedir. Bu sıcaklık aralığı dışında gelişmelerini sürdürmeleri için; uzamış lag ve jenerasyon süresi ile anaerob koşullar gerekmektedir. Örneğin; 52,3 °C'de gelişmeleri yalnızca tam anaerobik ortamda gerçekleşmektedir. *C. perfringens* popülasyonunun 10 °C'den daha düşük sıcaklıklarda ya olduğu gibi kaldığı ya da azaldığı rapor edilmiştir. Bu durum *C. perfringens*'in uygun soğutma koşullarında gelişim sağlayamadığını göstermektedir (Juneja ve ark., 2010; Labbe ve Juneja, 2002; Shoemaker ve Pierson, 1976).

C. perfringens, et üretim sisteminde hızla çoğalabilmektedir. Ete inokule edilen vejetatif *C. perfringens*'in 45 °C'de lag faz olmaksızın çoğalmaya başladığı tespit edilmiştir (Hall ve Angelotti 1965).

Piştirme işlemi *C. perfringens*'in vejetatif formlarını öldürürken uykuda olan yani inaktif spor formlarının oluşumunu stimüle etmektedir. Gıdalar yavaş soğutulduklarında piştirme sırasında oluşan spor formlar vejetatif hücrelere dönüşerek hızla çoğalmaktadır (McClane, 2005; McClane 2007).

Spor formların geliştiği sıcaklıklar minimum 12 °C, maksimum 50 °C ve optimum 43- 47 °C'dir (ICMSF, 1996).

Domuz etinde *C. perfringens*'in vejetatif ve spor formlarının D ve Z değerleri üzerinde bir çalışma yapılmıştır. D değeri vejetatif hücrelerde; 65 °C'de 0,9 dakika, 55 °C'de 16,3 dakika, spor formlarda ise 100 °C'de 2,2 dakika, 90 °C'de 34,2 dakika olarak belirlenmiştir. Z değeri vejetatif hücrelerde 7,8 °C, sporlarda ise 8,4 °C olarak tespit edilmiştir (Byrne ve ark., 2006).

Sporlar yüksek sıcaklık direncine sahip oldukları için gıdalarda pişirme süresince canlılıklarını sürdürmektedir. Sporların sıcaklık direnci; dipikolinik asitin ve metal iyonlarının konsantrasyonu, spor çekirdeğinin büyüklüğü ve protoplastın sporoplasta oranı ile ilişkilendirilmektedir. Ayrıca enterotoksin üreten A tipi *C. perfringens* endosporları, bu toksini üretmeyenlere göre sıcak ve soğuğa karşı daha fazla dirençlidir. CPE+ suşların spor çekirdeğindeki Mg⁺² ve Fe⁺² içeriği CPE- olanlardan daha fazla tespit edilmiştir. CPE+ suşlardaki Mg⁺² konsantrasyonu yaklaşık iki kat fazla ve Fe⁺² konsantrasyonu üç kat daha fazladır. Bu kapsamda *C. perfringens*'in neden olduğu akut gıda zehirlenmelerinde iki temel bakteriyel faktör önem taşımaktadır. İlki kontamine gıdalarda yüksek sıcaklık direncine sahip olan *C. perfringens* endosporlarının oluşması, ikincisi ise bu sporların *cpe* içermesidir. CPE+ türlerin D değeri 90 °C'de 19-120 dk, 95 °C'de 17-63 dk, CPE- türlerin 90 °C'de 5-13 dk ve 95 °C'de 1-3 dk arasında tespit edilmiştir. Bir diğer çalışmada ise D değeri, kromozomal *cpe* genine sahip izolatlarda 100 °C'de 30-124 dk ve plazmidal *cpe* genine sahip olanlarda ise 1-2 dk arasında tespit edilmiştir (Orsburn ve ark., 2008; Sarker ve ark., 2000).

1.3.2.6. Gaz- Atmosfer

C. perfringens oksijen varlığında iyi üreyememektedir. Pişmiş etler üzerinde vejetatif *C. perfringens* hücrelerinin aerobik ve anaerobik koşullarda gelişimi

üzerinde yapılan bir çalışmada etkenin anaerobik koşullarda çok daha hızlı ürediği tespit edilmiştir (Juneja ve ark., 2010).

1.3.2.7. İnhibitör ve Antimikrobiyel Maddeler

Gıdaların normal mikroflorasındaki psikrofiller, aerob mezofil bakteriler ve enterokoklar *C. perfringens*'in gelişimini baskılamaktadır. Ayrıca bakteriyosinler ve NaNO₂ inhibitörik etki göstermektedir. Bu nedenle kürlenmiş et ve ürünlerinden kaynaklanan *C. perfringens* infeksiyonları oldukça az bildirilmektedir (Erol, 2007).

Araştırmalar *C. perfringens*'in çeşitli NaCl ilavesi yapılmış ortamlarda gelişimini sürdürdüğünü göstermektedir. Örneğin, bazı suşlar % 4 NaCl ile inhibe olurken bazıları % 8 gibi yüksek NaCl konsantrasyonlarında inhibe olmaktadır (Juneja ve ark., 2010).

C. perfringens'in vejetatif hücreleri ve spor germinasyonu, diğer türlere göre nitritin antimikrobiyel etkinliğinden daha az etkilenmektedir. Sodyum nitrit ancak 12 000 ppm kullanıldığında *C. perfringens*'in gelişimini inhibe etmektedir. *C. perfringens* sporlarının germinasyonu % 0,01- % 0,02 sodyum nitrit ilavesi ile yavaşlatılmaktadır (Labbe ve Juneja, 2002). Sodyum nitrit ve tuz sinerjistik olarak *C. perfringens* gelişimini inhibe etmektedir. Gıda ürünlerinin çeşidi, pH'sı, NaCl ile fosfatlar ve organik asit tuzlarının miktarı, nitrat/nitrit gibi antimikrobiyel içerikleri ve fonksiyonel bileşenleri *C. perfringens*'in gelişiminde değişikliklere neden olabilmektedir (Juneja ve ark., 2010).

C. perfringens sporlarını inaktive eden sıcaklık gıdaların organoleptik özelliklerini ve ürün kalitesini olumsuz etkilemektedir. Pişirme işlemi, gıdalardaki anaerobik ortamın artışına ve rekabetçi floranın azalmasına veya yıkımlanmasına neden olmaktadır. Gıdaların pişirilmesi ile oluşan 60-80 °C'deki sıcaklıklar sıcaklık şokundaki *C. perfringens* sporlarının germinasyonunu aktive edebilmektedir. Bu

kapsamda çeşitli gıda işleme süreçlerinin *C. perfringens* vejetatif hücreleri ile sporları üzerindeki etkilerini anlamak için birçok çalışma yapılmıştır. Novak ve Yuan (2004), sığır eti yüzeylerindeki *C. perfringens* vejetatif hücrelerine ve sporlarına karşı hafif sıcaklık ile ozon uygulamasının etkileri üzerinde çalışma yapmışlardır. Ozon ile birlikte 45-75 °C'de pişirme sıcaklığı uygulamasının sığır eti yüzeyinde bulunan *C. perfringens*'in enterotoksin üreten türleri üzerindeki etkinliğini artırdığını tespit etmişlerdir. Çalışmada ozon ile muameleyi takiben uygulanan sıcaklığın *C. perfringens* vejetatif ve spor formlarının sayı ve dirençlerinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir.

1.3.2.8. Antibiyotik Duyarlılık

Gıda kaynaklı hastalıkların halk sağlığı yönünden önem taşıdığı diğer bir konu gıda patojenlerinin antibiyotiklere karşı geliştirdikleri dirençtir. Et ve süt gibi gıdaların üretim sürecinde hayvanlara profilaktik ve gelişmeyi artırıcı amaçlı antibiyotik kullanılması antibiyotik direnç sorununun temel nedenlerindedir (Teuber, 1999).

Antibiyotikler bakterilerin üreme dönemi öncesinde, üreme döneminde ve hızlı gelişmesi sırasında etkili olmaktadır. Bazılarının (penisilinler gibi) etkisi yalnızca hızlı gelişme döneminde açığa çıkmaktadır. Antibiyotikler bakteri sporlarını etkilemezler. Bakteri sporlarındaki dipikolinik asit ve diğer bazı maddeler ilaçların girişini engellemektedir (Kaya, 2002).

Anaerob Gram pozitif bakterilerde etki spektrumuna göre kullanılan bazı antibiyotikler Çizelge 1.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.3. Anaerob bakterilerde etki spektrumuna göre kullanılan antibiyotikler (Kaya, 2002).

Etki spektrumu	İlaçlar
Geniş	Kloramfenikol, kinolonlar, tetrasiklinler, imipenem, azlosilin, sefoksitin, moksalaktam
Genişçe	Birinci ve ikinci nesil sefalosporinler, karbenisilin, sefoperazon, sefotaksim, seftriakson, etkisi güçlendirilmiş penisilinler, aminopenisilinler
Dar	Benzilpenisilinler, linkozamidler, makrolidler, tiamulin, vankomisin, basitrasin, izoksazolil penisilinler, nafsilin, metisilin, imidazol bileşikler

Birçok *Clostridium* spp., genellikle penisilin G, amoksisilin, tikarsilin, piperasilin, sefazolin, sefoksitin, sefotetan, üçüncü kuşak sefalosporin, kloramfenikol, klindamisin, makrolidler, metronidazol, imipenem, meropenem, tetrasiklin, tigesiklin, florokinolon, vankomisin, daptomisine genellikle yeterince duyarlı değildir. *C. perfringens* kinupristin-dalfopristin, rifampin, penisilin kombinasyonları ve beta-laktamaz inhibitörlerine genellikle duyarlıdır. Kanada’da yapılan bir çalışmada sığır, tavuk, domuz ve hindi kökenli 275 *C. perfringens* izolatında antimikrobiyel duyarlılık belirlenmiştir. Tavuk izolatlarının % 64’ünde ve hindi izolatlarının % 60’ında basitrasin duyarlılığının azaldığı bildirilmiştir. Domuz izolatlarının % 28’inde klindamisin, % 31’inde eritromisin için duyarlılık azalması tespit edilmesine karşın sığır izolatlarının % 10’unda klindamisin ve % 10’unda florfenikol duyarlılığının azaldığı bildirilmiştir. Tetrasiklin tüm türlerde azalmış duyarlılık göstermektedir. Kanatlı hayvanlarda *C. perfringens* izolatlarının tetrasiklin direnci İsveç’te % 76, Danimarka’da % 10, Norveç’de % 29 olarak tespit edilmiştir. Brezilya’da domuzlardan elde edilen *C. perfringens* izolatlarının çoğunda tetrasiklin ve linkomisin direnci tespit edilmiştir (Brook, 2013; Brook, 2018; Johansson ve ark., 2004; Slavić ve ark., 2011).

Clostridium türlerinin çoğu bir veya daha fazla beta laktamaza direnç geliştirmiştir. Beta-laktamaz üreten *Clostridium* spp. genellikle klavulanik asidi inhibe eden enzimleri üretmektedir. Rifampin ve kloramfenikol *C. perfringens* için bakterisidal aktivitede yetersiz kalabilmektedir. Sefoksitin ise *C. perfringens*’e çoğu diğer sefalosporinlerden daha az etki göstermektedir. Ayrıca diğer clostridia türleri de antimikrobiyellere direnç geliştirmiştir. *C. ramosum* ve *C. innocuum* penisiline (% 100) direnç geliştirmiştir.

16-57), sefoksitine (% 22-48), diğ er sefalosporinlere (% 20), klindamisine (% 5-50), florokinolonlara ve metronidazole (% 11-12) direnç geliştirmiştir. *C. clostridioforme* penisiline (% 26-90), sefalotine (% 17), sefoksitine (% 29-48), sefotetana (% 17-29), seftriaksona (% 21), kloramfenikole (% 33), klindamisine (% 7-30) ve tetrasikline (% 55) direnç göstermiştir (Brook, 2018).

Araştırmacılar PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, darbe atımlı alan jel elektroforezi) kullanılarak çıkartılmış *C. perfringens*'in fiziksel haritası ile, *C. perfringens* membranında 6 penisilin bağlayan protein (PBPs) tanımlamıştır. Birçok aerobik bakteri gibi *C. perfringens* de stoplazmik membranında çok sayıda PBPs'ye sahiptir. Bu proteinlerin bazıları murein sentezinde, hücre uzamasında ve hücre sertliğinin bakımında önemli rol oynamaktadır (Murphy ve ark., 1981).

C. perfringens'in penisilin ile bağlanan proteinlerinin afinitesi azalmıştır. *C. perfringens*, transfer edilebilen bir plazmit aracılığıyla tetrasiklin, kloramfenikol ve eritromisin-klindamisin direnci göstermiştir. İ n vivo alışmalar *Clostridium* infeksiyonlarının tedavisinde penisilinden daha etkili ilaçlar olduğunu göstermiştir. Klindamisin, metronidazol, rifampin ve tetrasiklin farelerde *C. perfringens*'in neden olduğu patlamış gazlı gangren tedavisinde penisilinden daha etkili bulunmuştur. Protein sentezi inhibitörleri (tetrasiklin, metronidazol, rifampin, klindamisin ve kloramfenikol) hücre duvarına etkiyen ajanlara göre (penisilin) toksin sentezini daha iyi inhibe etmiştir. Penisilin ile kıyaslandığında klindamisin, rifampin ve metronidazolün kombine uygulanması daha hızlı ve üstün bakterisidal etki göstererek toksin üretimini engellemektedir (Stevens ve ark., 1987).

1.4. *Clostridium perfringens* Toksinlerinin zellikleri ve Oluşturduğu Hastalıklar

C. perfringens; alfa, beta, epsilon ve iota major toksinlerinin üretimine göre A, B, C, D ve E tipleri olarak sınıflandırılan infeksiyonlar oluşturmaktadır.

Memelilerde *C. perfringens* major toksinleriyle ilişkilendirilen hastalıklar Çizelge 1.4.'de gösterilmektedir (Rood ve Cole, 1991; Songer ve Miskimins, 2005).

Çizelge 1.4. *C. perfringens*'in neden olduğu hastalıklar (Rood ve Cole, 1991; Rumah ve ark., 2013; Songer ve Miskimins, 2005).

Hastalık tipi	Major letal toksin	Oluşturduğu hastalık
A	Alfa	Gazlı gangren (clostridial miyonekrozis) Gıda zehirlenmesi Nekrotik enteritis (infantlarda) Nekrotik enteritis (kanatlı hayvanlarda) Enterotoksemi (sığır ve kuzularda) Nekrotik enterokolit (domuz yavrularında) Colit (atlarda) Hemorajik gastroenterit (köpeklerde)
B	Alfa Beta Epsilon	İnsanlarda multiple sclerosis Yeni doğan kuzularda dizanteri Yetişkin kuzularda kronik enterit Koyunlarda hemorajik enterotoksemi Keçi ve taylarda enterotoksemi
C	Alfa Beta	Nekrotik enteritis (hayvanlarda) Enteritis nekrotikans: pig bel (insanlarda)
D	Alfa Epsilon	Koyunlarda enterotoksemi (yumuşak böbrek hastalığı)
E	Alfa İota	Tavşanlarda enteritis

Tip A, C ve D insanlar için patojenik olup B, C, D, E ve bazen tip A hayvanlar için patojendir. *C. perfringens* kaynaklı tipik gıda zehirlenmesi vakalarından A ve C tipleri tarafından üretilen enterotoksin sorumludur (Juneja ve ark., 2010).

C. perfringens genellikle gastrointestinal hastalıklara neden olmaktadır. Toksinler bağırsakta üretildikten sonra genel sirkülasyona absorbe olabildiğinden bu infeksiyonlar genellikle enterotoksemi olarak tanımlanmaktadır. *C. perfringens*; enterotoksin, beta 2, teta, kappa, mu gibi minör toksinler de sentezlemektedir (Uzal ve ark., 2010; Uzal ve ark., 2014).

C. perfringens'in temel letal toksini olan alfa toksin tüm izolatlar tarafından sentezlenen multifonksiyonel bir fosfolipaz enzimidir. Eritrosit, lökosit, endotel ve

kas hücrelerinde membran fosfolipitlerinin hidrolizi sonucu parçalanma veya sitotoksositeye neden olmaktadır. Hemolitik, nekrotizan ve potansiyel ölümcül bir toksindir. Beta toksin, evcil hayvanlarda merkezi sinir sistemi ve mukozal nekrozdan sorumlu tutulan tripsine duyarlılığı yüksek bir proteindir. İntestinal mukozanın nekroze olmasını ve inflamasyonunu indüklemektedir. Epsilon toksin, biyolojik aktivitesi tam olarak anlaşılammış olsa da nekrotizan ve ölümcül etkiye sahiptir. İota toksin ise vasküler permeabilityi artırır ve dermonekrotik letal bir toksindir (Songer, 1996).

Gazlı gangrenin patogeneğinde fosfolipaz C (α toksin) ve aktive edilmiş bir hemolizin olan tiyol (Θ toksin veya perfringolizin O) enzimleri etki göstermektedir. Ayrıca kollajenaz (K-toxin), hiyaluronidaz (μ toksin), DNaz (ν toksin) ve nöraminidaz (siyalidaz) enzimlerinin de etkili olduğu görülmektedir. Kuzularda yumuşak böbrek hastalığından epsilon toksin sorumlu olmasına karşın kuzu dizanterisi ve insanlarda oluşan nekrotik enteritis hastalığında beta toksin etkilidir. *C. perfringens*'in neden olduğu gıda zehirlenmelerinden ise sporlanma ile ilişkili proteinlerin oluşturduğu enterotoksinler sorumludur (Rood ve Cole, 1991).

C. perfringens toksinlerinin genel özellikleri ile ilgili bilgiler Çizelge 1.5.'de verilmektedir (Sakurai, 1995; Uzal ve ark., 2010).

Çizelge 1.5. *C. perfringens* toksinlerinin genel özellikleri (Sakurai, 1995; Uzal ve ark., 2010).

	<i>CPA</i>	<i>CPB</i>	<i>ETX</i>	<i>ITX</i>	<i>PFO</i>	<i>CPE</i>	<i>CPB2</i>
Moleküler ağırlık	42,52 kDa	35 kDa	34 kDa	Ia: 47,5 kDa Ib: 71,5 kDa	54 kDa	35 kDa	28 kDa
LD₅₀ (fare)	3 μ g	1,87 μ g/iv; 30-50 μ g/iv	100 μ g	Ia: 620 μ g Ib: 940 μ g	Rapor edilmemiş	50 μ g	0,3 μ g
Biyolojik aktivite	Letal Nekrotik Hemolitik Düz kaslarda kontraksiyon	Dermonekrotik Ödem Enterotoksik Sitotoksik	Letal Dermonekrotik Ödem Düz kaslarda kontraksiyon	Letal Nekrotik	Letal Nekrotik	Eritem Letal Enterotoksik	Dermo nekrotik Ödem Entero toksik Sitotoksik
Termostabilite	Stabil	60°C'de inaktif -80°C'de aktif	Oda sıcaklığında 1 haftadan fazla -20°C'de aylarca -80°C'de yıllarca	Ia. Stabil Ib: Labil	Bilinmiyor	60°C'de inaktif Oda sıcaklığında <1 hafta -20°C'de 1ay Liyofilize olarak yıllarca	Bilinmiyor
Tripsin ile reaksiyon	Duyarlı	Duyarlı	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	Dirençli	Duyarlı

1.4.1. Alfa Toksin

C. perfringens'in tüm suşları alfa toksini kodlayan *cpa* (*plc*) genini bulundurmaktadır. *Cpa*; fosfolipaz C (lesitinaz), sfingomiyelinaz ve letal aktivite özelliklerine sahiptir. *Cpa* geni, bakteriyel kromozomda en stabil yer olan replikasyonun merkezine yakın bölgede yer almaktadır. *Cpa* geninin kromozomal bölgede bulunması plazmitten köken alan diğer major toksin genlerle zıtlık oluşturmaktadır (Canard ve Cole, 1989; Petit ve ark., 1999; Titball ve ark., 1999).

Cpa'nın in vitro transkripsiyonu VR-RNA olarak tanımlanan RNA düzenleyici molekül yoluyla ve VirS/VirR olarak adlandırılan iki düzenleyici sistem bileşeni ile sağlanmaktadır. CPA protein üretimi ve transkripsiyonu Agr quorum sensing sistemi ile açıklanmaktadır. Ancak bu sistem hala açıklığa kavuşturulamamıştır (Uzal ve ark., 2010).

Alfa toksin, 43 kDa moleküler ağırlığında, 370 amino asitten oluşan bir proteindir. Alfa toksinin moleküler yapısı iki temel bölgeden oluşmaktadır. Amino-terminal kısım, Zn iyonlarını içeren fosfolipaz C aktif bölgesini içermektedir. Karboksi-terminal kısım ise ökaryotlarda lipide bağlanan paralok bölgeyi ve kalsiyum bağımlı olarak fosfolipitleri bağlamak için uygun bölgeyi oluşturmaktadır. Toksik olmayan karboksiterminal kısmın immunizasyonu, alfa toksin ve gazlı gangren oluşumuna karşı koruma oluşturmaktadır. Bu polipeptitten aşı olarak yararlanılabilmektedir (Sakurai, 1995; Titball ve ark., 1999).

Saflaştırılmış alfa toksin; fosfatidilkolin ve sfingomiyeline karşı tercihen aktif olan Zn (çinko) içeren ve lesitinaz olarak da bilinen fosfolipaz C enzimidir. Alfa toksin, lesitinaz aktivitesi ile ökaryotik hücre membranı fosfolipitlerini hidrolize ederek hemolitik özellik göstermektedir. Yapılan çalışmalar alfa toksinin gazlı gangren vakalarında en iyi virülens belirleyici olduğunu göstermektedir. Bu toksin insanlarda enterokolitis regionalise neden olan Crohn's hastalığı ve tavuklarda nekrotik enteritis gibi çok farklı hastalıklara neden olabilmektedir. Gazlı gangren

hastalığının patojenitesinde alfa toksinin üç büyük rolü bulunmaktadır. Bunlardan birincisi infekte dokuların içine nötrofillerin ulaşmasını engelleyebilme özelliğidir. İkincisi, infekte dokulara kan akımını azaltan trombosit agregasyonuna ve vazokonstriksiyona neden olabilmesidir. Sonuncusu ise toksinin hasarlı dokuda araşidonik asit ve protein kinaz C tarafından aktive edilen konak hücre metabolizmasını ölümcül olarak modüle edebilmesidir (Titball ve ark., 1999). Eritrositlerin membranında ve birçok hayvan türünün diğer hücrelerinde zedelenmeye neden olmaktadır. Bu etkinin sonucu olarak fosfolipitlerin yapısı bozulmakta ve hücre lizisi oluşmaktadır (Sakurai ve ark., 1993).

PFO ve CPA kombinasyonu *C. perfringens*'in makrofaj fagozomundan çıkmasını ve konak dokuda yaşamını sürdürebilmesini sağlamaktadır (O'Brien ve ark., 2004). Sublitik miktarlardaki CPA lökositlerin migrasyonunu bozmakta veya zayıflatmakta ve lezyonların periferinde lökositozis ile hiperadezyonu içeren farklı mekanizmalarla agregasyonlarını desteklemektedir (Bryant ve Stevens, 1996). İntravasküler agregasyonlar küçük damarlarda kan akımını engelleyerek doku nekrozu ile anoksiye neden olmaktadır. Bu durum *C. perfringens*'in proliferasyonu için uygun ortam (anaerobik ortam) oluşmasına yardımcı olmaktadır (Hickey ve ark., 2008).

Memeli hayvanların intestinal hastalıklarında *cpa*'nın rolü tartışmalı olup, verilerin yetersiz olduğu tespit edilmiştir. *C. perfringens* tip A'nın sarı kuzu hastalığına ve nadiren akut enterotoksemiye neden olduğu tespit edilmiştir. Sarı kuzu hastalığı depresyon, anemi, ikterus ve hemoglobüri ile karakterizedir. Nekropsi bulguları; soluk, gevrek karaciğer ve dalak, idrar kesesinde kırmızı idrar varlığı olarak tespit edilmiştir (McGowan ve ark., 1958). *C. perfringens* tip A sığır, keçi, at ve domuzlarda sıklıkla enteritis ve enterotoksemiden sorumlu tutulmaktadır (Uzal ve ark., 2010). İnfekte sığırların dışkılarında çok sayıda bulunan *cpa* birçok sağlıklı hayvanın da dışkısında bulunmaktadır. Hasta hayvanların dışkısında *cpa* geni tespitinin diagnostik önemi yoktur (Uzal ve ark., 2010).

Gazlı gangren vakalarında *C. perfringens*, yara içerisinden kas dokusuna girip vücut dokusunda çoğalmak üzere ilerleyerek güçlü bir ekzotoksin olan alfa toksin salgılamaktadır. Bu toksin yakın çevresindeki diğer dokuları da yıkımlayarak gaz üretimine neden olmaktadır. Özellikle açlık ve kıtlık yaşanan savaş dönemlerinde, antibiyotik ve cerrahi tedavisi yapılamayan *C. perfringens* ile infekte hastalarda sistemik toksemi, şok ve ölüm vakaları meydana gelmiştir. *C. perfringens* insanlardaki clostridial gazlı gangren vakalarının % 80- 90'ından sorumlu tutulmaktadır (Shimizu ve ark., 2002).

1.4.2. Beta Toksin

Clostridium perfringens beta toksin *cpb* nükleotit sekansı tarafından kodlanmış olup B ve C tipi infeksiyonlara neden olmaktadır. *C. perfringens* beta toksinini kodlayan aminoasit sekansı *S. aureus*'un alfa, gama toksinleri ve lökositini ile % 28 genetik benzerlik göstermektedir. *C. perfringens*'den saflaştırılan beta toksin monomerik ve multimerik formlarda tespit edilmiştir. Monomerik gen ürününün molekül ağırlığı 34 kDa, multimerik formunki ise 118 kDa'dır (Hunter ve ark., 1993).

İnsanlarda nekrotik enteritise neden olan C tipi infeksiyonlar çoğu zaman β toksin ve bazen de delta ve teta toksinlerin de katılımıyla oluşmaktadır. Nekrotik enteritis *C. perfringens* tip C ile kontamine gıdaların tüketimi ve bağırsakta proteolitik enzimlerin düşük seviyede bulunması ile ilişkilendirilmektedir (McLauchlin ve Grant, 2007; Willis ve Smith, 1990).

C. perfringens'in yaklaşık % 15 sekans homolojisine sahip olan beta 1 ve beta 2 olarak tanımlanmış iki adet beta toksini vardır. Beta 1 toksin, *C. perfringens* tip C'nin (tip B'nin de oluşturabildiği) neden olduğu nekrotik enteritis ile ilişkilendirilmektedir. Beta 2 toksin yine *C. perfringens* tip C (beta 1 toksin ile veya olmaksızın) ve bazı *C. perfringens* tip A suşları tarafından oluşturulmaktadır. Gazlı

gangrene neden olan tip A dizileri beta 2 toksin içeren genom sekansına sahiptir. Hem beta 1, hem de beta 2 toksin sitotoksiktir ve deneysel bağırsak loop testinde bağırsak mukozasının hemorajik nekrozisine neden olmuştur (Shimizu ve ark., 2002).

Beta 2 toksin, plazmit kökenli bir gen olup ilk defa Gibert ve ark. (1997) tarafından nekrotik enterokolitisli C tipi *C. perfringens* ile infekte domuzdan elde edilen izolatta yapılan sekans çalışmaları sonrasında klonlanmıştır. *C. perfringens* beta 2 toksin hayvanlarda enterik hastalıklara neden olmaktadır. Beta 2 toksin zayıf sitotoksik aktiviteye sahiptir. Bu nedenle hayvanlardaki klinik önemini anlamak zordur. Enterik hastalığı olan veya olmayan çeşitli hayvan türlerinden *cpb2* pozitif *C. perfringens*'in tespit edilmiş olması doğada *cpb2*'nin oldukça yaygın olduğunu göstermektedir. Birçok araştırmacı infekte ruminant, karnivor, kanatlı hayvan ve balıkların yanı sıra sağlıklı hayvanlarda da *cpb2* varlığını tespit etmiştir. Bu nedenle *cpb2* varlığı risk faktörü olarak dikkate alınmamaktadır. Ancak, sindirim kanalında tripsin aktivitesinin yetersiz olması, antibiyotik ve antiinflamatuvar tedavi ve diyet ile ilgili değişimler gibi predispoze faktörler *cpb2* kaynaklı enteritis veya enterotoksemi oluşumuna neden olabilmektedir (Schotte ve ark., 2004).

İran'da enterik hastalığı olan hayvanlardan elde edilen *C. perfringens* izolatlarının farklı tiplerinde *cpb2* tespiti için single PCR çalışması yapılmıştır. *C. perfringens* tip A, B, C ve D'nin sırasıyla % 54,5 (6/11), % 62 (13/21), % 42,8 (6/14), % 69,3 (9/13) *cpb2* genine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bir diğer ifadeyle 59 *C. perfringens* izolatının 34'ünün (% 56,7) *cpb2* pozitif olduğu bildirilmiştir (Jabbari ve ark., 2012).

1.4.3. Epsilon Toksin

Epsilon toksin, B ve D tipi *C. perfringens* infeksiyonlarına neden olmaktadır. Bu toksin ökaryotik hücrelerin plazma membranı yoluyla heptamerik b-por

oluşturmasıyla karakterizedir. Daha çok koyunlar olmak üzere hayvanlarda ölüme neden olan enterotoksemiden (koyunların yumuşak böbrek hastalığı) sorumlu tutulan oldukça patojen özelliğe sahip bir toksindir. Çeşitli dokularda birikerek perivasküler ödeme neden olmaktadır. Özellikle böbrek ile beyinde ödem ve nekrotik lezyonlar oluşturmaktadır. Epsilon toksin, kan-beyin bariyerini geçebilme özelliği ile enterotoksemide oluşan sinirsel uyarım semptomlarına neden olan glutamatın serbest kalmasını stimüle etmektedir. Hücresel düzeyde hızla şişmeyi takiben nekroza neden olmaktadır. Tüm bu güçlü toksin özelliğine karşın merkezi sinir sistemi veya hedef glutamaterjik nöronları etkileyen ilaçlara araç olarak benzersiz bir özellik göstermektedir (Popoff, 2011).

Epsilon toksin bilinen en güçlü toksinlerden biridir. Bu nedenle öldürücü etkisi botulinum nörotoksinleriyle mukayese edilmiştir. Farelerde intraperitoneal injeksiyon yoluyla yapılan çalışma sonucunda belirlenen letal doz botulinum nörotoksin A için $1,2 \text{ ng/kg}^{-1}$ ve epsilon toksin için 70 ng/kg^{-1} olarak belirlenmiştir (Popoff, 2011).

Nörolojik semptomlara neden olan epsilon toksinin oluşturduğu B ve D tipi *C. perfringens* infeksiyonlarının doğal konakçısı ruminantlardır. Toksin, bağırsaklardan absorbe edildikten sonra kan dolaşımına geçmekte ve kan beyin bariyerinin permeabilitesini artırarak MS benzeri semptomlara (görsel disfonksiyon, inkoordinasyon, spastik paraliz) neden olmaktadır. Bu da epsilon toksinin MS tetikleyicisi olabileceğini göstermektedir (Popoff, 2011).

Rumah ve ark. (2013), klinik muayene ve manyetik rezonans görüntüleme ile multiple sclerosis teşhisi koydukları genç bir kızda epsilon toksin sentezleyen bacillus izole etmişlerdir. Yapılan PCR sonucunda genç kızın alfa, beta ve epsilon gen tarafından kodlanan *C. perfringens* tip B ile infekte olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu insanlarda bildirilen ilk B tipi *C. perfringens* infeksiyonu olarak rapor edilmiştir. Kan beyin bariyerine tropizmi tespit edilen epsilon toksin oligodendrositler ile miyeline bağlanmaktadır. Çalışmada MS hastaları ile

gastrointestinal sisteminde *C. perfringens* toksin tiplerini taşıma durumu kontrol edilmiştir. *C. perfringens* tip A sağlıklı insanlarda yaklaşık olarak % 50, MS hastalarında ise % 23 olarak tespit edilmiştir. MS'li insanlarda ETX ile oluşan immunreaktivitenin sağlıklı insanlardan 10 kat daha yaygın olduğu bildirilmiştir.

1.4.4. İota Toksin

İota toksin, E tipi *C. perfringens* infeksiyonlarına neden olmaktadır. Plazmidal gen tarafından kodlanan major toksinlerden olup letal, dermonekrotik ve sitotoksik aktivite göstermektedir. Ancak iota toksin inaktif formda sentezlenir ve aktif forma geçebilmesi için proteaz ile proteoliz olması gerekmektedir. Olgunlaşmamış toksin proteininin bölünmesi VirS/VirR sistemi tarafından düzenlenen proteazla gerçekleştiği bildirilmiştir (Gibert ve ark., 2000; Sakurai ve ark., 2009).

Clostridium perfringens iota toksini, tek başlarına toksik etki gösteremeyen enzim (Ia) ve bağlama bileşenlerinden (Ib) oluşmaktadır. Ib, hedef hücreler üzerindeki reseptöre bağlanmakta ve Ia NAD⁺ glikohidralaz (NADaz) ve ADP-riboziltransferaz (ARTaz) aktivitesi ile sitozole transloke olarak hücrenin ölümüne neden olmaktadır (Sakurai ve ark., 2009).

1.4.5. Enterotoksin

CPE, polipeptit yapıda, 35 kDa'lık 319 aminoasitten oluşmaktadır. Sitotoksiste ve por oluşumunda önemli olan N- terminal ve reseptör ile bağlanmaya aracılık eden C-terminal alanlardan meydana gelmektedir. Sporulasyon sırasında intrasellüler olarak sentezlendiği bilinmektedir (Labbe, 1989, Uzal ve ark., 2010).

C. perfringens enterotoksini (CPE) memeli hücrelerinin plazma membranı permeabilitesini etkileyerek sitotoksositeye neden olmaktadır. Plazma membranında protein reseptörlerine bağlanan CPE, 70 kDa membran proteini ve 50 kDa membran proteini olarak büyük bir kompleks oluşturmaktadır. Bu yapı sayesinde plazma membranı iyon ve aminoasitler gibi küçük moleküllere karşı geçirgen hale gelmekte ve hücre kolloid ve osmotik dengenin bozulmasıyla hücre ölmektedir (McClane, 1994).

Cpe geni tarafından kodlanan CPE'nin neden olduğu hastalıklar içerisinde *C. perfringens* tip A kaynaklı olanların % 5'den daha az olduğu tespit edilmiştir. CPE'nin neden olduğu sporadik veya antibiyotikle ilişkilendirilen infeksiyonlarda hem plazmit hem de kromozomal genler etkili olmaktadır (McClane, 2007).

Cpe genini kromozom üzerinde taşıyan suşların sıcak, soğuk ve nitrat direnci plazmit üzerinde taşıyanlara göre çok daha fazladır. Bu durum gıda zehirlenmelerinde sıklıkla kromozomal *cpe* izolatlarının tespit edilmesini açıklığa kavuşturmaktadır. Vejetatif veya spor forma sahip *C. perfringens* izolatlarından kromozomal *cpe* geni taşıyanlar plazmidal *cpe* taşıyanlara göre düşük ve yüksek sıcaklıklara yaklaşık altmış kat daha dirençli olup *C. perfringens* tip A gıda zehirlenmelerinden daha sıklıkla izole edilmektedir (Li ve McClane, 2006a; Li ve McClane 2006b; Sarker ve ark., 2000).

Japonya ve Avrupa'da *C. perfringens* kaynaklı gıda zehirlenmelerinde plazmit ile taşınan *cpe* izolatlarının da olduğu rapor edilmiştir. Japonya'da perakende satılan çiğ et ürünlerinde düşük sayıda da olsa % 70 *C. perfringens* kontaminasyonu tespit edilmiş olup bunların % 4'ü *cpe* pozitif izolatlardan oluşmaktadır. *Cpe* pozitif izolatların ise çoğunun, *cpe* genini plazmit üzerinde taşıdığı tespit edilmiştir (Miki ve ark., 2008).

İnsanlarda ishale neden olmuş 223 *cpe* pozitif *C. perfringens* izolatında sıcaklık direnci üzerinde bir çalışma yapılmıştır. *C. perfringens* dizilerinden *cpe*

genini kromozomunda taşıyanlar (*c-cpe*), plazmitleri üzerinde taşıyanlara (*p-cpe*) göre farklı sıcaklık direnci göstermiştir. *C-cpe* dizilerinin temsilcisi olan spor ve vejetatif hücrelerin her ikisi de sıcaklık veya diğer çevresel stres faktörlerine karşı genel olarak daha yüksek direnç göstermiştir. Gıda zehirlenmesinden köken alan 6 izolatta ve sporadik ishal vakalarından köken alan 2 izolatta plazmidal *cpe* geni saptanmıştır. *P-cpe* geni taşıyanlardan birinin spor formu yüksek sıcaklık direnci göstermiş iken 5 tanesinin spor formu sıcaklığa duyarlılık göstermiştir (Grant, 2008).

Sağlıklı insanlar, *cpe+* *C. perfringens* tip A'nın neden olduğu gıda zehirlenmelerinde önemli bir kaynak oluşturmaktadır. Heikinheimo ve ark. (2006), Güney Finlandiya'da gastrointestinal sistem semptomu olmayan sağlıklı 136 gıda işleyicisinden aldıkları dışkı örneklerini PCR ile analiz etmiş ve *cpe* taşıyan *C. perfringens* prevalansını % 18 olarak tespit etmişlerdir.

Kromozomal ve plazmidal *cpe* taşıyan enterotoksijenik *C. perfringens* genetiğinin insan gastrointestinal hastalıklarında ve çevredeki varlığının anlaşılması için birçok çalışma yapılmıştır. A tipi gıda infeksiyonlarında yüksek sıcaklık direncine sahip kromozomal *cpe* geni dışında daha düşük sıcaklık direncine sahip olan plazmidal *cpe* geni de etkili olmaktadır. *P-cpe* ve *c-cpe* izolatlarının her ikisi de perakende satılan gıdalarda, sağlıklı insanların dışkısında ve kanalizasyon gibi çevresel kaynaklarda bulunabilmektedir. Çevresel kaynaklardan izole edilen *cpe* pozitif *C. perfringens* tip A dizilerinin çoğu plazmidal *cpe* geni taşımaktadır. *P-cpe* geni taşıyan suşlar genellikle bağırsakta bulunurken, *C-cpe* suşları daha sıklıkla gıdalarda bulunmaktadır. Farklı direnç özellikleri; horizontal gen transferi, vertikal evrimsel adaptasyon veya çevresel seçim sonucunda oluşmuş olabilmektedir (Miyamoto ve ark., 2012; Xiao ve ark., 2015).

C. perfringens'in 15 farklı gıdadan elde edilen izolatlarına ait sporlarının vakum paketli kıymalarda 12-25 °C'deki farklı muhafaza koşullarında gelişimleri değerlendirilmiştir. Çalışma *c-cpe*, *p-cpe* ve *cpe* negatif enterotoksijenik spor formdaki *C. perfringens* izolatları üzerinde yapılmıştır. Vakum paketli pişmiş ve 12

°C’de muhafaza edilen sığır kıymasına sporlar inokule edilmiştir. *C-cpe* ve *p-cpe* suşlarının *cpe* negatiflere göre daha yavaş gelişim gösterdiği ve 25 °C’de yapılan aynı işlemde önemli bir farklılık oluşmadığı tespit edilmiştir (Xiao ve ark., 2015).

Plazmidal ve kromozomal kodlanan *C. perfringens* enterotoksininin D değeri sırasıyla vejetatif hücrelerde 55 °C’de 5-9 dakika ve 12-16 dakika olup, yine sırasıyla sporlar için 100 °C’de 0,5-1,9 dakika ve 30-124 dakika olarak tespit edilmiştir. Perakende gıdalarda enterotoksin gen içerenlerin çoğu kromozomal kodlanmıştır ve hepsinin sıcaklık direnci fazladır. Gıda ve gıda bileşenlerinden elde edilen izolatlarda artan ısı direnci intrinsik özellikler ile ilişkilendirilmektedir (McLauchlin ve Grant, 2007).

1.5. Gıda Kaynaklı *C. perfringens* İnfeksiyonları

C. perfringens gıda zehirlenmeleri, gıda kaynaklı hastalıkların en sıklıkla bildirilen nedenlerindedir (Labbe, 1989). İnfeksiyon tipik olarak, uygun olmayan sıcaklık koşullarında muhafaza edilen gıdalardaki $>10^6$ canlı vejetatif hücrenin sindirimi sonucu oluşmaktadır (Labbe ve Juneja, 2002).

Vakaların çoğu okul, huzurevi, hastane, restoran, otel, yurt, kantin ve yemekhane gibi toplu yemek yapılan veya sunulan yerlerde görülmektedir. Özellikle pişirme sonrası yavaş soğutulan veya yetersiz olarak tekrar ısıtılan gıdalar sporların vejetatif forma dönüşmesini sağlayarak büyük risk taşımaktadır. Etken proteince zengin olan çiğ kırmızı et, kanatlı eti ve balık olmak üzere birçok gıdada bulunabilmektedir. *C. perfringens*’in gıdalara geçişi başta fekal kontaminasyon olmak üzere su, toz ve toprak aracılığıyla olmaktadır (Brynstad ve Granum, 2002; Immerseel ve ark., 2004).

Gıda kaynaklı infeksiyonların oluşması için belirli sayıda (10^6 - 10^8 kob/g) vejetatif formdaki *C. perfringens*’in gıda ile alınması gerekmektedir. Midenin asit

ortamında canlılığını koruyan etken ince bağırsakların alkali ortamında sporlanarak toksin üretmeye başlamaktadır. Sporların lize olması ile açığa çıkan toksinler 6-24 saat içerisinde gastroenterit ve nekrotik enterite neden olmaktadır. İnsanlarda gıda yoluyla enfeksiyona yol açan *C. perfringens* tipleri A ve C'dir. Bunlardan A tipi, gıda enfeksiyonlarında en sık rastlanılan tiptir. A tipi *C. perfringens* enfeksiyonları abdominal kramp ve diyare gibi minör gastrointestinal semptomlara neden olmaktadır. Hastalık semptomlarını etkileyen en önemli virülens faktör *C. perfringens* enterotoksinidir. Moleküler epidemiyolojik araştırmalar sonucunda *C. perfringens*'ler arasında CPE bulduranların oranı % 0- 5 olarak tespit edilmiştir. C tipi *C. perfringens* enfeksiyonları nadiren tespit edilmesine karşın hastalık semptomları A tipine göre oldukça ciddi seyrederek ve oluşan nekrotik enterit ölümlerine sonuşlanabilmektedir (Czeczulin ve ark., 1996; Erol, 2007).

Amerika ve Avrupa'da gıda kaynaklı enfeksiyonlar arasında *C. perfringens*'in neden olduğu salgınlar ilk sıralarda yer almaktadır. En sıklıkla bildirilen *C. perfringens* enfeksiyonları A tipinden kaynaklanmasına karşın, enfeksiyonun hafif seyirli olması nedeniyle çok sayıda olgunun da rapor edilmediği bildirilmektedir (Beverly ve ark., 2004; Hughes ve ark., 2007).

A tipi *C. perfringens* enfeksiyonlarına neden olan gıdalar çoğunlukla ısıtılma görmüş et içeren ve büyük miktarda hazırlanmış gıdalardır. Gıdalarda bulunan rekabetçi bakteriyel flora ısıtılma sırasında yıkılmışken *C. perfringens* sporları canlılığını korumaktadır. Bu sporlar gıdaların yavaş soğutulması veya uygun olmayan koşullarda muhafazası sırasında vejetatif forma dönüşerek rekabetsiz ortamda sayıca çoğalmaktadır. Enfeksiyonun oluşabilmesi için gıda ile milyonlarca canlı vejetatif *C. perfringens*'in alınması gerekmektedir (Erol, 2007; Gupta, 1998).

Gıda yoluyla alınan çok sayıda vejetatif formdaki *C. perfringens* midenin asidik koşullarında spor forma dönüşmektedir. İnce bağırsakta spor formdaki *C. perfringens*'in spor kesesinin otolizi sonucunda enterotoksinler serbest kalarak açığa çıkmaktadır. Enterotoksin, karın krampları ve ağrıları ile akut ishal gibi tipik

semptomlara neden olmaktadır (Duncan ve ark., 1972). Hastalıktan etkilenen bireylerde kusma ve yüksek ateş belirtilerine genellikle rastlanılmamaktadır. Tipik inkübasyon süresi 8-24 saat olup akut belirtiler genellikle 24 saatten kısa sürmektedir. Tam iyileşme genellikle 24-48 saatlik süre içerisinde gerçekleşmektedir. Sağlıklı bireylerde nadiren ölüme neden olabilmektedir (Labbe ve Juneja, 2002).

C tipi *C. perfringens* tarafından oluşturulan nekrotik enteritis endüstrileşmiş ülkelerde oldukça nadir, az gelişmiş ülkelerde ise sporadik vakalar olarak bildirilmektedir. C tipi infeksiyonların inkübasyon süresi 5-6 saattir. Hastalık ani başlangıçlı abdominal ağrı, kanlı ishal ve kusma belirtileri ile seyretmektedir. Bu durum kusma olmaksızın diyareye neden olan *C. perfringens* tip A'nın oluşturduğu hastalıkla zıtlık oluşturmaktadır. Nekrotik enteritis sırasında jejunum ve ince bağırsağın diğer bölümlerinde oluşan nekrotik yangı tedavi edilmezse mortalite oranı >% 85'e ulaşabilmektedir. Nekrotik enteritis, ilk kez 1946-1948'de II. Dünya Savaşı sonrasında Kuzey Almanya'nın çeşitli şehirlerinde epidemik infeksiyonlar olarak ortaya çıkmıştır. Bu hastalık bağırsağın morfolojik görünümü nedeniyle Darmbrand "bağırsak yangını" olarak isimlendirilmiştir. Literatür verilerine göre daha önce 1918'de altı Rus savaş esirinde ve bir Alman askerinde morfolojik olarak tanımlanmıştır. İnfeksiyon et kılığı olan dönemde insanların yetersiz proteinle beslenmesi sonucu ortaya çıkmıştır. Papua Yeni Gine'de bu hastalık "pig-bel" olarak isimlendirilmekte ve daha sıklıkla tespit edilmektedir. Burdaki popülasyon geleneksel olarak kutlanan şölenlerde az miktarda et tüketmekte ve bunun sonucu olarak kimotripsin sekresyonu düşük miktarda olmaktadır. Ayrıca bu bölgede karbonhidrat kaynağı olarak tatlı patates sıklıkla tüketilmektedir. Tatlı patates yüksek konsantrasyonda tripsin inhibitörü içerdiği için bu hastalığın oluşumu için risk faktörü olarak görev yapmaktadır. Geleneksel olarak kutlanan bu festivallerde *C. perfringens* ile kontamine az pişmiş domuz etinin tatlı patates ile birlikte tüketimi infeksiyonun daha yaygın olarak görülme sebebi olarak açıklanmaktadır. Tripsin ve kimotripsin yokluğu sonucunda ince bağırsakta ve jejunumda *C. perfringens* β toksin aktif olarak varlığını sürdürmektedir. Bir diğer risk faktörü de eş zamanlı olarak *Ascaris lumbricoides* (yuvarlak kurt) infeksiyonunun bulunmasıdır. Bunun nedeni ise

parazitin çok güçlü tripsin inhibitörü salgılamasıdır (Kreft ve ark., 2010; McLauchlin ve Grant, 2007; Shandera ve ark., 1983; Walker, 1985; Willis ve Smith, 1990).

1.5.1. Rezervuarlar ve Epidemiyolojik Veriler

C. perfringens çevrede ubiquiter olarak; toprak, toz, su ve gıdada çığ olarak kullanılan baharat gibi malzemeler ile insan ve hayvanların bağırsak kanallarında bulunmaktadır. Özellikle hayvan orjinli ve protein içerikli çığ gıdalar sıklıkla *C. perfringens* ile kontamine olmaktadır (Saito, 1990).

C. perfringens çığ ve az pişmiş gıdalar ile sebzelerden izole edilmektedir. Etlerde sıklıkla tespit edilmesinin nedeni mezbahada kesim sırasında karkasın dışkı ile kontamine olmasıdır. *C. perfringens* sığır, kanatlı ve domuzların dışkılarından alınan örneklerde sırasıyla % 36, % 80, % 2 oranlarında tespit edilmiştir (Tschirdewahn ve ark., 1991).

İnsan ve hayvanların bağırsak florası dışarıdan gelen karmaşık bakteri popülasyonuna sahiptir. Dışkının her gramında 10^{10} - 10^{11} canlı mikrobiyel flora bulunmaktadır. Örneğin insanların bağırsak florasında 190 tür tespit edilmiştir. İnsanlarda bağırsak kanalının alt kısmında bulunan bakteriler çoğunlukla *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium bifidum*, *Bacteroides* spp., *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp. cinslerinden oluşmaktadır. Bu bakteriler insan bağırsağında çoğunlukla mutualistik olarak bulunmaktadır. Bağırsaktaki mikrobiyel etkileşimler, sindirim kanalı florası ve konak ekosisteminin korunarak düzenlenmesinden sorumludur (Ducluzeau ve Raibaud, 1989; Todar, 2015).

Birçok araştırmacı genel popülasyonda hemolitik olmayan ve ısıya dayanıklı *C. perfringens* suşlarının insidensini % 2-6 olarak rapor etmişlerdir. Sağlıklı hastane personeli ile ailelerinin dışkılarında *C. perfringens* bulunma oranı % 20-30 olarak

tespit edilmiştir. Hastaların 2 hafta sonra etkeni taşıma yüzdesi % 50 veya % 88'den fazla olarak bulunmaktadır (Hailegebreal, 2017).

İnsan bağırsak florasından elde edilen *C. perfringens* izolatlarının % 95'i CPE negatif ve kalanlar CPE pozitif olarak tespit edilmiştir (Orsburn ve ark., 2008).

C. perfringens tip C için tespit edilen rezervuarlar ilgi çekicidir. *C. perfringens* tip C'nin insan ve hayvanların intestinal kanalında obligat parazit olduğu da düşünülmektedir. Papua Yeni Gine'de pig bel infeksiyonundan etkilenen kişilerin dışkılarında *C. perfringens* tip C bulunmasına karşın çevre ile ilişkili izolatlar yalnızca *C. perfringens* tip A olarak rapor edilmiştir. İmmunfloresan analizler, et pişirilen ocakta, toprakta ve etkilenmeyen kişilerin dışkılarında da yaygın olarak *C. perfringens* tip C bulunduğunu göstermiştir. Bu hastalığın oluşumunda fazla miktarda protein tüketimi ile birlikte bağırsaktaki düşük proteinaz etkinliği olduğu bildirilmektedir (McLauchlin ve Grant, 2007).

Sağlıklı sığırların kas dokusunun steril olduğu kabul edilmektedir. Ancak kesim sırasında karkaslar gıda patojenleri ile kontamine olabilmektedir. Bu kontaminasyon; derinin çıkarılması sırasında tüyle, işleme sırasında rumen ve/veya intestinal içerikle, testere, bıçak ve diğer ekipmanlarla karkasın işlenmesi sırasında personelin kontamine el ve giysileri ile teması veya suyun kontaminasyonu sonucunda oluşabilmektedir. Ayrıca, karkastan meme dokusu ayrılırken mastitisli meme ile temas eden bıçak veya personel aracılığıyla da kontaminasyon gerçekleşebilmektedir. Kontaminasyon düzeyi kesimhanedeki hayvanların yüzeyinde veya içindeki patojenlerin varlığı, işleme tesisinin dizaynı, hijyen ve sanitasyon uygulamaları gibi çeşitli durumlara bağlıdır (Troutt ve Osburn, 1997).

Clostridium perfringens, sığırların normal bağırsak florasında bulunmaktadır. Hayvanlarda yaralanma, parazit infeksiyonu, sürü yönetimi değişimleri ve diyet stresi sonucunda bir sağlık problemi haline dönüşen etken toksin üretmeye başlamaktadır (Popoff ve Bouvet, 2009).

C. perfringens'in sağlıklı sığır dışkılarındaki prevalansı % 80 olarak tespit edilmiştir. Bu organizma yüksek protein içeriğine sahip olan sığırın bağırsak kanalında kolaylıkla çoğalabilmektedir. ABD'de süt ve besi sığircılığı diyetlerinde yaygın olarak silaj kullanılmaktadır. *C. perfringens*, silajda bulunan clostridial türler arasında önemli bir yere sahiptir (Troutt ve Osburn, 1997).

Thi ve ark. (2012), 128 diyareli ve 42 sağlıklı sığırda *C. perfringens*'in moleküler tiplendirilmesi ve prevalansının epidemiyolojik surveyini tespit etmek için Vietnam'da çalışma yapmışlardır. Morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre değerlendirilen diyareli sığır dışkılarının 75'inden (% 58,5) ve sağlıklı sığır dışkılarının 15'inden (% 35,7) *C. perfringens* izole edilmiştir. Toksin tiplendirmek üzere multipleks PCR yapılan ishalleri sığırın dışkı izolatlarının tamamında *cpe*, sağlıklı sığırın dışkı izolatlarından 1'inde (% 6,6) *cpb2*, 1'inde (% 6,6) ise *cpe* ve *cpb2* tespit edilmiştir. Sonuç olarak ishalleri sığır izolatlarının % 57,3'ü tip A, % 41,3'ü tip D ve % 1,3'ü tip C, sağlıklı sığırın dışkı örneklerinden elde edilen *C. perfringens* izolatlarının ise tümünün tip A olduğu bildirilmiştir.

CDC verilerine göre ABD'deki *C. perfringens* gastrointestinal hastalıklarında yılda yaklaşık olarak 248 bin kişinin etkilendiği, 41 hospitalizasyon ve 7 ölüm bildirildiği ve bu vakaların tamamında bulaşma kaynağının gıdalar olduğu tespit edilmiştir (Mead ve ark., 1999).

ABD'de *C. perfringens* gıda zehirlenmeleri ile ilgili >1500 vaka değerlendirilmiştir. Vakaların çoğu yiyecek ve içecek servisi yapan büyük ölçekli kurumsal firmalar tarafından kırmızı et veya kanatlı etlerinin hizmet öncesi hatalı sıcaklık zaman uygulamaları ile ilişkilendirilmiştir (Çizelge 1.6.). Bu vakalardan iki tipik salgın örneği şu şekilde gerçekleşmiştir. Mental bir hastanede 170 kişiyi etkileyen diyare salgınında üç kişi ölmüştür. Hastalar kuzu rosto tüketmişlerdir. Rostolar pişirildikten sonra oda sıcaklığında 20 saat muhafaza edilmiş ve soğuk olarak servis edilmiştir. Moleküler analizlerde kuzu etiyle yapılan yemekten, hastaların dışkılarından ve post mortem örneklerden *C. perfringens*'in aynı tipi izole

edilmiştir. Salgında kuzu etinin yanlış sıcaklıkta muhafazası yıkımlanamayan organizmanın gelişimi için zaman kazandırmıştır. Bir diğer salgında halk evinde verilen yemeği takiben 36 kişide diyare vakası bildirilmiştir. Gıda örnekleri mevcut olmamasına karşın altı adet büyük hindi eti tüketildiği tespit edilmiştir. Hindi etlerinin pişirildikten sonra 36 saat buzdolabında muhafaza edildiği ve servis edilmeden önce soslanarak tekrar ısıtıldığı bildirilmiştir. Bu vaka soğutma sisteminin iyi kontrol edilmediği çok yoğun geçen bir Christmas gününde meydana gelmiştir. Bu salgında et ve sos daha çok sorumlu tutulmuştur. Özellikle kırmızı etin kalın rulo olarak hazırlanması, pişirme ve soğutma sırasında *C. perfringens*'in gelişimi için ideal koşulları oluşturmuştur (Brett ve Gilbert, 1997; McLauchlin ve Grant, 2007).

İngiltere'de bir otelde meydana gelen ve 56 kişinin etkilendiği ishal salgınında bir gün öncesinden haşlanmış somon balığı etlerinin ertesi gün oda sıcaklığında muhafaza edildikten bir süre sonra soğuk olarak servis edildiği tespit edilmiştir. Japonya'da yaşlı bakım evinde ıspanak ve soyalı kızarmış peynir tüketiminin ardından 30 ishal vakası bildirilmiştir. Yapılan araştırmalarda bu gıdaların pişirildikten sonra oda sıcaklığında muhafaza edildiği ve ertesi gün tekrar kısa bir ısıtma işleminden sonra servis edildiği tespit edilmiştir. Bir başka salgında okulda milk shake tüketiminin 2-10 saat ardından 77 ishal şikayeti bildirilmiştir. Milk shakein pişirildikten sonra 20 saat oda sıcaklığında bırakıldığı ve daha sonra tüketime sunulduğu tespit edilmiştir. Salgında *C. perfringens* hem süttten hem de dışkıdan izole edilmiştir. Bu vakalarda fazla miktarda hazırlanan gıda veya içeceklerin yavaş soğutulması sırasında içerdiği mikroorganizmaların çoğaldığı saptanmıştır (McLauchlin ve Grant, 2007).

Gıda kaynaklı *C. perfringens* infeksiyonlarının yaygın olmasının nedeni geleneksel pişirme yöntemlerinde etkenin spor formunun sıcaklık direnci ile canlılığını sürdürmeye devam etmesidir. Isıl işlem görmüş gıdaların büyük parçalar halinde soğutulması ve uzun süre oda sıcaklığında veya uygun olmayan koşullarda muhafaza edilmesi sporların hızla germine olmasına neden olmaktadır (Juneja ve ark., 2010). Özellikle gıda ürünlerini yavaş soğutma (% 40,9) *C. perfringens* infeksiyonlarının en sıklıkla bildirilen nedenlerindedir (Angulo ve ark., 1998).

Çizelge 1.6. ABD’de 1976 ve 1996 yılları arasında bildirilen gıda kaynaklı *C. perfringens* vakalarının nedeni ve kaynağı (Brett ve Gilbert, 1997; McLauchlin ve Grant, 2007).

Toplam salgın sayısı	1 566
Salgından etkilenen vaka sayısı	
< 50	% 88,5
50-99	% 8,0
100-299	% 3,1
300-499	% 0,4
Salgınların meydana geldiği yerler	
Kurumlar (hastane, yaşlı bakım evleri, huzur evi, ceza evi, gemi vb)	% 42
Kantinler (kreş, okul, üniversite vb)	% 22
İşletmeler (restoran, hotel, düğün vb)	% 30
Şahıs evi ve diğer	% 6
Sorumlu gıdalar	
Sığır eti	% 37
Domuz eti	% 11
Kuzu eti	% 9
Diğer etler	% 16
Tavuk eti	% 12
Hindi eti	% 10
Ördek eti	% 1
Çorba/ gravy (et suyundan yapılan sos)	% 2
Diğer	% 3
İnfeksiyon oluşumuna katkıda bulunan muhtemel etkenler	
Yetersizlikler	% 9
Çözünme	% 22
Pişirme	% 62
Soğutma	% 49
Tekrar ısıtma	% 69
Çok önceden hazırlama	% 20
Çok büyük miktarda hazırlama	% 4
Arta kalan yiyeceklerin kullanılması	% 3

ABD’deki *C. perfringens* vakalarının çoğu kırmızı et, kanatlı eti ve ürünleri ile ilişkilendirilmektedir. Bu ürünler organizmanın gelişimi için gerekli olan çok sayıda amino asit ve vitaminleri bulundurmaktadır (Labbe ve Juneja, 2002). ABD’de

1973 ve 1980 arasında bildirilen 190 *C. perfringens* kaynaklı enteritis salgınının % 26,8'inde ve 1977-1984'de bildirilen 115 salgının ise % 33,9'unda infeksiyon nedeni olarak pişmiş sığır etleri sorumlu tutulmuştur (Bean ve Griffin, 1990; Bryan, 1988).

Taormina ve ark. (2003), gıda endüstrisi kaynaklarında 445 tam kas kitlesi ile kıyma veya emülsifiye çiğ domuz, sığır ve tavuk eti ürünü ile *C. perfringens* kontaminasyonunu tespit etmek için çalışma yapmışlardır. Kürlenmiş tam kas kitlesi örneklerinin % 1,6'sında vejetatif *C. perfringens* bulunmasına karşın spor form tespit edilememiştir. Kürlenmiş kıyma veya emülsifiye örneklerde % 48,7 vejetatif, % 5,3 ise spor formda *C. perfringens* tespit edilmiştir. Bu çalışmada belirtilen çiğ ürünlerde *C. perfringens* spor form insidensinin oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir.

Wen ve McClane (2004), ABD'de perakende gıda satışı yapılan yerlerde muhafaza edilen çiğ kırmızı et, balık ve kanatlı eti kalemlerinde; tip A infeksiyonlarına neden olan kromozomal *cpe* gen pozitif *C. perfringens*'i % 1,7 olarak tespit ederken, plazmidal *cpe* gen pozitif *C. perfringens* tespit edememişlerdir. Avustralya'da perakende satılan etler üzerinde yapılan bir çalışmada 94 sığır kıymasının hiçbirinde *C. perfringens* bulunamamıştır. Buna karşın parça kuzu etininin 92'sinden 1'inde *C. perfringens* tespit edilmiştir (Phillips ve ark., 2008).

C. perfringens sporları 54 farklı baharat çeşidinin % 80'inden izole edilmiştir. Et ve et ürünlerinde kontamine baharat kullanımı halk sağlığı tehlikesi oluşturabilmektedir (De Boer ve ark., 1985).

Li ve ark. (2007), ABD'de evlerin mutfak yüzeylerinde ve toz-topraklarında *cpe* pozitif *C. perfringens* prevalansını tespit etmek için yaptıkları bir survey çalışmasında mutfak yüzeyleri ve tozun gıda zehirlenmesine neden olan kromozomal *cpe* ile tip A izolatları için önemli bir rezervuar olmadığını bildirmişlerdir.

1.5.2. Tespit için Kullanılan Yöntemler

C. perfringens'i tespit etmek için pek çok yöntem mevcuttur. Bunlar; metabolit tabanlı biyokimyasal (fenotiplendirme/biyotiplendirme) analizler ve toksin tespitinde kullanılan antijen tabanlı immünolojik metotlar ile nükleik asit tabanlı moleküler tekniklerdir. Her yöntemin clostridia ilişkili benzer etkenlere karşı duyarlılık ve ayırt edicilik, analiz kolaylığı, sonuç elde etme zamanı, reaktif, ekipman ve malzeme giderleri gibi avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır (Çizelge 1.7.). ABD Gıda ve İlaç Dairesi Merkezi, Gıda Güvenliği ve Uygulamalı Beslenme ((FDA/CFSAN; U.S. Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition) ve Analitik Bakteriyoloji Kılavuzu (BAM; Bacteriological Analytical Manual) metotları ile gıdalardaki *C. perfringens* tanımlaması ve sayımı reçete edilmiştir. Bu metotlar mikroorganizmanın sülfiti (SO_3^{-2}) sülfide (S^{-2}) indirgeme yeteneği ile TSC (Tryptose-Sulfite-Cycloserine; Triptoz Sülfid Sikloserin) agar üzerinde oluşturdukları siyah demir sülfid (FeS ; Demir II sülfid) çökeltisi üretimine dayanmaktadır. Besiyerine yumurta sarısı emülsiyonu ilavesi ile *C. perfringens* kolonileri lesitinaz aktiviteleri sonucunda etraflarında 2-4 mm opak beyaz alan oluşturmaktadır. Diğer testler iron-milk (demir-süt) mediumda hızlı pıhtılaşma, laktoz jelatin mediumda jelatinin sıvılaşması ile asit ve gaz üretimi ile laktozun fermentasyonu, motilite-nitrat mediumda hareket gözlemlenmemesi ve nitratın (NO_3^-) nitrite (NO_2^-) indirgenmesi ile yapılmaktadır (Harmon ve ark., 1971; Rhodehamel ve Harmon, 1998).

C. perfringens; sirküler, yarı saydam, kenarları pürüzsüz/düzgün, 24 saat inkübasyondan sonra çapı 1-2 mm büyüklükte koloniler oluşturmaktadır. Koloniler nadiren radyal çizgiler ve çentikli bir köşe oluşturur. At kanlı agarda, koloniler çift zonlu hemoliz gösterir. İçteki berrak alan θ toksine bağlı ve dıştaki bulanık alan da α toksine bağlı olarak oluşmaktadır. Aerobik ortamda gelişme göstermeyebilir. Ancak uygun besi yerinde (kanlı agar gibi) anaerobik koşullarda 35-37 °C'de 18-24 saat inkübe edildiğinde identifiye edilebilmektedir. Kimi zaman *C. perfringens* identifikasyonu için Nagler reaksiyonu kullanılmaktadır. Nagler media insan serumu veya yumurta sarısı emülsiyonu içermektedir. *C. perfringens* kolonilerinin etrafındaki yoğun beyaz yanar döner görünüm, spesifik antiserum tarafından inhibe edilen α toksinin varlığını göstermektedir. Nagler petrilerinin yarısı antiserum ile

muamele edildikten sonra şüpheli kolonilerle dik olarak kesişecek şekilde antitoksine doğru çizgilenmesi beklenmektedir. Pozitif reaksiyon, antitoksin ile muamele edilen Nagler petrisi bölgesinde lesitinaz inhibisyonunun görülmesiyle tanımlanmaktadır. İyi kalitede antiserum bulmadaki zorluklar ve alternatif metotların bulunması nedeniyle Nagler reaksiyonu günümüzde nadiren kullanılmaktadır (McLauchlin ve Grant, 2007).

C. perfringens'in hem klinik hem de gıda laboratuvarlarında identifikasyonu için İngiliz ve Avrupa Standart Metotları'na göre nitrat motilite ve laktoz jelatin media kullanılmaktadır. *C. perfringens*, laktoz jelatin agarda laktozu fermente eder (içerdiği renk indikatörü fenol red, asidifikasyon sonucunda sarıya döner) ve jelatin (kollajen) besi yeri 5 °C'de 1 saat soğutulduğunda jelatin sıvılaşır. Nitrat motilite besiyerinde *C. perfringens* hareketsizdir ve nitratı nitrite indirger (McLauchlin ve Grant, 2007).

C. perfringens toksin tiplendirme metotları 1930'larda geliştirilmiştir. Bu metotlar farelerde uygulanan nötralizasyon testlerinde spesifik antitoksinlerin (antiserum) kullanımını içermektedir. Fareler bilinen antitoksinlerle birleşen bağırsak sıvısı içeriğinde sadece bu toksinlerin nötralizasyonu yoluyla korunabilmekte ve hayatta kalabilmektedir. Fare nötralizasyon testinin rutin uygulamalarda kullanımı zaman alıcı, pahalı ve zahmetli olmaktadır. Buna karşın bu testler günümüzde nadiren kullanılmaktadır. Etik sorunlar nedeniyle hayvanların kullanımı azalmış ve dolayısıyla antitoksin kaynağı bulmak zorlaşmıştır. Bu nedenle günümüzde PCR ve hibridizasyon gibi DNA tabanlı teknikler daha sıklıkla kullanılmaktadır (McLauchlin ve Grant, 2007).

Gıdalardan veya dışkı örneklerinden *C. perfringens*'in tespiti için çok sayıda PCR metodu bulunmaktadır. Bu yöntemlerde selektif agarda şüpheli *C. perfringens* izolatlarından DNA örnekleri elde edildikten sonra örneğin alfa toksin gen bölgesini kodlayan spesifik primer çiftlerinin kullanılarak amplifiye edilmesi sağlanmaktadır. Tek gen PCR analizine ilave olarak birden fazla gen hedefini tespit etmek için

multipleks PCR geliştirilmiştir. Multipleks PCR'ın kullanım avantajı *cpa*, *cpb*, *etx*, *iap*, *cpe* ve *cpb2* gibi çok sayıda geni karşılaştırarak aynı anda tespit edebilmektir (Baum ve ark., 2004).

Kantitatif real-time PCR analizi, gıda ve dışkı örneklerinden elde edilen *C. perfringens* izolatlarında spesifik gen hedef bölgesi için DNA amplifikasyon sürecinde florasanlı nükleotit baz etiketleme ve PCR kombinasyonu yoluyla daha hızlı (birkaç saat içinde) tespit ve sayım sağlamaktadır. Real-time PCR analizinin analitik duyarlılık limiti ileal örneklerde 100 *C. perfringens* kob/g, ancak cecal örneklerde tanımlanmayan PCR inhibitörleri nedeniyle 10 000 *C. perfringens* kob/g olarak rapor edilmiştir (Wise ve Siragusa, 2005).

Gıda kaynaklı CPE'nin epidemiyolojik tespitinde DNA tabanlı birçok teknoloji kullanılmaktadır. Baez ve Juneja (1995), çiğ sığır etinden enterotoksijenik *C. perfringens* sayımı için *C. perfringens* tip A enterotoksin gene özgü digoksinin etiketli DNA ile filtre koloni hibridizasyon analizi kullanmıştır. Alkalın fosfataza konjuge olmuş antidigoksinin antikoru ile et örneklerinde *C. perfringens* hücrelerinin fikse edilmiş DNA'sını içeren filtre membrandan hibridizasyon sonrasında nitromavi tatrazolyum klorür ve 5-bromo-4-kloro-3-indol fosfat substratları kullanılarak oluşan mavi çökelti ile görselleştirme gerçekleştirilmiştir. İki gün süren analiz sonucunda 10^6 kob/g bakteri içeren heterojen bakteriyel florada 10 kob/g duyarlılık tespit edilmiştir (Baez ve Juneja, 1995). Baharat ve otlardan elde edilen 380 örnek, dot-blot tekniği ile *C. perfringens* ve enterotoksijenite yönünden analiz edilmiştir. Dot blot yönteminde DNA izole edilip konsantre edildikten sonra denatüre edilmiştir. Bu aşamadan sonra süspansiyon naylon filtreye emdirilmiş ve ısıtılarak tespit edilmiştir. Tanımlanmak istenen *cpe* gen bölgesine eşlenik olan ve belirleyici olarak kullanılan tek iplikli spesifik nükleik asit parçası digoksinin işaretli DNA prob ile birleşerek hibridizasyon tamamlanmıştır. Bu yöntemle doğrulanmış olan 188 *C. perfringens* izolatının % 4,25'inin *cpe* geni içerdiği tespit edilmiştir (Rodriguez ve ark., 1998). Ayrıca dışkı örneklerinden *cpe* pozitif *C. perfringens*'in kolaylaştırılmış izolasyonu ve sayımı için benzer bir metot olan

hidrofobik ızgara mambran filtre koloni hibridizasyon yöntemi de kullanılmaktadır (Heikinheimo ve ark., 2004).

Ekzotoksinlerin protein karakteri, antikorlar tarafından nötralize edilmesi ve çeşitli immünolojik metotlarla tespit edilmesini sağlamaktadır. *C. perfringens*'in serotiplendirmesinde spesifik antiserumlar ile lam aglütinasyon da kullanılmaktadır (Gupta, 1998).

C. perfringens alfa toksin için elektrokimyasal tespit kullanılarak duyarlı çift yönlü ELISA geliştirilmiştir. Tespit limiti, mikrotitre plakaları ve polidispers polimerik mikrobuncukların kullanımına dayanarak sırasıyla 13 ve 67,1 ng/mL olarak bildirilmiştir (Cardosi ve ark., 2005).

C. perfringens tip D epsilon toksin tespiti için poliklonal yakalama enzim bağlı immunosorbent analizi (PC-ELISA), monoklonal yakalama ELISA (MC-ELISA) ve zıt immünelektroforezi (CIEP; counterimmuno-electrophoresis) de içeren bir dizi immünolojik test değerlendirilmiştir. Koyun ve keçilerin vücut sıvısı ve bağırsak içeriğinde epsilon toksini tespit etme yeteneğine ilişkin olarak yapılan çalışmada belirtilen yöntemler arasında PC-ELISA en duyarlı yöntem olarak tespit edilmiştir. Fare nötralizasyon testi de standart olarak kullanılmaktadır. Duyarlılık sonuçlarının aksine spesifiklik sonuçları PC-ELISA (% 31,57), MC-ELISA (% 57,89) ve CIEP (% 84,21) olarak tespit edilmiştir (Uzal ve ark., 2003).

C. perfringens epsilon toksin kaynaklı enterotoksemi tanısı için klinik ve patolojik verilerin birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir. Tip D epsilon toksinin tespiti için dört katmanlı sandviç ELISA geliştirilmiştir. Saf epsilon toksin için duyarlılık limiti 6,25 ng/mL olarak belirlenmiştir (El Idrissi, 1989).

C. perfringens'i moleküler tiplendirmede; ribotiplendirme, plazmit profili çıkarma, PFGE, rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA), büyütülen fragman uzunluğu polimorfizmi (AFLP, Amplified

Fragment Length Polymorphism) ve özellikle son yıllarda MALDI-TOF-MS (Matrix assisted time-of-flight mass spectrometry) teknikleri de kullanılmaktadır (Schalch ve ark., 1999; Ziegler, 2013).

PFGE de *C. perfringens* izolatlarını tiplendirmek için kullanılmaktadır. Elektrik alanının yönündeki değişim ve genomik DNA'nın önceden programlanmış elektroforetik göç sırasındaki akımı çok büyük (>10 Mb) DNA bölümlerinin ayrılmasını sağlamaktadır. DNA agaroz jel elektroforez için standart restriksiyon (kısıtlama) enzim kalıbının aksine DNA bantlama kalıbında ayrımı artırmak için DNA'yı daha az sıklıkla kesen (6-8 bp) restriksiyon enzimi kullanılmıştır. PFGE kullanılarak analiz edilen *C. perfringens* izolatlarının % 8'i subtiplendirmede yetersiz tespit edilmiştir. Bunun nedeni, *C. perfringens* dizilerindeki güçlü nükleazların varlığı olarak açıklanmıştır (Maslanka ve ark., 1999).

C. perfringens PFGE sonuçlarını sınırlayan ekstrasellüler DNaz üretimine ilişkin sorunları çözmek için AFLP analizleri alternatif olabilmektedir. AFLP analizinde bir izolatın tüm DNA'sı restriksiyon enzimi ile sindirilmekte ve sonrasında PCR ile fragmentlerin subsetlerinin amplifikasyonuna olanak sağlayan adaptörler bağlanmaktadır. AFLP analizinde veri toplamaya otomatize edilmiş bilgisayar ve karşılaştırmalar için veritabanı aramasına olanak sağlayan florasan etiketli primerler kullanılarak parmak izi üretimi yapılmaktadır (Vos ve ark., 1995).

AFLP metodu komplementer restriksiyon enzimlerinin kompleks karışımına ihtiyaç duymamaktadır. Hayvansal kaynaklı *C. perfringens* dizileri için Hind III gibi tek restriksiyon enzimi kullanılarak hızlı, ekonomik ve iyi ayırım sağlayan sonuçlar elde edilmektedir. AFLP metodu *C. perfringens* alfa, beta, epsilon, iota, enterotoksin ve beta 2 toksinlerin PCR amplifikasyonuna olanak sağlamaktadır. Bu tekniğin bir dezavantajı aynı hayvanda birden fazla *C. perfringens* biyotipinin olması ve bakteriyofajlar, plazmitler, insersiyon sekansları ve transpozon gibi hareketli genetik elementlere atfedilen aynı AFLP profilinde farklı biyotiplerin olmasıdır (Shinya ve ark., 2006).

Ribotiplendirme farklı dizilerin tanımlanması için araç olarak ribozomal DNA sekanslarının yüksek düzeyde korunan doğasını kullanan bir metottur. Ribotiplendirme gıda kaynaklı zehirlenme vakalarından elde edilen *C. perfringens* izolatlarının genetik ilişkisini belirlemek için kullanılmıştır. Bu kapsamda yapılan bir çalışmada 34 *C. perfringens* izolatına ilişkin 12 farklı ribotip modeli keşfedilmiştir (Schalch ve ark., 1997).

DNA sekanslarının multipleks PCR amplifikasyonu ile *C. perfringens* *ia*, *cpa*, *cpe*, *etxD*, *cpb 1*, *cpb 2* toksin genlerinin microarray ile tespiti sağlanmaktadır. Floresan etiketli DNA izolatının hibridizasyonu ile komplementeri olan tek zincirli DNA bilgisayar chip veya mikroskop slaytlarında *C. perfringens* genlerinin eş zamanlı görüntülenmesi sağlanmaktadır. Bu teknik kullanılarak 17 *C. perfringens* suşunun 16'sı doğru olarak tiplendirilmiştir (Al-Khaldi ve ark., 2004).

Çizelge 1.7. *C. perfringens* tespitinde kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması.

Metot	Tespit limiti	Değerlendirme	Referans
Fare nötralizasyon	6 MLD ₅₀ /mL	Etik değil ve masraflı	Uzal ve ark. (2003)
4 katmanlı ELISA	6,25 ng/mL toksin	Proteoliz	El Idrissi (1989)
Poliklonal yakalama ELISA	0,075 MLD ₅₀ /mL	Yanlış pozitiflik	Uzal ve ark. (2003)
Monoklonal yakalama ELISA	0,75 MLD ₅₀ /mL	Duyarlılık düşük	Uzal ve ark. (2003)
Ters immünelektroforez	200 MLD ₅₀ /mL	Yanlış negatiflik	Uzal ve ark. (2003)
Koloni hibridizasyon	10 kob/g gıda	48 saatte tespit	Baez ve Juneja (1995)
Hidrofobik ızgara membran filtrasyon	10 kob/g gıda	<i>Cpe</i> pozitif izolasyonu	Heikinheimo ve ark. (2004)
Real-time PCR	50 fg genomik DNA	Tanımlanamayan PCR inhibitörleri	Wise ve Siragusa (2005)
Multipleks PCR	Zenginleştirme kültür	Yanlış pozitif	Baum ve ark. (2004)
PFGE	Zenginleştirilmiş örneklerden DNA hazırlanması	Problemlili nükleazlar	Maslanka ve ark. (1999)
Ribotiplendirme	Zenginleştirilmiş örneklerden DNA hazırlanması	Ekipmanlar ve mevcut veritabanları pahalı	Schalch ve ark. (1997)
Oligonükleotit microarray	Zenginleştirilmiş örneklerden DNA hazırlanması	Bir çip üzerinde tek sarmallı DNA'ya hibridize floresan etiketli DNA problemleri	Al-Khaldi ve ark. (2004)

C. perfringens bağırsak florasının bir parçası olduğu için salgınlarda klonal ilişkilerin araştırılması ve bu mikroorganizmanın moleküler epidemiyolojisinin çalışılması için moleküler tiplendirme önemlidir. Serotiplendirme, plazmit izolasyonu, sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforez, PFGE ve ribotiplendirme gibi birçok moleküler yöntem *C. perfringens* dizilerinin ayırımında başarıyla kullanılmaktadır (Schalch ve ark., 1999).

C. perfringens'in içme sularındaki analizi Avrupa ve İngiltere'de yapılması gereken bir parametredir. İçme sularındaki bu analiz membran filtrasyon ve TSC agarda izolasyonu takiben asit fosfataz ile test ederek izolatların doğrulanması ile yapılmaktadır. Bu işlem toplamda 48 saat sürmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda sulardan *C. perfringens*'in sayımı için İngiltere referans ve ISO 14189 yöntemlerinde kullanılan TSC agar medium ile asit fosfataz üretimini test etmek için membran filtre transfer tekniği kullanılarak yöntemde değişiklik yapılmıştır. Yeni triptoz sikloserin agar medium *C. perfringens*'in 18-24 saat içinde izolasyonunu ve doğrulanmasını sağlamakta olup sodyum metabisülfitten arı olmasına karşın geri kazanımı geliştirmek için sodyum pirüvat içeren bir besiyeridir (Watkins ve Sartory, 2015).

Clostridial infeksiyon etkenlerini ve infeksiyona neden olan gıda kaynağını tespit etmek için hızlı ve doğru yöntemlerin kullanılması önemlidir. Klinik örnekler ve gıdalarda *C. perfringens* tespiti için konvensiyonel laboratuvar metotları uzun süreli, kompleks, hayvanların kullanımını içerebilir ve her zaman bilgilendirici olmayabilmektedir. Real-time PCR *C. perfringens* toksin genlerinin hızlı tespit edilmesi için geliştirilmiştir. Real-time PCR, izolatların patojenitesi hakkında bilgi sağlamak, salgın insidens ve araştırmalarını geliştirmek, tanı yöntemlerini geliştirmek için kültür teknikleri ile birlikte kullanılmaktadır. Klostridyal gıda patojenleri için real-time PCR testleri gıda üreticileri için daha hızlı ve etkin olarak değerlendirilmesi gereken, gıda ürünlerinin güvenliğini sağlayan ve gıdaların izlenmesini geliştiren daha hızlı ve değerli bir yöntemdir (Rodríguez-Lázaro, 2013).

Enterotoksin, immün analizler ve PCR ile tespit edilmektedir. İlk kullanılan metotlar; jel difüzyon ve lateks aglütinasyon testleridir. Daha sonra RPLA (reverse passive latex aglütinasyon) ve ELISA testleri kullanılmıştır. Vero hücreleri, RPLA ve ELISA'nın göreceli duyarlılığı 40, 4 ve 4 ng/g dışkıda rapor edilmiştir. RPLA bazı spesifik olmayan reaksiyonlar ve sonuçların okunmasında subjektif değerlendirmeler gerektirdiğinden dezavantaja sahiptir. Enterotoksin tespitinde immün analizler ve PCR benzer duyarlılığa sahiptir (McLauchlin ve Grant, 2007).

1.5.3. Ekonomik Kayıplar

Gıda kaynaklı hastalıklara neden olan 31 patojen 2010 yılında küresel boyutta 33 milyon kişinin hastalanmasına neden olmuştur. Bu infeksiyonlardan etkilenen insanların % 40'ı beş yaşın altındaki çocuklardır. Çocuk ve erişkin ölümlerinin en sık bildirildiği bölgeler Afrika, güneydoğu Asya ve doğu Akdeniz bölgeleridir (Hailegebreal, 2017).

Kesin rakamın hesaplanması zor olmasına karşın tıbbi masraflar, gıda şirketlerinin kayıpları, iş gücü kaybı gibi kalemler ele alındığında her *C. perfringens* vakası için ABD ve Kanada'da yaklaşık olarak 200 \$ harcanmaktadır (Todd, 1989). *C. perfringens* 1993-1997 yılları arasında gıda kaynaklı infeksiyonlara ait toplam salgın maliyetlerinin % 2,1'ini oluşturmuştur (CDC, 2000). Gıda kaynaklı *C. perfringens* infeksiyonlarının çoğu hafif seyretmekte ve rapor edilmemektedir. Buna karşın *C. perfringens* kaynaklı gıda zehirlenmelerinden etkilenen 965 958 kişinin ABD için maliyeti yaklaşık 342 milyon \$ olarak bildirilmiştir (Anon, 2014).

İngiltere popülasyonundaki infeksiyonların büyük bölümü gıdalardan köken almaktadır. Yaklaşık olarak bir milyon kişinin etkilendiği İngiltere'deki gıda kaynaklı infeksiyonlar ülkeye 1,5 milyar £'a mal olmaktadır (Anon, 2015b).

Bir hayvan patojeni olarak ele alındığında *C. perfringens*, küresel tarım sisteminde her yıl yaklaşık olarak 2 milyar dolar ekonomik kayıba neden olmaktadır. Buna ek olarak, tüm dünyada hayvanları *C. perfringens* kaynaklı enterit ve enterotoksemilerden korumak için aşı uygulamaları masrafları da söz konusudur (Uzal ve ark., 2014).

1.5.4. Korunma ve Kontrol

C. perfringens her yerde bulunabildiğinden çevreden elimine etmek mümkün değildir. *C. perfringens*'in sporlanma özelliği ile geniş üreme sıcaklığı spektrumu, gıdalarda yaşama ve çoğalmasını desteklemektedir. Bu nedenle et ve tavuk gibi besin değeri yüksek gıdalarda *C. perfringens* kontaminasyonunu engellemek veya pişirme, soğutma stratejilerini iyi uygulayarak bakterinin gıdada sayıca çoğalmasını engellemek gerekmektedir. Gıda kaynaklı *C. perfringens* infeksiyonlarının önlenmesi için gıdaların pişirilmesini takiben yüksek sıcaklıkta muhafaza edilmesi veya hızla soğutulması gerekmektedir. Gıda ile teması olan personelin sağlık kontrollerinin düzenli olarak yapılması gerekmektedir. Hijyen uygulamaları ile çalışılan alanın dekontamine edilerek ekipman, yüzey ve giysilerin temiz olması sağlanmalıdır (Hailegebreal, 2017).

Ürünlerdeki clostridial sporları kontrol altında tutmak için gıda endüstrisinde geçerli olan güncel stratejiler, rutin sülfite indirgeyen clostridiaların sayıca hesaplanması ve spor inaktivasyonunu gerektirmektedir (Xiao ve ark., 2015).

Spor formları kontrol altına almak için kullanılan en yaygın yöntem sıcaklık uygulamasıdır. En yaygın kullanılan dezenfektan klorin olmasına karşın yalnızca yavaş sporisidal etki göstermektedir ve organik maddelerle inaktive edilebilmektedir. Organik klorinler, kirlilik durumunda ajanlarını salarak daha etkili olabilmektedir. UV ışınlama havada, suda ve yüzeyler üzerinde mikroorganizmaları yıkımladığı için gıda endüstrisinde artan kullanıma sahip olup güçlü UV lambalar ile spor formlar

önemli ölçüde azaltılabilmektedir. Ayrıca çoklu lamba dizileri ile ürün ve paketlerin yüzeyleri sterilize edilebilmektedir (Brown, 2000).

C. perfringens gıda zehirlenmelerinin kontrolü gıdaların soğutma, depolama ve yeniden ısıtma sürecinde sıcaklık ve zaman parametrelerinin yeterli performansta uygulanması ile sağlanmaktadır. Özellikle 15-55 °C riskli sıcaklık aralığındaki gıdalar bakterinin gelişimini minimize etmek için 90 dk içinde soğutulmalıdır. Pişirilmemiş gıdalar vejetatif *C. perfringens* hücrelerini öldürmek için tüketilmeden önce > 70 °C'ye hızla ısıtılmalıdır. Toplu yemek hizmeti sunulan yerlerde çorba, et sosu vb. artan yemekler çok sayıda sporun gelişimini desteklediği için tekrarlanan ısıtma işlemleri yapılmamalıdır. Toplu yemek sunulan yerlerde genel mutfak hijyeni kuralları kapsamında yüzeylerin, giysilerin, alet ve ekipmanın temizlenmesi ve gıda bileşenlerinden toz ve toprak bulaşması önlenmelidir.

C. perfringens'den kaynaklanan infeksiyonlara karşı etkin kontrol stratejilerinin geliştirilebilmesi için, bu mikroorganizmanın nasıl ve hangi aşamalarda gıda zincirine girdiğini ve toksin genlerinin varlığını ve tiplerini belirlemek önem taşımaktadır. Bu kapsamda, sığır karkaslarında *C. perfringens*'in varlığının ve toksin genlerinin DNA bazlı teknikler ile saptanarak moleküler tiplendirilmesi ve antibiyotik duyarlılık profillerinin tespiti gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından önem arz eden veriler sağlamaktadır.

Bu tezin amacı aşağıda maddeler halinde belirtilmektedir:

- i) Kesimhanelerden alınan sığır karkas svap örneklerinde *C. perfringens*'in klasik kültür yöntemi ile izolasyon ve identifikasyonu.
- ii) İzolatların alfa (*cpa*) genlerinin real-time PCR ile tespit edilerek doğrulanması.
- iii) İzolatların beta (*cpb*), beta 2 (*cpb2*), epsilon (*etx*), iota (*iA*) ve enterotoksin (*cpe*) genleri yönünden multipleks PCR ile moleküler tiplendirilmesi.
- iv) *C. perfringens* suşlarının antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Numune ve Örnekleme için Kullanılan Gereçler

Bu çalışma, 4 Aralık 2011 ile 2 Ekim 2012 tarihleri arasında Ankara'daki bir mezbahadan alınan 120 karkasa ait svap örnekleri ile gerçekleştirilmiştir. Mezbahada örnekleme yapılan karkaslar bir süre önce ithalatla getirilen sığırlardan köken almaktadır.

Karkaslar, svap (Citoswab, UK) ile örneklenmiştir. Bu amaçla kuru ve içerisinde 10 mL transport medium (peptonlu su) bulunan ıslatılmış steril svaplar kullanılmıştır.

2.1.2. Klasik Kültür Yöntemi ile İzolasyon ve İdentifikasyon için Kullanılan Gereçler

2.1.2.1. Thioglycollate Medium

Tiyoglikolat besi yeri (Oxoid, CM 0173) anaerob, mikroaerofil ve aerob bakteriler için genel amaçlı olarak kullanılan bir besiyeridir. İndirgen bir madde olan tiyoglikolat, besi yerindeki çözülmüş oksijeni bağlar ve ortamı anaerob hale getirir. Sodyum tiyoglikolat düşük redoks potansiyelini korur, civalı bileşiklerin antibakteriyel etkinliğini nötralize eder.

Bileşimi	g/L
Tripton	15
Glukoz	5,5
Maya ekstraktı	5
Sodyum klorür	2,5
L sistin	0,5
Sodyum tiyoglikolat	0,5
Resazurin	0,001
Agar	0,75
pH	7,1±0.2 @ 25 ° C

Erlen içerisinde 29,75 g tiyoglikolat medium konulduktan sonra üzerine 1 litre distile su ilave edildi. Isıtıcıly manyetik karıştırıcı ile karıştırıldıktan sonra besiyeri süspansiyonu tamamen erimesi için sıcak su banyosuna konuldu. Daha sonra besiyeri, sterilizasyon için 121 °C’de 15 dakika otoklavlandı. Oda sıcaklığında pH 7,1±0,2’ye ayarlandı.

2.1.2.2. *Perfringens* TSC Selective Supplement

Perfringens TSC Selective Supplement (Oxoid, SR 88) refakatçi florayı inhibe ederek *C. perfringens* izolasyonu için seçicilik sağlar.

Vial içeriği	500 mL besiyeri için	1 L besiyeri için
	1 vial	2 vial
D-sikloserin	200 mg	400 mg

Bir vial *Perfringens* Selective Supplement içerisinde 2 mL steril distile su ilave edilerek vortekslendi. Oda sıcaklığına gelen her 1 litre besiyerine 2 vial *Perfringens* Selective Supplement besiyerine ilave edilerek karıştırıldı.

2.1.2.3. Tryptose Sulphite Cycloserine (TSC) Agar

TSC agar (Oxoid, CM 587) bileşimindeki sodyum metabisülfid ve ferrik amonyum sitrat, *C. pefringens*'in sülfid indirgemesinin indikatörü olarak kolonilerin siyah görünmesini sağlar.

Bileşimi	g/L
Triptoz	15
Soya pepton	5
Maya ekstraktı	5
Sodyum metabisülfid	1
Ferrik amonyum sitrat	1
Agar	19
pH	7,6 ± 0,2 @ 25 °C

TSC agardan 23 g tartılarak erlene konuldu. Üzerine 500 mL distile su ilave edilerek manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Daha sonra besiyeri pH değeri 7,6 ± 0,2'ye ayarlandı ve çözünmesi için sıcak su banyosuna konuldu. Besiyeri otoklavda 121 °C'de 10 dakika steril edildikten sonra 50 °C'ye soğutuldu. Daha sonra 1 vial Perfringens Supplement 2 mL steril distile su ile sulandırıldıktan sonra besiyerine ilave edilerek homojen olarak karışması sağlandı. Supplement ilave edilen TSC agar steril koşullar altında önceden hazırlanmış olan petrilere yaklaşık 12-13 mL döküldü. Agar oda sıcaklığında donana kadar bekletildikten sonra +4 °C'de muhafaza edildi.

2.1.2.4. Koyun Kanlı Agar

Hemolitik mikroorganizmaların hemoliz çeşitlerini incelemek için kullanılan bu besiyeri Columbia Blood Agar (Oxoid, CM0331) olarak da bilinir.

Bileşimi	g/L
Pepton	23
Nişasta	1
Sodyum klorür	5
Agar	10
pH	7,3 ± 0,2 @ 25 °C

Besiyerinden 39 g tartılır ve üzerine 1 L distile su ilave edilir. Tamamen çözünmesi için su banyosunda eritilen besiyeri otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilir ve 50 °C'ye soğutulduktan sonra % 5 steril defibrine koyun kanı eklenerek elde edilir. Tezde bu besi yeri hazırlanmış olarak temin edilmiştir.

2.1.2.5. Cooked Meat Medium

Cooked Meat Medium'da (Oxoid, CM 81) *Clostridia* türleri sakkarolitik (eti parçalayamadan asit ve gaz oluşumu, hidrojen sülfid üretebilme) ve proteolitik aktivite (eti parçalayarak kötü kokulu sülfür bileşikleri oluşturma) gösterir.

Bileşimi	g/L
Kalp kası	454
Pepton	10
`Lab-Lemco' tozu	10
Sodyum klorür	5
Glukoz	2
pH	7,2 ± 0,2 @ 25 °C

Kapaklı tüp içerisine yaklaşık 1 g hazır besi yeri konularak üzerine 10 mL distile su ilave edildi. 15 dakika et partiküllerini ıslanana kadar beklendi. Besiyeri 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi.

2.1.2.6. Gram Boyama Gereçleri

Bakterilerin Gram pozitif veya negatif tiplerini ve morfolojik özelliklerini tespit etmek için kullanıldı.

2.1.2.6.1. Kristal Viyole

Gram kristal viyole solüsyonu (Merck, 109218) kullanıldı. Bazik özellikteki kristal moru hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerin mor renge boyanmasını sağlar. Ancak yalnızca Gram pozitif bakterilerin hücre duvarında bulunan teikoik asidin oluşturduğu kalın peptidoglikan yapı (magnezyum ribonükleat, lipid ve karbonhidratlar) ile zor ayrılabilen bileşikler oluşturur. Bu sayede Gram pozitif bakteriler mor olarak tespit edilir.

2.1.2.6.2. İyodin Solüsyonu

Lugol'un iyodini solüsyonu (Merck, 624M) kullanıldı. Kristal viyole ardından lugol ile muamele edilen Gram pozitif bakterilerin boyandığı mor renk kalıcı hale gelir.

2.1.2.6.3. Alkol

Etil alkol (Merck, 100971.2500) % 96 saflıkta Gram boyama işleminde dekolaryasyon için kullanıldı. Kristal viyole ve lugol sonrasında Gram pozitif bakterilerin mor rengi alkol ile giderilirken Gram negatif bakterilerinki dışarı salınır.

2.1.2.6.4. Safranin

Safranin (Merck, 94635) kırmızı renktedir. Alkol ile rengini bırakan Gram negatif bakterilerin yeniden boyanması için kullanıldı.

2.1.2.6.5. İmmersiyon Yağı

İmmersiyon yağı (Merck, 104699.0100) preparatları 100x immersiyon objektifinde değerlendirme aşamasında daha iyi görüntü sağlamak için kullanıldı.

2.1.2.6.6. Işık Mikroskop

Gram boyama tamamlandıktan sonra preparat ışık mikroskobu (Nikon, Alphaphot, Japonya) ile 10x, 40x ve 100x objektifler ile değerlendirildi.

2.1.2.7. Laktoz Jelatin Medium

Laktoz, enerji ve C kaynağıdır. Jelatin; kemik, tendon vb. hayvansal dokulardan elde edilen protein yapısında agar gibi katılaştırıcı özelliği olan bir maddedir. Jelatin, mikroorganizmaların proteolitik aktivitelerini ortaya çıkarmak için kullanılır. Laktoz jelatin medium; mikroorganizmaların laktozu fermentasyonu sonucu asit ve gaz oluşturma, jelatinin jelatinaz aktivitesiyle sınılaşma özelliklerini incelemek için kullanılır.

Bileşimi

Pepton kazein	15 g
Maya ekstraktı	10 g
Laktoz	10 g
Na ₂ HPO ₄	5 g
Jelatin	120 g
Fenol red (% 1)	5 mL
Distile su	1000 mL
pH	7,5 ± 0,2 @ 25 °C

Jelatin hariç diğer bileşenler 1 L distile suda çözündürülerek karışımın pH'sı 7,5± 0,2'ye ayarlandı. Daha sonra su banyosuna konuldu ve sıcaklığı artan karışım içine jelatin yavaşça ilave edilerek jelatinin erimesi sağlandı. Homojen hale gelen bu karışım, kapaklı deney tüplerine 10'ar mL konularak otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edildi.

2.1.2.8. Nitrat Motilite Medium

Nitrat Motilite Medium (Fluka 14305) tüpte hazırlanan yarı-katı bir agardır. Hareketli bakteriler; agar bulanıklık oluşturarak ekim çizgisinin dışına çıkar, hareketsiz olanlar ekim çizgisinde ürer. Besiyerine nitrat reaktifi ve çinko tozu ilave edildiğinde bakterinin nitratı nitrite veya amonyağa indirgeme özelliği tespit edilir.

Bileşimi	g/L
Agar	3
Disodyum hidrojen fosfat	2,5
Galaktoz	5
Jelatin pepton (pankreatik)	5
Et ekstraktı	3
Potasyum nitrat	5

Hazır besiyerinden 23,5 g tartılarak 1 L distile suda çözündürüldü. Karışım üzerine 5 mL gliserin ilave edilip pH değeri ayarlandı ve sıcak su banyosunda eritildi. Daha sonra kapaklı deney tüplerine 11 mL paylaştırılarak otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edildi.

2.1.2.9. Griess Ilosvay Ayraçları

Ayraçlar taze olarak eşit hacimde hazırlanmalıdır. Griess Ilosvay A (% 0,5’lik alfa naftilamin) ve Griess Ilosvay B (% 0,8’lik sülfanilik asit) karışımından oluşur.

2.1.2.9.1. Griess Ilosvay Solüsyonu A

Bileşimi

α -naftilamin	(Merck; 8.22291.0100)	0,5 g/L
Asetik asit (5 M)	(Merck; 1.00366.2500)	100 mL

Bu solüsyonu hazırlamak için α -naftilaminden 0,5 g tartılarak 5 M’lik 100 mL asetik asitte çözündürüldü.

2.1.2.9.2. Griess Ilosvay Solüsyonu B

Bu solüsyonu hazırlamak için sülfanilik asitten 0,8 g tartılarak 5 M’lik 100 mL asetik asitte çözündürüldü.

Bileşimi

Sülfanilik asit	(Merck; 1.00686.0250)	0,8 g/L
Asetik asit (5 M)	(Merck; 1.00366.2500)	100 mL

2.1.2.9.3. Çinko Tozu

Çinko tozu (Merck, 1.08774.1000) nitrat redüksiyon testinde Griess Ilosvay solüsyonları ile reaksiyon gerçekleşmediği durumlarda nitrat varlığını tespit etmek için kullanıldı.

2.1.2.10. Asit Fosfataz Ayracı

Asit fosfataz ayracı hazırlamak için; 1 naftil fosfat sodyum tuzu (Merck; 8.22291.0100), fast blue salt B (Merck;1.03191.0025) ve sodyum sitrat buffer solüsyonları hazırlandı.

Bileşimi

1 Naftil fosfat sodyum tuzu	0,2 g/L
Fast blue salt B	4 g/L

Fast blue salt ve naftil fosfat sodyum tartıldı ve 10 mL, 0,2 M sodyum sitrat buffer içerisinde çözündürülerek pH değeri 4,5'e ayarlandı. 1 saat 4 °C'de bekletildi. Hazırlanan solüsyon 0,20 µm'lik miliporlardan (Sartorius Minisart, Goettingen, Germany) geçirilerek steril edildi. Buzdolabında bir ay kadar muhafaza edildi.

Sodyum sitrat buffer solüsyonu hazırlamak için; trinitrat sodyum (Merck; 1.06448.0500) 9,882 g tartıldı ve 20 mL NaOH'de (1 mol/L) (Merck, 1.06462.1000) çözündürüldü. Daha sonra distile suyla 100 mL'ye tamamlandı. Daha sonra 2:1 oranında 1 M HCl (Merck, 1.00314) ile karıştırıldı. Buzdolabında bir ay kadar muhafaza edildi.

2.1.2.11. Hidrojen Peroksit Solüsyonu

Aerob ve fakültatif anaerob bakterilerin çoğu aerobik solunum sonrasında hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturur. Hidrojen peroksit bakteride toksik etkiye neden olarak katalaz enzimini aktive eder. Katalaz, hidrojen peroksiti su ve oksijen olarak ayrıştırır ve bu toksik etkiyi ortadan kaldırır. Bakterilerin katalaz enzimi varlığını tespit etmek için % 3 veya daha fazla derişimde hidrojen peroksit (H_2O_2) hazırlanmalıdır.

Hazır % 30'luk hidrojen peroksitten (Merck; 1.08597.1) 3 mL alındı ve 27 mL distile su ile karıştırılarak katalaz testinde kullanmak üzere % 3'lük H_2O_2 solüsyonu hazırlandı.

2.1.2.12. Brain Heart Infusion Broth

Brain Heart Infusion Broth (Oxoid, CM 1135), bakterilerin hızla çoğalmasını sağlayan genel besiyerlerindedir.

Bileşimi	g/L
Beyin infüzyonu	12,5
Sığır kalp infüzyonu	5
Proteoz pepton	10
Glukoz	2
Sodyum klorit	5
Disodyum fosfat	2,5
Potasyum nitrat	5
pH	7,4 ±0,2 @ 25 °C

Besiyerinden 37 g tartılarak 1 L distile suda çözüldürüldü ve tüplere 10 mL miktarda dağıtıldı. Tüpler otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edildi. Oda sıcaklığında pH 7,4 ±0,2'ye ayarlandı.

2.1.2.13. Reverse CAMP Test Suşu

Kanlı agarda yapılan Reverse-CAMP testinde oluşan hemolizin değerlendirilmesi için referans mikroorganizma olarak Halk Sağlığı Kurumu'ndan alınan *Streptococcus agalactiae* (Ref. No.: 55118 Inst. Pasteur) suşu kullanıldı.

2.1.2.14. Jar, Anaerojen Kit ve indikatörü ile Parafin

Fakültatif anaerob bir bakteri olan *C. perfringens*'in gelişimi için, jar içerisinde 2,5-3,5 litrelik anaerob ortam sağlayan AnaeroGen (Oxoid AN 025A- AN 035A) kitler ve indikatörü (Oxoid, BR0055) kullanıldı. Ayrıca *C. perfringens* izolatlarının Cooked Meat Medium ve Brain Heart Infüzyon Broth'da anaerob ortamda muhafaza edilmesi için katı halde alınan parafin otoklavlandıktan sonra sıvı haldeyken tüplerin üzerine ilave edilerek kullanıldı.

2.1.2.15. Gliserol

Gliserol (Merck, 104092) DNA ekstraktını -80 °C'de uzun süre muhafaza edebilmek için kullanıldı.

2.1.3. PCR için Kullanılan Gereçler

2.1.3.1. Santrifüj ve Su Banyosu

Santrifüj (Eppendorf, Centrifuge 5417R, Hamburg, Germany) DNA ekstraksiyonu için kullanıldı.

Su banyosu (Memmert WB/OB 7-45, WBU 45, Schwabach, Almanya), besiyeri hazırlama gibi rutin işlerin dışında DNA ekstraksiyonu için de kullanıldı.

2.1.3.2. Nanodrop Spektrofotometre

Nanodrop spektrofotometre (Thermo, ND-1000, Delaware, USA), DNA saflığını ve konsantrasyonunu tespit etmek için kullanıldı. Ayrıca antibiyotik duyarlılık testi öncesinde bakteri yoğunluğunu tespit etmek için de kullanıldı.

2.1.3.3. Real-time PCR Cihazı ve Ekipmanları

Real-time PCR için Light Cycler 2.0 cihazı (Light Cycler 2.0, Roche, Switzerland) kullanıldı. LightCycler Carousel Tabanlı Sistem aşağıdaki ekipmanları içermektedir:

- LightCycler carousel tabanlı sistem (LightCycler 2)
- LightCycler kapiller tüpler
- 2 mL'lik cam reaksiyon tüplerini içine alan rotor (çark) barındıran standart tezgah üstü mikrosantrifüj
- Standart mikrosantrifüj rotorunda kapillerlerin santrifüj cihazına adaptasyonunu sağlayan santrifüj adaptörü

- Nükleaz içermeyen pipet ucu
- Master mix ve dilüsyonları hazırlamak için steril reaksiyon (Eppendorf) tüpü

LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I, LightCycler Carousel tabanlı bir sistemle kombine edildiğinde hot start PCR uygulamaları için ideal sonuçlar elde edilmektedir. Bu şekilde DNA sekans tanımlaması ve kuantifikasyonu çok hassas olarak tespit edilmektedir.

LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I, temel olarak bir miktar DNA veya hedef cDNA'nın tespiti ve amplifikasyonu için kullanılmaktadır. Tez için gerekli analizlere başlamadan önce deneme testi yapıldı.

Deneme Testi Süresi

Prosedür	Zaman
Opsiyonel: Hedef DNA dilüsyonu	5 dk
PCR Düzenlemesi	15 dk
LightCycler Carousel Tabanlı Sistemin Çalışması (Erime Eğrisi Analizi dahil)	45 dk
Toplam analiz süresi	65 dk

LightCycler faststart DNA master sybr green 1'i kullanan bu sistem 4 aşamadan oluşmaktadır.

- 1- Preinkübasyon: FastStart DNA polimerazın aktive olması ve DNA'nın denatürasyonu
- 2- Amplifikasyon: Hedef DNA amplifikasyonu
- 3- Erime Eğrisi Analizi: PCR ürünlerinin tanımlanması veya ampikon analizi
- 4- Soğutma: Rotor ve termal bölmenin soğuması

Aşağıda Çizelge 2.1.'de bu işlemler için programlanması gereken PCR parametreleri ve dikkat edilmesi gereken durumlar verilmektedir.

Çizelge 2.1. Real time PCR parametreleri.

Analiz Modu	Siklus	Bölüm	Hedef Sıcaklık ¹	Bekleme Süresi	Edinme Modu
Preinkübasyon					
Yok	1	95 °C		10 dk ⁴	Yok
Amplifikasyon					
Quantifikasyon	45	Denatürasyon	95 °C	10 s	Yok
		Bağlanma	Primere bağlı ²	0 – 10 s ⁵	Yok
		Uzama	72 °C ³	= (amplikon (bp)/25) s ⁶	Tek
Erime Eğrisi					
Erime Eğrisi	1	Denatürasyon	95 °C	0 s	Yok
		Bağlanma	65 °C	15 s	Yok
		Uzama	95 °C Artış hızı=0.1 °C	0 s	Devamlı
Soğutma					
Yok	1	40 °C		30 s	Yok

¹ Aksi bir düzenleme yapılmadığı sürece cihazın sıcaklık değişim değeri 20 °C/s

² Primer erime sıcaklığı primerin nükleotit içeriğine göre değişmektedir. $T_m = 2 °C (A+T)+4 °C (G+C)$. İlk deneyde hedef sıcaklığı, primer T_m 'sini hesaplanan sıcaklığın 5 °C altına ayarlanır.

³ Primer bağlanma sıcaklığı düşükse (55 °C) sıcaklık artış oranı 2- 5 °C arasında bir değere ayarlanır.

⁴ Preinkübasyon sıcaklığı 10 dk olarak tavsiye edilse de kimi uygulamalarda 5 dk kadar değiştirildiğinde enzimin performansında herhangi bir değişim olmamıştır. Bazı durumlarda erken sikluslarda yüksek polimeraz aktivitesi gerekmektedir. Bunun sonucu olarak preinkübasyon süresi 15 dk'ya uzayabilir.

⁵ Tipik primerler için bağlanma süresi 0-10 s olarak seçilmelidir. Primer bağlanmasının spesifitesini artırmak için inkübasyon süresini <5 s olarak seçilmelidir.

⁶ Daha çok hassasiyet istenen durumlarda hedef quantifikasyon deneyi için bağlanma süresini uzun tutmak avantaj sağlayabilir.

Master miksin hazırlanması aşağıdaki gibidir.

- 1b (yeşil): Reaksiyon Karışımı: Light Cycler Fast Start Reaksiyon Karışımı

SYBR Green I açıldı

- 1a (renksiz): Enzim: 1a santrifüj edildi.

- 1a'dan 10 µL alınarak 1 b'ye aktarıldı. Pipetasyon ile homojenize edildi

(vortekslenmemelidir).

- Yeni oluşan karışım buzda veya soğuk blokta muhafaza edildi.

- Standart reaksiyon 20 µL olacak şekilde hazırlandı.

PCR miksin hazırlanması aşağıdaki gibidir.

- Standart reaksiyon 20 µL olacak şekilde hazırlandı.

- Soğuk blok üzerinde daha önceden soğutulmuş olan santrifüj adaptörlerine kapiller tüpler yerleştirilir.
- PCR primerleri 10X konsantrasyon olarak hazırlandı.
- Her primerden 0,5 µM konsantrasyon olması için 10X konsantrasyondaki solüsyon her primerden 5 µM içermelidir.

2.1.3.4. Thermocycler

Thermocycler (Biometra Personal Cycler, Goettingen, Germany) multipleks PCR analizi için kullanıldı.

2.1.3.5. Taq DNA Polimeraz

Taq DNA polimeraz yaklaşık 85 °C sıcak kaynak sularında yaşayan *Thermus aquaticus* bakterisinden izole edilen ve optimum çalışma sıcaklığı 70-80 °C olan bir enzimdir. Bir ünite; standart deneme koşullarında 10 nmol dNTP'yi 72° C'de 30 dk'da asit çöktürülebilir forma dönüştürecek şekilde kullanmayı tanımlar. Taq DNA polimeraz 5 U/ µL olacak şekilde hazırlandı.

Bileşimi

Taq DNA polimeraz (Promega M3005, Madison, ABD) 500 U

2.1.3.6. PCR Buffer

PCR Buffer (Promega, M8901) stok solüsyonu 10 X konsantrasyonda temin edilmiştir.

2.1.3.7. MgCl₂

dNTP'lerin bağlanması için gerekli olan karışımı sağlayan MgCl₂, DNA polimeraz aktivitesini, primer ve hedef DNA etkileşimini artırmaktadır.

MgCl₂ (Promega, A3511) 25 mM konsantrasyonda temin edilmiştir.

2.1.3.8. dNTPs

Deoksिनुकлеотит trifosfatların (dNTPs, Promega, Madison, ABD) stok solüsyonları 100 mM konsantrasyonda temin edilmiştir.

dATP (Promega, U1205)	100 mM
dCTP (Promega, U1225)	100 mM
dGTP (Promega, U1215)	100 mM
dTTP (Promega, U1235)	100 mM

Yanlış bağlanma hatalarını önlemek için tüm dNTP'ler aynı miktarda kullanılmış ve son konsantrasyonda 10 mM olacak miktarda kullanılmıştır.

2.1.3.9. Primer Çiftleri

Bu tezde, Meer ve Songer (1997) tarafından yapılan çalışmada kullanılan farklı toksin gen bölgelerine özgü olan primer çiftleri kullanılmıştır. Primer çiftleri Dr. Zeydanlı, Ankara aracılığıyla yurtdışından temin edilmiştir (Çizelge 2.2.).

Çizelge 2.2. Primer çiftleri.

Gen	Primer	Primer dizisi (5'- 3')	Büyüklik (bp)	Marka, Ülke
<i>cpa</i>	<i>CPA F</i>	GCTAATGTTACTGCCGTTGA	324	IDT 30040033, USA
	<i>CPA R</i>	CCTCTGATACATCGTGTAAG		IDT 30040031, USA
<i>cpb</i>	<i>CPB F</i>	GCGAATATGCTGAATCATCTA	196	Alpha DNA 452974, USA
	<i>CPB R</i>	GCAGGAACATTAGTATATCTTC		Alpha DNA 452975, USA
<i>cpb2</i>	<i>CPB F</i>	AGATTTTAAATATGATCCTAACC	567	Alpha DNA 452976, USA
	<i>CPB R</i>	CAATACCCTTCACCAAATACTC		Alpha DNA 452977, USA
<i>etx</i>	<i>ETX F</i>	GCGGTGATATCCATCTATTC	655	Alpha DNA 452978, USA
	<i>ETX R</i>	CCACTTACTTGTCTACTAAC		Alpha DNA 452979, USA
<i>iA</i>	<i>IA F</i>	ACTACTCTCAGACAAGACAG	446	Alpha DNA 452980, USA
	<i>IA R</i>	CTTTCCTTCTATTACTATACG		Alpha DNA 452981, USA
<i>cpe</i>	<i>CPE F</i>	GGAGATGGTTGGATATTAGG	233	Alpha DNA 452992, USA
	<i>CPE R</i>	GGACCAGCAGTTGTAGATA		Alpha DNA 452993, USA

2.1.3.10. Pozitif Kontrol Suşları

Pozitif kontrol için *C. perfringens* ATCC 13124 (*cpa* geni), *C. perfringens* ATCC 3626 (*etx* ve *cpb* genleri için), *C. perfringens* NCTC 8239 (*cpa* ve *cpe* genleri için) ve *C. perfringens* CCUG 44727 (*iA* geni için) suşları kullanılmıştır.

2.1.3.11. Negatif Kontrol

Negatif kontrol için steril ultra saf su kullanılmıştır.

2.1.3.12. Mineral Yağ

Mineral yağ (Merck, M5904) PCR tüplerine reaksiyon bileşenleri konulduktan hemen sonra inert yüzey kaplama maddesi olarak PCR reaksiyon tüpünde evaporasyonu minimize etmek için kullanılmıştır.

2.1.3.13. Tris-Borik Asit-EDTA Buffer

Tris-borik asit-EDTA (TBE) solüsyonu, agaroz jelde nükleik asitlerin elektroforezi için elektroforez tankının içine konulan elektrolit sıvısı ve jel hazırlama tamponu olarak kullanılmaktadır. TBE Buffer (Merck, T7527) 10 X konsantrasyonda stok solüsyon olarak bulunmaktadır.

Bileşimi

Tris	107,81 g/L (0,89 M)
Borik asit	55,03 g/L (0,89 M)
EDTA-Na ₂ ·2H ₂ O	7.44 g/L (0,02 M)
pH	8,3±0,2 @ 25 °C

Karışım hazırlanıp pH ayarlandıktan sonra 10X TBE buffer stok solüsyondan 10 mL alınıp 90 mL distile su ilave edilerek 1X TBE solüsyonu hazırlanmıştır.

2.1.3.14. Etidyum Bromit

Etidyum bromit % 1 (AppliChem A1152 GmbH, Darmstadt, Almanya) stok solüsyonu, agaroz jel elektroforezinde nükleik asitleri boyamak için kullanıldı. Etidyum bromit, DNA baz çiftlerinin arasına yerleşerek ultraviyole ışık ile koruyucu bir ekranın arkasından agaroz jele bakıldığında kırmızı-turuncu floresans ışımaya ile DNA tespitini sağlamaktadır. Etidyum bromit % 1 stok solüsyonu 1: 9 oranında seyreltilerek % 0,1 konsantrasyonda kullanıldı.

Bileşimi

Etidyum bromit	10 mg/mL
----------------	----------

2.1.3.15. Agaroz Jel ve Tablası

Agaroz jel (SeaKem LE agarose, Cambrex Bio Science Rockland, ABD) % 1,5'lik konsantrasyonda kullanmak için agar (Oxoid, LP0011) ve 1X TBE kullanıldı.

Bileşimi

Agar	0,9 g
1X TBE	60 mL

Erlen içerisine hazırlanan karışım 95 °C su banyosunda çözündürülerek homojenize edildi ve yaklaşık 50 °C'ye soğutuldu. Karışıma 60 µL etidyum bromit eklendi. Bu karışım, jelde göz odaları oluşturmak için tarakları yerleştirilmiş olan jel tablasına döküldü ve agarın donması beklendi. Agar donduktan sonra taraklar çıkartılarak elektroforez kütetine (MINICELL EC 370 M) yerleştirildi.

2.1.3.16. Bromphenol Blue Loading Dye

Bromphenol Blue Loading Dye (AppliChem, A2331, Darmstad, Almanya), elektroforez sırasında DNA migrasyonunun görsel takibini sağlamak için kullanıldı.

2.1.3.17. DNA Marker

DNA ladder/marker (Corning, Axygen, 95043-578, NY, USA), jel elektroforezde 100 ile 1500 baz çiftindeki çift sarmallı DNA boyutunu belirlemek için kullanıldı.

Bileşimi

DNA Ladder	100 bp
------------	--------

2.1.3.18. Elektroforez Güç Kaynağı

Elektroforez analizlerinde alçak gerilim güç kaynağı (Biometra, Power Pack P25) kullanıldı.

2.1.3.19. UV Transilluminatör

UV Transilluminatör (Syngene, Ingenius, Cambridge, UK), boyanmış PCR ürünlerine ait gen bantlarını UV ışık altında görüntülemek için kullanıldı.

2.1.4. Antibiyotik Duyarlılık için Kullanılan Gereçler

2.1.4.1. Mueller-Hinton Agar

Mueller-Hinton agar (Oxoid, CM337) uluslararası standart prosedürlere göre kullanılan antimikrobiyel duyarlılık testlerinin yapıldığı besiyeridir.

Bileşimi	g/ L
Sığır infüzyonu	300
Kazein hidrolizati	17,5
Nişasta	1,5
Agar	17
pH	7,3 ± 0,1 @25 °C

Hazır besiyeri toz karışımından 38 g tartılarak üzerine 1 L distile su ilave edildi ve çözünmesi için su banyosunda ısıtıldı. Sterilize etmek için 121 °C'de 15 dakika otoklavlandı. Dökme sıcaklığına geldiğinde petrilere dağıtıldı.

2.1.4.2. Antibiyotik Diskler

Antibiyotik duyarlılığı belirlemek için; tetrasiklin (Oxoid, CT 54B, 30 µg), kloramfenikol (Oxoid, CT 13B, 30 µg), gentamisin (Oxoid, CT 794B, 120 µg), ampisilin (Oxoid, CT 3B, 10 µg), trimetoprim (Oxoid, 76B, 5 µg), nalidiksik asit (Oxoid, CT 31B, 30 µg), siprofloksasin (Oxoid, CT 425B, 5 µg), sülfonamid bileşikleri (Oxoid, CT 59B, 300 µg), penisilin G (Oxoid, CT 43B, 10 µg) ve vankomisin (Oxoid, CT58B, 30 µg) antibiyotik diskleri ve bunları değerlendirmede cetvel kullanıldı.

2. 2. Yöntem

2.2.1. Örneklerin Alınması

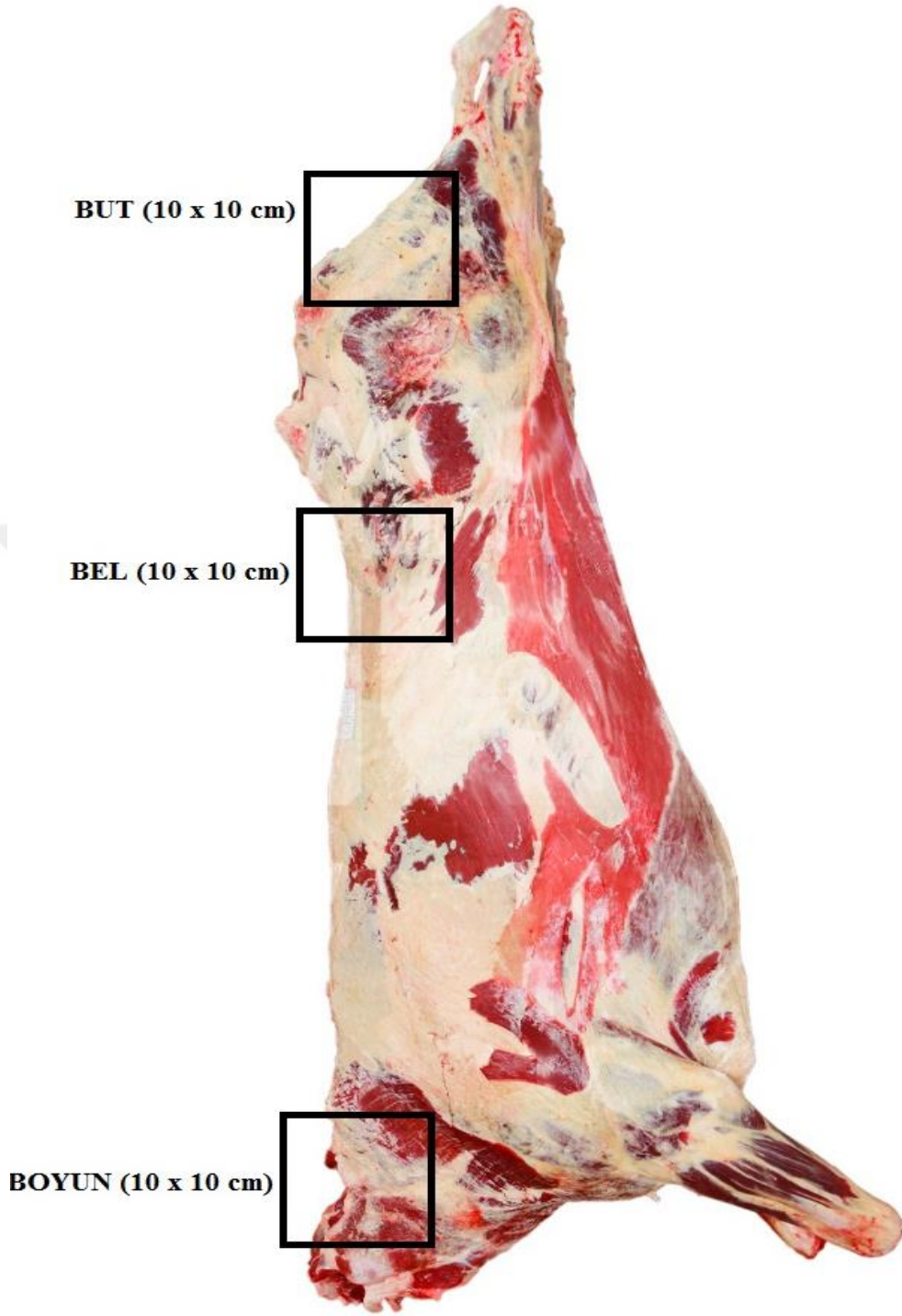
Karkaslar, Smart ve ark. (1979) yaptıkları çalışmalar temel alınarak svap (Citoswab, UK) ile örneklenmiştir. Bu amaçla kuru ve içerisinde 10 mL transport medium (peptonlu su) bulunan ıslatılmış iki çeşit steril svap kullanılmıştır. Örnekler kesim işleminden hemen sonra karkasların boyun, bel ve but bölgesinden, 100'er cm²'lik alanı kapsayacak şekilde; önce ıslak sonra kuru svap yardımıyla alınmıştır (Şekil 2.1.). Karkas örnekleme svapları, soğuk zincir altında laboratuvara getirilerek hemen analize alınmıştır.

2.2.2. *Clostridium perfringens*'in Kültür Tekniği ile İzolasyon ve İdentifikasyonu

C. perfringens'in klasik kültür metoduyla izolasyon ve identifikasyonu Schalch ve ark. (1996)'ın çalışmalarında kullandıkları yöntem ile yapıldı.

2.2.2.1. Zenginleştirme ve İzolasyon

C. perfringens izolasyonu için, örnekler alınmadan önceki gün Thioglycollate Medium (Oxoid, CM 1739) hazırlanarak +4 °C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 2.1. Sığır karkasında svap örneklerinin alındığı bölgeler; boyun (10 x 10 cm), bel (10 x 10 cm) ve but (10 x 10 cm).

Thioglycollate Medium'a kullanılmadan hemen önce Perfringens Selective Supplement (Oxoid, SR 88) ilave edilerek seçici zenginleştirme besiyeri olan Perfringens Enrichment Medium (PEM) hazırlanmıştır.

Karkasların boyun, bel ve but bölgesinden ıslak ve kuru olmak üzere alınan toplam 6 svap bek alevi yanında steril makas yardımıyla kırılarak steril numune poşeti içerisine aktarılmıştır. Svapların aktarıldığı bu numune poşetinin içerisine 10 mL PEM ilave edilmiş ve ağzı ip yardımıyla bağlanmıştır. Anaerob ortamın sürekliliğini sağlamak için numuneler jar içerisine yerleştirildikten sonra üzerlerine anaerojen (Oxoid AN 35) ilave edilmiştir. Kapağı kapatılan jar içindeki örnekler 46 °C'de 20 saat inkübe edilmiştir.

Steril poşetlerde zenginleştirilen svap örneklerinden çizme plak yöntemiyle Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC) (Oxoid, CM 587) agara ekim yapılmış ve anaerob koşullarda (Oxoid, AN 25) yine 46 °C'de 20 saat inkübe edilmiştir. TSC agarda üreyen 2-4 mm çapında siyah renkli etrafında zon oluşturan *C. perfringens* şüpheli kolonilerden 3 veya 5 koloni alınarak yeniden TSC agara ekim yapılmış ve anaerob koşullarda 46 °C'de 20 saat inkübe edilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. TSC agarda *C. perfringens* şüpheli koloniler.

İzole edilen şüpheli kolonilerde *C. perfringens* identifikasyonu için; Gram boyama, katalaz (% 3'lük H₂O₂), reverse-CAMP ve asit fosfataz, laktoz fermentasyonu, jelatinaz üretimi, nitrat indirgeme ve hareketlilik testleri yapılmıştır.

2.2.2.2. Gram Boyama

TSC agarda izole edilen tipik ve atipik siyah kolonilerin her biri için koloniler taze iken Gram boyama yapıldı. Koloniler steril öze ile lam üzerine alınıp steril distile su ile süspanse edilip lama yayıldıktan sonra kuruması için bekletildi. Daha sonra bunzen beki alevi üzerinden birkaç kez geçirilerek tespit edildi. Lam soğuduktan sonra lamın üzeri pastör pipeti yardımıyla kristal viyole ile kaplanarak boyandı ve 30 saniye beklendi. Boya tamamen arındırılıncaya kadar distile su ile nazikçe yıkandı. Lam yine pastör pipeti yardımıyla iyodin solüsyonu ile kaplandı ve 30 saniye beklendi. Ardından distile su ile nazikçe yıkandı. Lam eğik tutularak % 96'lık etil alkol ile yıkandı. Renk açıldığında alkol ile muamele işlemi sonlandırıldı ve yine distile su ile nazikçe yıkandı. Ardından lam safranin ile kaplanarak 30 saniye beklendi ve yine distile su ile yıkandı. Lam kuruduktan sonra mikroskopta incelenerek bakterinin morfolojik ve Gram özelliği tespit edildi. Koyu mor menekşe renkli bakteriler Gram pozitif olarak değerlendirildi.

2.2.2.3. Katalaz Testi

TSC agarda izole edilen *C. perfringens* şüpheli koloniler özeye alınarak temiz bir lam üzerinde, bir damla distile su ile süspanse edildi. Üzerine % 3'lük H₂O₂ damlatılıp karıştırıldı. Karışım içinde oksijenin açığa çıkmasıyla oluşan hava kabarcıkları testin pozitif olduğunu gösterdi. *C. perfringens* katalaz negatif olduğu için lamda kabarcık oluşturmayan koloniler tespit edildi.

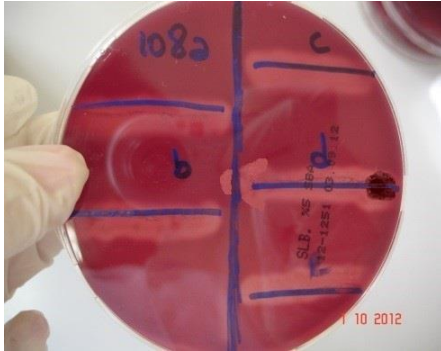
2.2.2.4. Reverse CAMP ve Asit Fosfataz Testi

CAMP faktör üreten β hemolitik *S. agalactia* ve alfa toksin üreten *C. perfringens* arasında sinerjistik hemolitik bir reaksiyon olduğu tespit edilmiştir. Reverse CAMP testi (RCT) olarak tanımlanan bu fenomen *C. perfringens*'i % 97

doğrulukla identifiye etmektedir. Reverse CAMP testinde üç çeşit reaksiyon vardır. *C. perfringens* izolatları RCT +, *C. perfringens* ve bazen diğer clostridialar +/- ve diğer clostridialar - sonuç vermektedir (Hansen ve Elliott, 1980).

Test % 5 koyun kanı içeren hazır besiyeri Columbia Blood agar (Oxoid, CM 0331) ile yapıldı. *S. agalactia*, kanlı agarı ortadan ikiye bölecek şekilde ekildi. *C. perfringens*, *S. agalactia* ile dik açı oluşturacak ve aralarında 1-2 mm mesafe olacak şekilde, birbirlerine paralel ekim yapıldı. Daha sonra kanlı agar 37° C’de 18-24 saat anaerobik ortamda inkübe edildi. *S. agalactia* ve *C. perfringens*’in kesiştiği bölgeyi işaret edecek şekilde oluşan “ok başı” veya “papyon” benzeri görünüm reverse CAMP testinin pozitif olduğunu göstermektedir.

Reverse-CAMP testinin yapıldığı kanlı agarda üreyen *C. perfringens* şüpheli kolonilerin üzerine fosfataz ayırıcından damlatıldı. Birkaç dakika içerisinde kahverengimsi mor renk oluştuğunda asit fosfataz pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. *C. perfringens* şüpheli koloniler ile yapılan Reverse CAMP ve asit fosfataz testi.

2.2.2.5. Laktoz Jelatin Testi

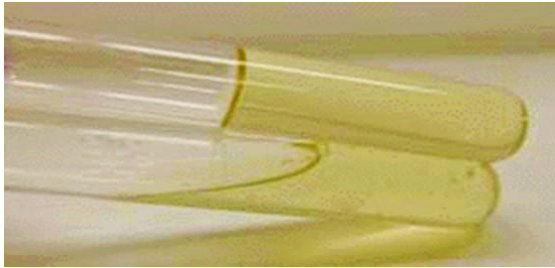
C. perfringens’in laktoz fermentasyonunu ve jelatinaz enzimi varlığını tespit etmek için yapılan bir testtir. Şüpheli koloniler pembe renkli laktoz jelatin besiyeri

içeren tüplere iğne uçlu öze ile dik olarak inokule edilerek 35-37 °C’de 24 saat aerobik ortamda inkübe edildi. Laktoz fermentasyonu; besiyerinin renginin sarıya dönüşerek gaz kabarcıkları oluşturması ile tespit edildi (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. *C. perfringens* şüpheli kolonilerde laktoz fermentasyonu testi.

Jelatinaz aktivitesini değerlendirmek için aynı tüpler +4 °C buzdolabında 1-2 saat bekletildi. Buzdolabında inkübe edilmeden önce katı halde bulunan jelatinin kıvamı kontrol edildi. Jelatinaz pozitif kolonileri içeren tüplerdeki jelatinin parçalanarak sıvı hale geçtiği tespit edildi (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. *C. perfringens* şüpheli kolonilerde jelatinaz aktivitesi testi.

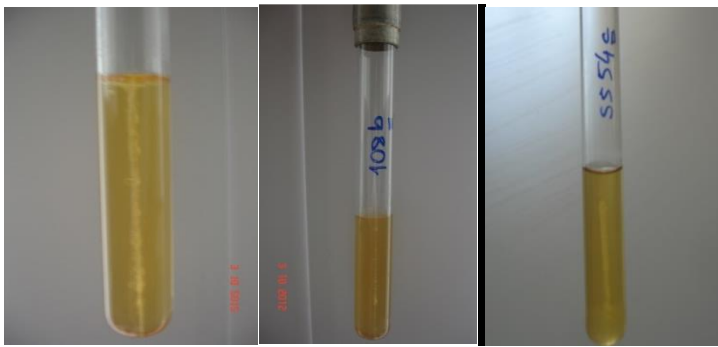
2.2.2.6. Nitrat Motilite Testi

TSC agardan alınan şüpheli koloniler iğne uçlu öze ile, Nitrat Motilite Medium bulunan tüplere dik olarak inokule edilerek 35-37°C’de 24 saat aerobik ortamda inkübe edildi. Yalnızca inokule edilen hat boyunca üreme görüldüğünde

hareket negatif olarak değerlendirildi. Besiyerinde inokule edilen hattın etrafına diffüz ederek gelişme görüldüğünde hareket pozitif olarak değerlendirildi.

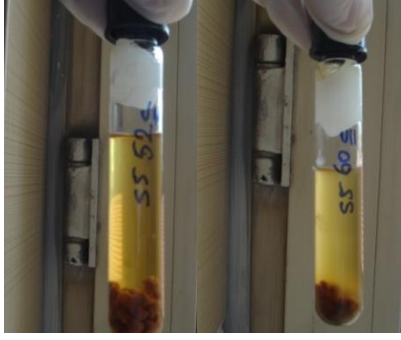
Bakteriler nitratları nitritlere veya daha ileri yıkım ile amonyak, nitrojen gazı ve hidroksilamin gibi maddelere dönüştürebilmektedir. Nitrat redüksiyonu organizmanın oksijeni nitratlardan temin etmek zorunda kaldığını (anaerob solunum) göstermektedir. Nitrat redüksiyonu testi için; nitrat motilite medium besiyerine 0,2 mL Griess Ilosvay A (sülfanilik asit) ve ve 0,2 mL Griess Ilosvay B (α -naftilamin) reaktifleri damlatıldı. Besiyeri ile reaktiflerin temas ettiği alanda kırmızı diazonyum bileşiğinin oluşumu ile nitrat redüksiyonu tespit edildi.

Kırmızı renk oluşmadığında ya nitrat indirgenmemiştir ya da bu reaktiflerin gösteremeyeceği ileri son ürünler meydana gelmiş, yani nitrat tam indirgenmiştir. Bu durumu anlamak için tüpe çinko tozu eklendi. Çinko tozu ilave edildiğinde nitrat nitrite indirgenerek kırmızı renk oluştu. Nitrat redüksiyonu negatif olarak değerlendirildi. Çinko tozu eklendiğinde, kırmızı renk oluşmadığında ortamda nitrat kalmadığı bakteri tarafından yıkımlandığı tespit edildi. Bu durumda test nitrat ve nitrit redüksiyonu için pozitif olarak değerlendirildi.



Şekil 2.6. *C. perfringens* şüpheli kolonilerde motilite ve nitrat redüksiyonu testi.

Biyokimyasal testler sonucunda elde edilen suşlar moleküler tiplendirme yapılmak üzere Cooked Meat Medium (Oxoid CM 81) besiyerinde anaerob koşullarda oda sıcaklığında muhafazaya alınmıştır (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. Cooked Meat Medium besiyerinde anaerobik suş muhafazası.

2.2.3. PCR ile Toksin Genlerin Tespiti

2.2.3.1. DNA Ekstraksiyonu ve Miktar Tayini

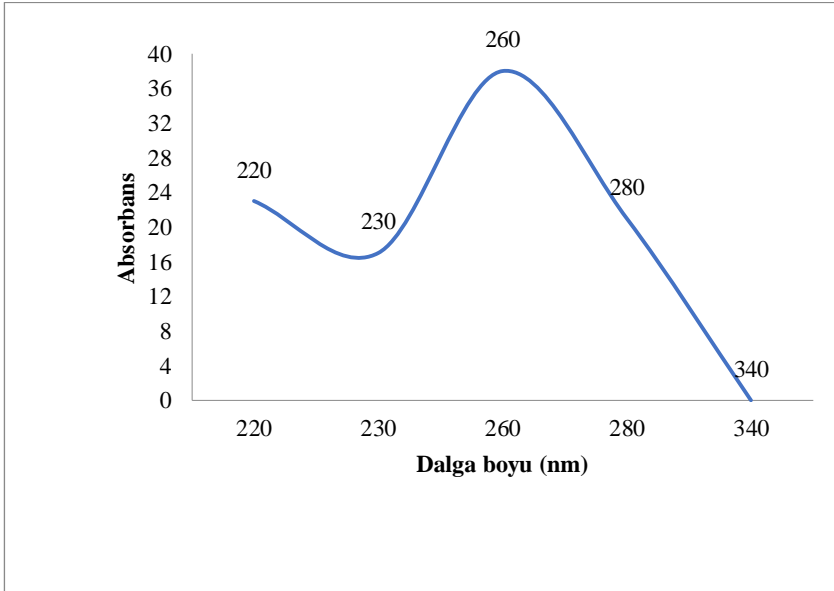
Cooked Meat Medium (CMM) içerisinde muhafaza edilen izolatlarda DNA ekstraksiyonu kaynatma yöntemi ile yapılmıştır. Bu amaçla CMM'de 46 °C'de 24 saat anaerob koşullarda inkübe edilen izolatlardan 1'er mL mikrosantrifüj tüplerine (Eppendorf, Hamburg, Germany) alınarak 12 000 g de 3 dakika 4 °C'de santrifüj (Eppendorf, Centrifuge 5417R, Hamburg, Almanya) edilmiştir. Daha sonra DNA'nın saflaştırılmasını sağlamak için mikrosantrifüj tüplerin üzerindeki süpernatant atılarak peletlerin üzerine 200 µL steril distile su ilave edilmiştir. Bu süspansiyon, bakteri hücrelerinin lize olması için su banyosunda (Memmert WB/OB 7-45, WBU 45, Schwabach, Almanya) 95 °C'de 20 dakika ısıtılmış ve açığa çıkan DNA'nın pelet kısımdan ayrılması için yine 12 000 g de 3 dakika santrifüj edilmiştir (Şekil 2.8.). Elde edilen DNA ekstraktları PCR aşamasına kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir (Erol ve ark., 2008).



Şekil 2.8. DNA ekstraksiyon aşamasında kullanılan santrifüj ve su banyosu.

DNA ekstraksiyonu sonrasında DNA miktar ve saflığını tespit etmek için bir köre (boş örnek: ultra saf su) karşı 260 nm dalga boyunda Nanodrop spektrofotometre (Thermo, ND-1000, Delaware, USA) ile tespit edildi. Proteinler 280 nm dalga boyunda absorbe edildiği için, kontaminant protein varlığı 260 nm ve 280 nm dalga boyunda elde edilen sonuçların oranlanmasıyla tespit edildi. DNA saflığı yaklaşık olarak 1,8 olarak belirlendi (Çizelge 2.3.).

Çizelge 2.3. DNA saflığının nanodrop spektrofotometre ile tespiti.

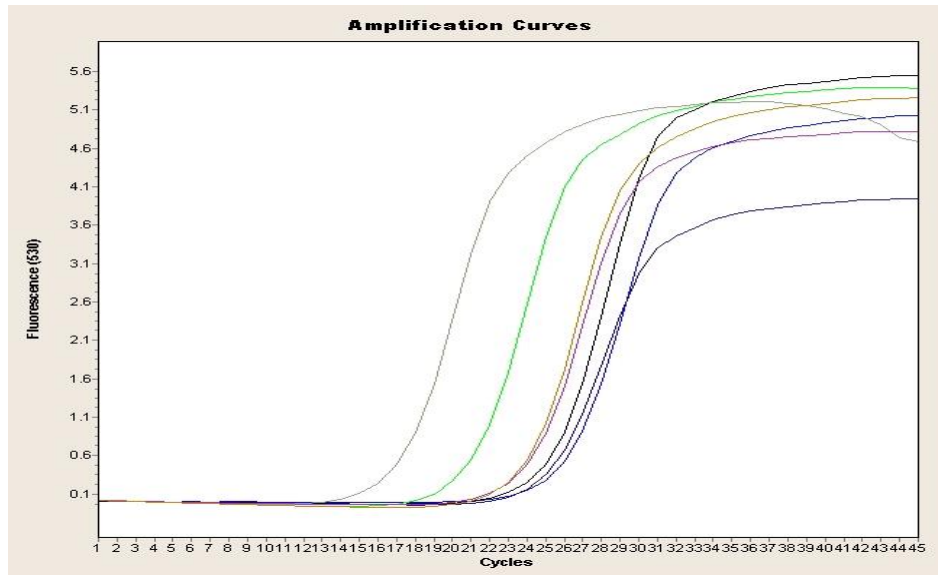


2.2.3.2. Real-time PCR ile *cpa* Geninin Tespiti

İzolatların real-time PCR ile *cpa* geni yönünden doğrulanması için Meer ve Songer'in (1997) belirlediği *cpa* geni primerleri (5'-GCTAATGTTACTGCCGTTGA 3' ve 5'-CCTCTGATACATCGTGTAAG 3') kullanılmıştır.

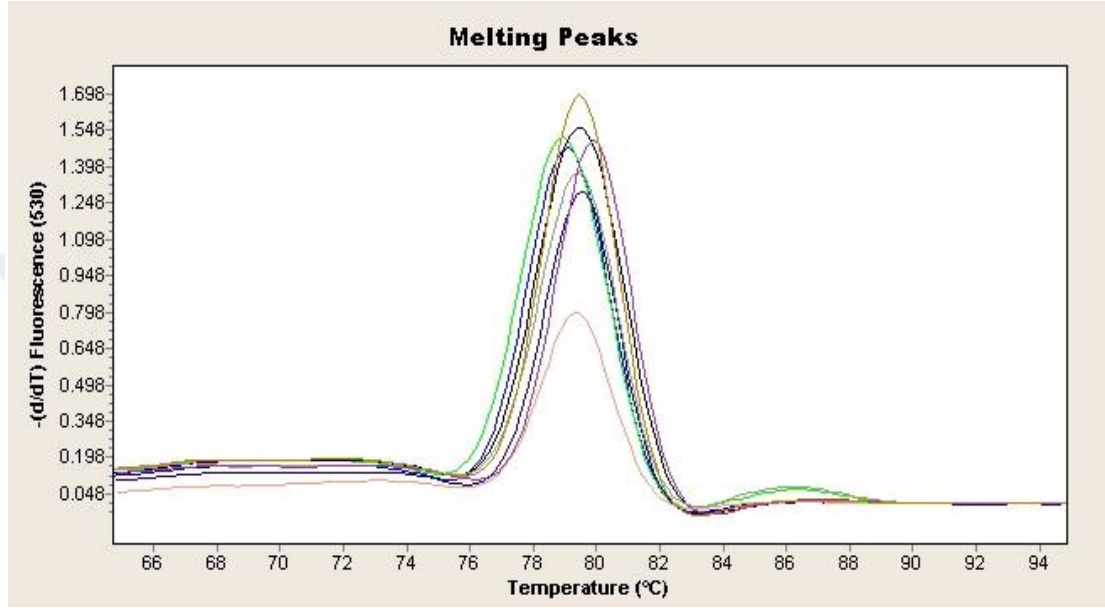
Bu amaçla 20 µL'lik kapiller tüp içerisine 18 µL reaksiyon solüsyonu (10 µL probe master mix, 2,4 µL MgCl₂ (3mM), 3,6 µL ultra saf su, 1 µL F primer ve 1 µL R primer solüsyonu) ile 2 µL DNA ekstraktı konuldu. Negatif kontrol amacıyla DNA yerine 2 µL ultra saf su kullanıldı. Kapiller tüpler uygun metal adaptörleri ile 2 000 rpm'de 15 saniye santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5417R) edildi. Santrifüj sonrasında kapiller tüpler carousel içerisine alınarak real-time PCR işlemi için cihaza (Light Cycler 2.0, Roche, Switzerland) yerleştirildi. Cihazda *C. pefringens cpa* gen tespitine yönelik yapılacak prosedür kaydedildi. Bu aşamada sıcaklık-zaman parametreleri firmanın önerisi doğrultusunda denatürasyon için bir defa 95 °C'de 10 dakika, PCR aşaması için 45 defa tekrar edecek olan 95 °C'de 10 saniye, 55 °C'de 10 saniye, 72 °C'de 20 saniye, cooling aşaması için 40 °C'de 30 saniye olarak tanımlanmıştır. PCR aşaması başladıktan sonra farklı siklularda oluşan pikler ile floresan artışına bağlı olarak oluşan amplifikasyon eğrisi ile *cpa* geni tespit edilmiştir (Çizelge 2.4.).

Çizelge 2.4. Real-time PCR ie *cpa* geni amplifikasyon eğrisi tespiti.

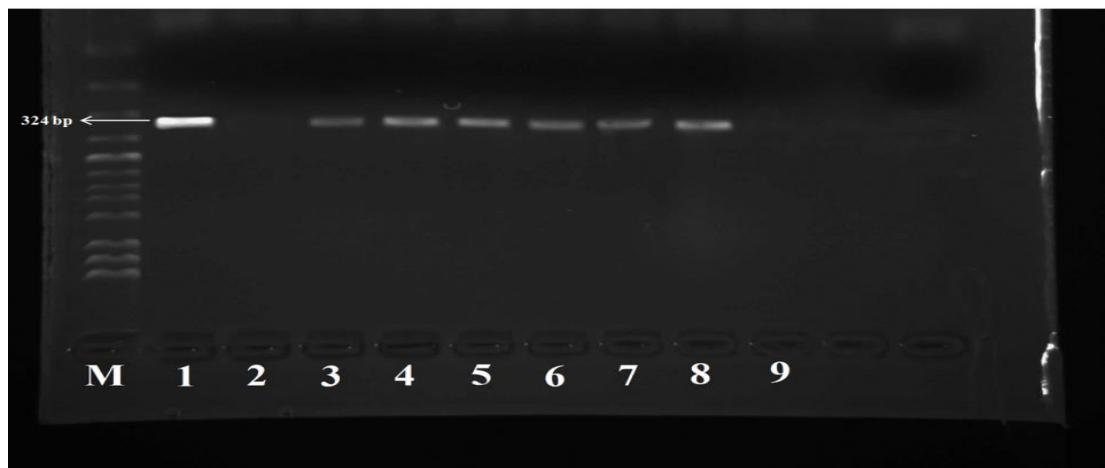


Real-time PCR erime eğrisi analizinde ampliconların yaklaşık 79 °C’de erime göstermesi ile *cpa* genine ait olduğu doğrulandı (Çizelge 2.5.). Analizlere ait sonuçlar LightCycler 4.1 işletim sistemi ile değerlendirildi.

Çizelge 2.5. Real-time PCR sonucu izolatların erime eğrisi analizi.



Cpa gen varlığı tespit edilen izolatlar agaroz jel elektroforezde yeniden görüntülenmiştir (Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. *Cpa* gen bantlarının agaroz jel elektroforezde görüntülenmesi (M: 100 bp DNA marker, 1: Pozitif kontrol (*C. perfringens* ATCC 13124), 2: Negatif kontrol 3-8: *cpa* pozitif *C. perfringens* izolatları).

2.2.3.3. Multipleks PCR ile Toksin Genlerinin Tespiti

Real-time PCR ile *cpa* geni tespit edilen izolatlar diğer toksin genleri yönünden Meer ve Songer'in (1997) kullandığı primer dizilimleri olan *cpb* (5'-GCGAATATGCTGAATCATCTA 3' ve 5'-GCAGGAACATTAGTATATCTTC 3'), *cpb2* (5'-AGATTTTAAATATGATCCTAACC 3' ve 5'-CAATACCCTTCACCAAATACTC 3'), *etx* (5'-GCGGTGATATCCATCTATTC 3' ve 5'-CCACTTACTTGTCTACTAAC 3'), *ia* (5'-ACTACTCTCAGACAAGACAG 3' ve 5'-CTTTCCTTCTATTACTATAACG 3') ve *cpe* (5'-GGAGATGGTTGGATATTAGG 3' ve 5'-GGACCAGCAGTTGTAGATA 3') toksin gen sekanslarına göre multipleks PCR yapılmıştır.

PCR protokolünde kullanılacak master miks toplam hacim 50 µL'de; 1x Reaction buffer (Promega, M8901), 1,5 mmol L⁻¹ MgCl₂ (Promega, M8901), 0,12 mmol L⁻¹ dNTPs (Promega, Madison, USA), 0,34 µmol L⁻¹ *cpe* primer (Dr. Zeydanlı, Ankara), 0,36 µmol L⁻¹ *cpb* primer (Dr. Zeydanlı, Ankara), 0,36 µmol L⁻¹ *cpb2* primer (Dr. Zeydanlı, Ankara), 0,44 µmol L⁻¹ *etx* primer (Dr. Zeydanlı, Ankara), 0,5 µmol L⁻¹ *cpa* primer (Dr. Zeydanlı, Ankara), 0,52 µmol L⁻¹ *iA* primer (Dr. Zeydanlı, Ankara), 5 ünite Taq DNA polimeraz (Dr. Zeydanlı, Ankara) ve 10 µL template DNA içerecek şekilde hazırlanmıştır. Pozitif kontrol olarak *C. perfringens* ATCC 13124 (*cpa* geni), *C. perfringens* ATCC 3626 (*etx* ve *cpb* genleri için), *C. perfringens* NCTC 8239 (*cpa* ve *cpe* genleri için) ve *C. perfringens* CCUG 44727 (*iA* geni için) suşları kullanılmıştır. Negatif kontrol için ise steril distile su ile hazırlanmış master miks kullanılmıştır. Tüm PCR tüplerinin üzerine mineral yağ ilave edilerek reaksiyon karışımının evaporasyonu engellenmiştir (Meer ve Songer, 1997).

Amplifikasyon işlemi, thermocycler (Biometra Personal Cycler, Goettingen, Germany, Şekil 2.9) kullanılarak her siklusta denatürasyon için 94 °C'de 1 dakika, primerlerin bağlanması için 55 °C'de 1 dakika, uzama aşaması için 72 °C'de 1 dakika olmak üzere toplam 35 siklus sonrasında tamamlanmıştır (Erol ve ark., 2008).

Amplikonlar jel elektroforez yöntemi ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ etidyum bromit içeren % 1,5'lik agaroz jel (SeaKem, Rockland ME, USA) hazırlanmıştır. Elektroforez tankı içerisine yerleştirilen agaroz jelin üzerine 1X tris borik asit EDTA (Biorad, München, Germany) solüsyonu ilave edilmiştir. Gen bantlarını değerlendirebilmek amacıyla ilk kuyucuğa 100 baz çifti (bp) ile ilerleyen marker (Corning, Axygen 100 bp DNA ladder, NY, USA) yüklenmiştir. Kalan kuyucuklara ise $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilen amplikondan 10'ar μL alınmış ve steril bir tabla üzerinde $2 \mu\text{L}$ brom fenol mavisi (AppliChem, A2331, Darmstad, Almanya) ile pipete edilerek jelin diğer gözlerine yüklenmiştir. Jelin içine yerleştirilen amplikonların elektroforezi için 1 saat süre ile 1000 mA ve 100 V akım uygulayan alçak gerilim güç kaynağı (Biometra, Power Pack P25, Şekil 2.10) kullanılmıştır. Bu işlem sonunda UV transilluminatör görüntüleme sistemi (Syngene, Ingenius, Cambridge, UK) ile gen bantlarının dökümentasyonu yapılmıştır.

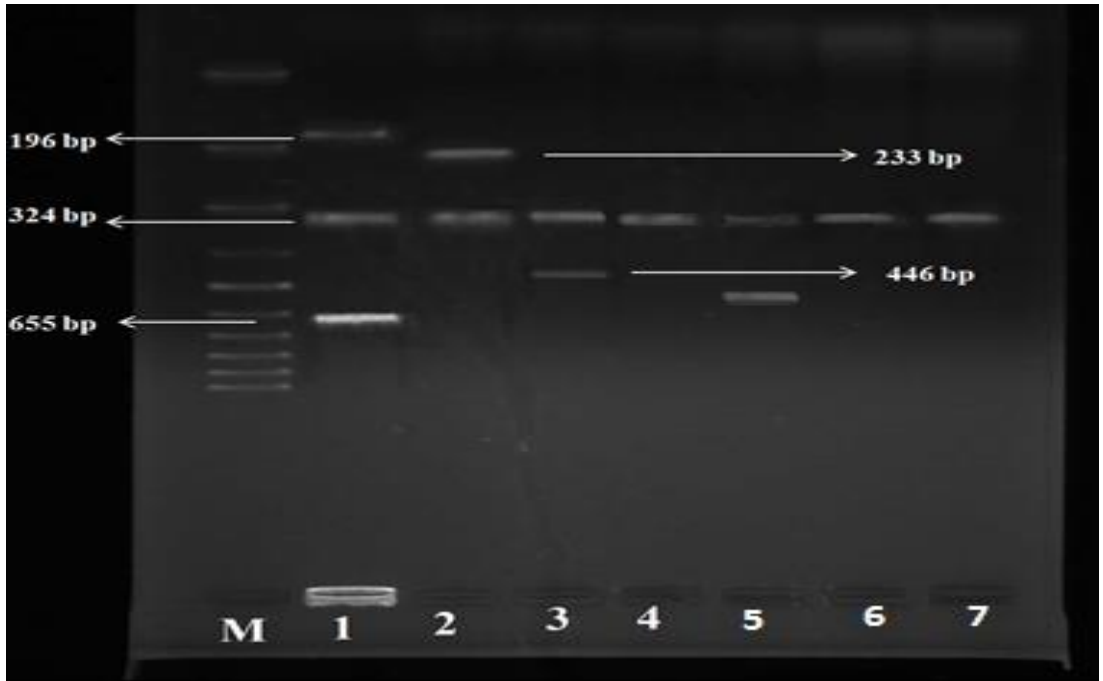


Şekil 2.9. Thermocycler.

C. perfringens toksin genlerinin elektroforez işlemi sonrasındaki jel görüntüsü Şekil 2.11'de gösterilmektedir.



Şekil 2.10. Güç kaynağı ile elektroforez işlemi.



Şekil 2.11. Multipleks PCR sonucu *C. perfringens* toksin genlerinin agaroz jel elektroforezde oluşan görüntüleri (M: 100 bp DNA marker, 1: *C. perfringens* ATCC 3626 (*etx* ve *cpb*), 2: *C. perfringens* NCTC 8239 (*cpe*), 3: *C. perfringens* CCUG 44727 (*iA* geni için), 4: *C. perfringens* ATCC 13124 (*cpa*), 5: *cpb2* pozitif numune, 6 ve 7: *cpa* pozitif numune).

2.2.4. Antibiyotik Duyarlılık

C. perfringens izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bu işlem için CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) tarafından bildirilen yöntem esas alınmıştır. Cooked Meat Medium'da anaerob koşullarda muhafaza edilen izolatlar Brain Heart Infusion broth (BHI) (Oxoid, CM 225) içerisine inokule edilmiştir. BHI broh, üzeri parafinle kapatılarak 16-18 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Bakteri yoğunluğu BaSO₄ süspansiyonu kullanılarak 0,5 McFarland'a ayarlanmış ve nanodropspektrofotometre ile 625 nm dalga boyunda absorbans (optik dansite) 0,08-0,10 olacak şekilde kontrol edilmiştir.

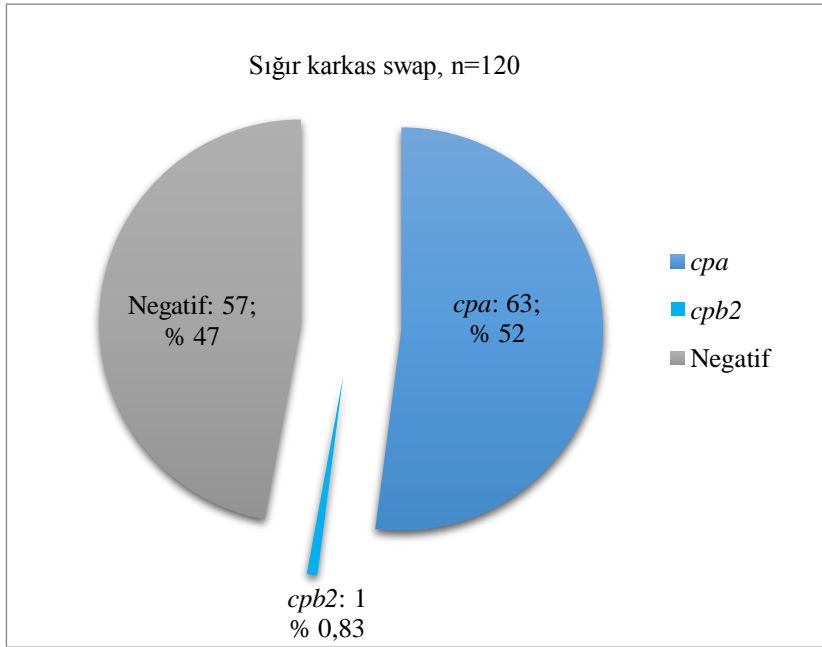
Daha sonra BHI'dan steril svaplar yardımıyla Mueller-Hinton agara (Oxoid, CM 337) tekniğine uygun sürülerek ekim yapılmıştır. Bu amaçla izolatları barındıran BHI'dan svap alınıp plak her defasında 60 derece döndürülerek petrinin her yerine sürülerek inokulasyon tamamlanmıştır. Antibiyotik emdirilmiş diskler plağa yerleştirilmeden önce inokule edilen bakteri süspansiyonunun absorbe olması için 5-10 dakika beklenmiştir. Daha sonra, merkezleri arasında 24 mm uzaklık ve her plağa en fazla 10 tane olacak şekilde tetrasiklin (Oxoid, CT 54B, 30 µg), kloramfenikol (Oxoid, CT 13B, 30 µg), gentamisin (Oxoid, CT 794B, 120 µg), ampisilin (Oxoid, CT 3B, 10 µg), trimetoprim (Oxoid, 76B, 5 µg), nalidiksik asit (Oxoid, CT 31B, 30 µg), siprofloksasin (Oxoid, CT 425B, 5 µg), sülfonamid bileşikleri (Oxoid, CT 59B, 300 µg), penisilin G (Oxoid, CT 43B, 10 µg) ve vankomisin (Oxoid, CT58B, 30 µg) diskleri agar üzerine yerleştirilmiş, 16 ile 18 saat anaerobik ortamda inkübasyondan sonra etraflarında oluşan zonlar cetvel ile ölçülerek değerlendirilmiştir (CLSI, 2003; Prescott, 2002; Watkins ve ark., 1997).



Şekil 2.12. Mueller Hinton agarda disk difüzyon antibiyotik duyarlılık değerlendirme.

3. BULGULAR

Örneklenen 120 sığır karkasının 63'ünden (% 52,5) *C. perfringens* izole ve tanımlanmıştır. Klasik yöntemle 183 izolat elde edilmiştir. Bu suşlar *C. perfringens*'i tanımlayan *cpa* gen varlığı yönünden real-time PCR ile analiz edilmiş ve 127 izolatta *cpa* tespit edilmiştir. Multipleks PCR'da 127 izolatın yalnızca 1 tanesinde (% 0,78) *cpa* ve *cpb2* geni tespit edilmiş olup diğer toksin genlerinin bulunmadığı saptanmıştır. Sığır karkaslarında *C. perfringens* % 52,5 ve beta 2 toksin geni % 0,83 olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Sığır karkaslarında *C. perfringens* ve toksin gen varlığı.

İzolatların antibiyotik direnç profilleri disk difüzyon yöntemi ile tespit edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.1. ve Şekil 3.2.'de gösterilmiştir.

Karkas örneklerinin 62'sinde Penisilin (P) disk zonu yaklaşık olarak 26-36 mm çapında, 60'ında Ampisilin (Amp) disk zonu 26-44 mm çapında, 63'ünde

Vankomisin (Va) disk zonu 18-28 mm çapında tespit edilmiş ve çoğu izolatin bu antibiyotiklere duyarlı olduğu bulunmuştur.

Çizelge 3.1. Sığır karkaslarında *C. perfringens*'in antibiyotik duyarlılığı

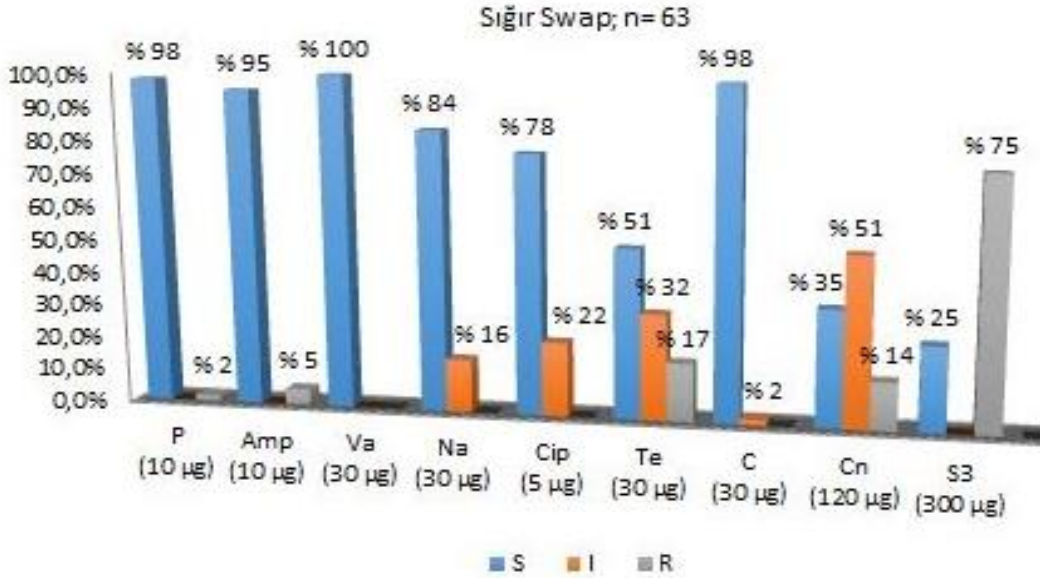
Antibiyotik etki mekanizması	Hücre duvarı inhibisyonu			Nükleik asit sentezi inhibisyonu		Protein sentezi inhibisyonu			Antimetabolik etki
	P (10 µg)	Amp (10 µg)	Va (30 µg)	Na (30 µg)	Cip (5 µg)	Te (30 µg)	C (30 µg)	Cn (120 µg)	
S	62 (% 98)	60 (% 95)	63 (% 100)	53 (% 84)	49 (%78)	32 (% 51)	62 (% 98)	22 (% 35)	16 (% 25)
I	-	-	-	10 (% 16)	14 (% 22)	20 (% 32)	1 (% 2)	32 (% 51)	-
R	1 (% 2)	3 (% 5)	-	-	-	11 (% 17)	-	9 (% 14)	47 (% 75)

Pozitif örnek sayısı sayısı n=63

*S= Duyarlı, *I= Orta derecede dirençli, *R= Dirençli

P: Penisilin, Amp: Ampisilin, Va: Vankomisin, Na: Nalidiksik asit, Cip: Siprofloksasin
Te: Tetrasiklin, C: Kloramfenikol, Cn: Gentamisin, S3: Sülfonamid

Şekil 3.2. Sığır karkaslarında *C. perfringens*'in antibiyotik duyarlılığı



Örneklerden 1'i Penisiline, 3 tanesi de Ampisiline dirençli olarak tespit edilmiştir. Nalidiksik asit (Na) disk zonu 53 örnekte 20-28 mm çapında okunarak bu örneklerin duyarlı olduğu, 10 örnekte 14-18 mm çapında okunarak orta-derecede

dirençli olduğu bulunmuştur. Siprofloksasin (Cip) disk zonu 49 örnekte 22-28 mm çapında okunmuş ve duyarlı, 14 örnekte 18-20 mm çapında okunarak orta-derecede dirençli bulunmuştur. Tetrasiklin (Te) disk zonu 32 örnekte 20-38 mm çapında tespit edilerek duyarlı, 20 örnekte 16-18 mm çapında tespit edilerek orta-derecede dirençli, 11 örnekte 8-14 mm çapında tespit edilerek dirençli olduğu bulunmuştur. Kloramfenikol (C) disk zonu 62 örnekte 22-32 mm çapında tespit edilerek yalnızca 1 örneğin kloramfenikole orta derece duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Gentamisin (Cn) disk zonu 22 örnekte 16-20 mm çapında tespit edilerek duyarlı, 32 örnekte yaklaşık 14 mm çapında tespit edilerek orta-derece dirençli, 9 örnekte 10-12 mm çapında tespit edilerek dirençli olduğu bulunmuştur. Sülfonamid (S3) disk zonu 16 örnek için 18-34 mm çapında tespit edilerek örneklerin duyarlı, 47 örnek için 8-12 mm çapında tespit edilerek örneklerin dirençli olduğu bulunmuştur..

4. TARTIŞMA

Sığır karkaslarında *C. perfringens* kontaminasyon düzeyini belirlemek amacıyla Ankara'da bir mezbahada gerçekleşen bu çalışmada kesim aşamasından hemen sonra 120 sığır karkasının bel, but ve boyun bölgelerinden svap ile örnekleme yapılmıştır. Klasik kültür tekniği ile 183 izolat elde edilmiştir. Real time PCR ile 127 izolatanın *cpa* geni saptanmış ve *C. perfringens* olarak tanımlanmıştır. Multipleks PCR'da yalnızca 1 izolatta *cpa* ve *cpb2* (127:1, % 0,78) geni tespit edilmiştir. Bu kapsamda 120 sığır karkas örneğinin 63'ünde (% 52,5) ve toplam 127 izolatta *C. perfringens* identifiye edilmiştir.

Ülkemizde sığır karkaslarında *C. perfringens* tespitine ilişkin herhangi bir çalışma bulunmamasına karşın yurt dışında sınırlı sayıda ve daha düşük oranlarda veriler bulunmaktadır. Smart ve ark. (1979) sığır, domuz ve koyun karkaslarında *C. perfringens* insidensini sırasıyla % 29, % 66, % 35 olarak tespit etmiştir. Begun (1984), Pakistan'da et satışı yapan marketlerde rastgele seçtiği 300 sığır ve 300 koyun karkasının iç ve dış yüzeylerinden steril forseps ve makas ile aldıkları örneklerde *C. perfringens* insidensini sığırlarda % 13,3 ve koyunlarda % 21,6 olarak tespit etmiştir. Begun *C. perfringens* izolatlarının tamamını karkas dış yüzeyinden aldığı örneklerde tespit ettiğini bildirmiş olup mezbahalarda kesim sırası ve sonrası hijyen eksikliğine dikkat çekmiştir. Sheridan ve ark. (1996) sığır karkaslarının yüzeyinden yaptıkları örnekleme 45,1 kob/cm² *C. perfringens* tespit etmiştir. Chae ve ark. (2006) sığır karkaslarından aldıkları 925 örneğin 30'unda (% 3,2) *C. perfringens* izole etmişlerdir. Hosseinzadeh ve ark. (2018) mezbahada 100 sığır ve 100 koyun karkasında svap metoduyla sırasıyla 90 ve 70 şüpheli koloni elde etmiştir. PCR ile şüpheli izolatları sığırda % 40 ve koyunda % 35,7 *C. perfringens* olarak tespit etmiştir. Veriler arasındaki değişkenliğin kesmimhane hijyenik koşulları ve analiz metot farklılığından oluşmuş olabileceği düşünülmektedir.

Türkiye’de perakende satılan çiğ ve tüketime hazır etlerde *C. perfringens*’in prevalansına yönelik mezbahada elde edilen verilerle uyum sağlayan birçok rapor bulunmaktadır. Sancak ve ark. (1993) Van’da kasap ve marketlerden aldıkları 200 kıyma örneğinin % 42’sinin *C. perfringens* ile kontamine olduğunu bildirmiştir. Ankara’da Çakmak (2001) sığır eti örneklerinin % 65’inde, Tekinşen ve ark. (2001) çiğ kıyma örneklerinin % 35’inde *C. perfringens* saptamışlardır. Tekirdağ’da Kayışoğlu ve ark. (2003) döner satılan 5 farklı fast food satış yerinde toplamda 60 çiğ ve pişmiş döner etinde yaptıkları çalışmada *C. perfringens* kontaminasyonunu çiğ döner etinde % 80, pişmiş tavuk döner etinde % 60 ve pişmiş sığır döner etinde % 40 olarak tespit etmişlerdir. Sarıgüzel ve Erol (2005) hindi kıyması örneklerinin % 58’inde, Çakmak ve ark. (2006) tavuk kıyması örneklerinin % 70’inde *C. perfringens* tespit etmişlerdir. Kamber ve ark. (2007) Kars’ta market ve kasaplardan topladıkları 96 sığır kıyması örneğinin 31’inde (% 32) *Clostridium* spp. ve bunların 17’sinde (% 18) *C. perfringens* tespit etmişlerdir. Güran ve Öksüztepe (2013), 200 çiğ tavuk etinin 154 (% 77)’ünün *C. perfringens* ile kontamine olduğunu tespit etmişlerdir. Yine Güran ve ark. (2014) 50 sığır eti örneğinin 48 (% 96)’inin ve 50 koyun eti örneğinin 44 (% 88)’ünün *C. perfringens* ile yüksek oranda kontamine olduğunu bildirmişlerdir. Pamuk ve Çelikeloğlu (2014) Afyon’da kasap ve satış yerlerinden alınan 50 sığır kıyması örneğinin 34’ünün (% 68), 50 tavuk kıyması örneğinin 27’sinin (% 54) *C. perfringens* ile kontamine olduğunu bildirmiştir. Aras ve Hadımlı (2015) Konya’da kasap ve marketlerden alınan 100 sığır, 100 tavuk ve 100 hindi eti örneğinde *C. perfringens*’i sırasıyla % 40, % 31 ve % 24 olarak saptamışlardır. Hanifehnezhad ve ark. (2015) Ankara’da 90 yenilebilir broiler sakatatında *C. perfringens* insidenisini % 32,2 olarak rapor etmiştir. Örnekleme esas olan 45 kalp-karaciğerde 21 (% 46,7) ve 45 taşlıkta 8 (% 17,7) *C. perfringens* kontaminasyonu tespit edilmiştir.

Yurt dışında et ve ürünlerine ilişkin yüksek oranda *C. perfringens* tespit edilen veriler bulunmaktadır. Hall ve Angelotti (1965) et ve et ürünlerini içeren 262 örnekten 113 (% 43,1)’ünde *C. perfringens* tespit etmişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda sığır eti örneklerinin % 70, koyun eti örneklerinin % 52, tavuk eti örneklerinin % 58 oranında *C. perfringens* ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir. Ali

ve Fung, (1991) ABD’de 118 sığır kıyması örneğinin 64’ünde (% 54), 55 hindi kıyması örneğinin 40’ında (% 73) *C. perfringens* tespit etmişlerdir. Çin’in Beijing şehrinde 31 sığır etinin % 65’inde ve 28 koyun etinin tamamında (% 100) *C. perfringens* kontaminasyonu bildirilmiştir (Guang-Hua ve Xiao-Ling, 1994). Miki ve ark. (2008) 5 farklı hayvan türüne ait toplam 200 numuneyi *C. perfringens* yönünden analiz etmişlerdir. Alınan 35 sığır ve 3 koyun eti örneğinin sırasıyla 19 (% 54,3) ve 1’inin (% 33,3) *cpa* pozitif olduğu saptanmıştır. Nowell ve ark. (2010) Kanada’da perakende satılan 64 taze tavuk etinin 42’sinde (% 66), 24 dondurulmuş tavuk etinin 16’sında (% 67) *C. perfringens* tespit etmiştir.

Bu verilere karşın daha düşük oranda bildirilen raporlar da bulunmaktadır. Miwa ve ark. (1998) perakende satılan 50 sığır eti örneğinin 8 (% 16)’inde *C. perfringens* saptamışlardır. Yine Stagnitta ve ark. (2002) 515 et içeren örnekte (315 taze sosis, 100 hamburger ve 100 kıyma) 126 (% 24,5) *C. perfringens* izole etmişlerdir. Lin ve Labbe (2003), 131 perakende gıda örneğinin 40’ında (% 31) *C. perfringens* bulunduğunu, Wen ve McClane 2004 yılında yapmış oldukları çalışmada satışa sunulan 24 koyun eti örneğinden 9 (% 38)’unun, 83 sığır eti örneğinden 17 (% 21)’sinin, 108 sığır kıyma örneğinden 25 (% 23)’inin, 147 tavuk eti örneğinden 56 (% 38)’sının, 68 hindi eti örneğinden 19’unun (% 28) *C. perfringens* ile kontamine olduğunu rapor etmişlerdir. Kouassi ve ark. (2014) sokakta satışa sunulan 395 pişmiş sığır eti ve böbreklerinde % 5 *C. perfringens* tespit etmiştir. Khan ve ark. (2015) Pakistan’da koyun eti, sığır eti ve tavuk eti (n:100) içeren toplam 300 çiğ et örneğinde *C. perfringens* prevalansını ELISA metodu ile toplamda % 12 oranında olmak üzere tavukta % 6, koyun etinde % 5 ve sığır etinde % 1 olarak tespit etmiştir.

Bu tez çalışmasında 127 *cpa* genine sahip izolatın yalnızca birinde (% 0,78) beta 2 geni saptanmıştır. Beta 2 geni sağlıklı sığırların bağırsak florasında bulunabilmekle birlikte klinik öneminin olmadığı bildirilmektedir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda da beta 2 geni tespit edilmiştir. Güran ve Öksüztepe (2013), çiğ tavuk etlerinden elde ettikleri 558 suşun 12 (% 2,1)’sini *cpa* ve *cpb2* pozitif (tip A-*cpb2*) ve birini (% 0,1) aynı zamanda *cpe* pozitif (tip A-*cpe*) olarak saptamıştır. Yine Güran ve ark. (2014) 262 sığır ve koyun eti izolatında % 77,4 *cpa* geni (tip A), % 7,6

cpa ve *cpb2* genleri (tip A-*cpb2*) ve % 2,2'sinde *cpa* ve *cpe* toksin genlerini (tip A-*cpe*) tespit etmişlerdir. Ayrıca, 262 *C. perfringens* izolatından 4'ü (% 1,5) tip B, 10'u (% 3,8) tip C ve 19'u (% 7,2) tip D olarak saptanmıştır. Aras ve Hadımlı (2015) sığır eti pozitif örneklerde % 12,5 *cpa* ve *cpb2*, % 2,5 *cpe* geni tespit etmiştir. Hanifehnezhad ve ark. (2015) broiler sakatatında tüm izolatların *cpa* pozitif ve taşıktan elde edilen 2 izolatın *cpb2* pozitif olduğunu bildirmiştir. Nowell ve ark. (2010), tavuk etinden elde edilen 183 izolatın % 21'inde *netB* geni, % 2,1'inde *cpb2* geni tespit etmiştir. Hosseinzadeh ve ark. (2018) sığır ve koyun karkas izolatlarında *cpe* ve *net B* geni % 2,7 olarak saptanmıştır.

Afshari ve ark. (2015a), 200 kıyma (koyun ve sığır eti karışımı) örneğinin 25 (% 12,5)'inin *C. perfringens* ile kontamine olduğunu bildirmiştir. Multipleks PCR ile bunların 18'ini yalnızca *cpa* geni (tip A), 4'ünü *cpa* ve beta 2 geni (tip A- *cpβ2+*) olarak tespit etmiştir. Diğer 3 örneğin biri tip B (*cpa+cpb+etx+ ve cpb2+*), biri tip D (*cpa+etx+*) ve biri tip E (iA) olarak raporlandırılmıştır. Afshari ve ark. bu çalışmaları ile kıyma etlerinde ilk kez *cpβ2+* B tipi *C. perfringens* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Yine Afshari ve ark. (2015b) 200 broiler karkasın 31'inde (% 15,5) *C. perfringens* tespit etmiştir. Bu 31 izolatın 9'u tip A olup bunların 4'ü yalnızca *cpa+*, 5'i heterojen tip A olarak *cpb2* geni de taşımaktadır. Diğer 22 izolat tip C olarak tanımlanmıştır.

Bos ve ark. (2005), gıda zehirlenmeleri ile ilişkilendirilen *C. perfringens* enterotoksininin % 1-5 arasında değişen oranda bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında mezbahadaki sığır karkaslarında enterotoksin geni tespit edilememiştir. Bu sonuca paralel olarak Lin ve Labbe (2003) *C. perfringens* izolatlarının hiçbirinde *cpe* olmadığını rapor etmişlerdir. Yine Yang ve ark. (2010) 20 sığır eti örneğinin 4'ünde (% 20) *cpa* geni olduğunu ancak hiçbirinde *cpe* geni bulunmadığını saptamışlardır. Buna karşın Miwa ve ark. (1998) sığır etinden elde ettiği *C. perfringens* izolatlarının % 2'sinin enterotoksijenik olduğunu ortaya koymuşlardır. Stagnitta ve ark. (2002) et ve et içeren örneklerde izolatların % 7,1'ini enterotoksijenik olarak tespit etmiş ve 126 *C. perfringens* izolatınının 123'ünü tip A

(% 97,2), 2'sini tip C (% 1,6), birini tip E (% 0,8) olarak saptamıştır. Enterotoksijenik suşların hepsi tip A olarak sınıflandırılmıştır. Miki ve ark. (2008) sığır eti *C. perfringens* izolatlarında % 5,7 *cpe* tespit etmesine karşın koyun eti izolatlarında *cpe*'ye rastlamadığını bildirmiştir. Ghoneim ve Hamza (2017), perakende satılan et örneklerinde *cpe* taşıyan *C. perfringens*'i % 2,6 olarak tespit etmiştir. Hosseinzadeh ve ark. (2018) mezbahadan elde ettiği izolatlarda *cpe* ve net B genini % 2,7 olarak saptamıştır. Yibar ve ark. (2018) 306 adet işlenmemiş, pişirime ve tüketime hazır et ve et bazlı üründen elde edilen şüpheli 81 izolatın 42'sini (% 51,9) *cpa* geni ve 22'sini (% 27,2) *cpe* geni pozitif olarak saptamıştır. CPE toksin düzeyi en yüksek olan ürün tüketime hazır pişmiş kokoreç olarak bildirilmiştir. Younis ve ark. (2018), Mısır'da kasap ve marketlerden topladıkları 105 kıyma örneğinin 98 (% 93,3)'ini klasik metotla *C. perfringens* olarak tespit etmiştir. Pozitif örneklerin yalnızca 33 (% 33,7)'ünün beyaz gine piglere uygulanan dermonekrotik test ile toksijenik olduğu ve bunların tümünün RT-PCR ile *cpa* ve *cpe* pozitif A tipi *C. perfringens* olduğu bildirilmiştir. Singh ve ark. (2005) toplam 211 et örneği (bufalo ve keçi 70, kanatlı 71 adet)'nde *C. perfringens* keçi etinde % 91,4, kanatlıda % 70,4 ve bufalo etinde % 65,7 olarak tespit etmiştir. Toplamda elde edilen 116 izolat PCR ile enterotoksin gen yönünden analiz edildiğinde bufaloda % 9,3, keçide % 32,4, kanatlıda % 15,5 olarak tespit edilmiştir.

Bursa'da klasik kültür metoduyla elde edilen *C. perfringens* şüpheli koloniler API 20 A ile % 5,6 (306:17), real time PCR ile % 13,7 (306:42) *C. perfringens* olarak tanımlanmıştır (Yibar ve ark. 2018). Görüldüğü üzere API testlerinin sensitivitesi PCR metotlarına göre oldukça düşüktür.

C. perfringens tespitinde kullanılan klasik metotlar, ELISA, API 20A gibi testler DNA esaslı metotlara göre daha göreceli ve tespit oranı daha düşük olabilmektedir. Bu nedenle izolatların doğrulanmasında birden fazla yöntemin kombine edilmesi güvenilir sonuçlar sağlamaktadır (Juneja ve ark., 2010).

Literatür verilerine göre *C. perfringens* hayvan ve insan bağırsak içeriklerinden yaygın olarak izole edilmektedir. Bu kapsamda mezbahalar, kırmızı etin *C. perfringens* ile primer kontaminasyon alanı olarak önem arz etmektedir. Özellikle kesimden sonra iç organları çıkarma işlemi sırasında bağırsakta meydana gelen yırtılmalar, bıçak veya personel ile meydana gelen çapraz kontaminasyonlar sığırların karkaslarını kontamine etmektedir. Yapılan çalışmalar ruminant bağırsak içeriğinde yüksek oranda *C. perfringens* bulunduğunu desteklemektedir. Saito (1990), 51 sığır dışkı örneğinin 25'inde (% 49), Miwa ve ark. (1997) 50 sığır bağırsak içeriğinin 38'inde (% 76) *C. perfringens* saptamıştır. Miserez ve ark. (1998) mezbahada kesim sırasında koyun ve keçilerden aldıkları 18 sağlıklı hayvan bağırsak içeriğinin 13 (% 72,2)'ünde *C. perfringens* bulunduğunu tespit etmişlerdir. PCR ile yaptıkları analiz sonucunda da 13 örneğin (% 100) *cpa* pozitif olduğunu, 2 örneğin (% 15) *etx* geni taşıdığını bildirmişlerdir. Yine 307 süt ineğine ait dışkı örneklerinden 241 *C. perfringens* izolatı elde edilmiştir. Real time PCR yöntemi ile bu izolatlarda % 28,2 *cpa*, % 2,5 *cpb*, % 2,5 *ia*, % 1,6 *etx*, % 68 *cpb2* ve % 4,5 *cpe* toksin genleri tespit edilmiştir (Gurjar ve ark., 2008).

Bu tez çalışmasında sığır karkas izolatlarında yüksek oranda sülfonamide ve daha az oranda tetrasiklin ve gentamisine direnç tespit edilmiştir. Gıda üretimi amacıyla yetiştirilen hayvanlarda kullanılan antibiyotikler birçok patojen mikroorganizmanın direnç geliştirmesine neden olmaktadır (Teuber, 1999). Tetrasikline karşı direnç *C. perfringens* için bilinen en önemli direnç fenotipidir (Lyras ve Rood, 1996).

C. perfringens için en sık kullanılan antimikrobiyel ajanlar metronidazol ve penisilin G'dir. İzolatların % 20'sinde norfloksasin/nalidiksik asit direnci *C. perfringens* için yaygın fenotip olarak tespit edilmiştir. Bu kapsamda periyodik antimikrobiyel duyarlılık testleri yapılarak direniş trendlerinde coğrafi veya zamansal değişimleri surveyans ile tespit etmek önemlidir (Kouassi ve ark., 2014). Khan ve ark. (2015) toksin üreten izolatların kloramfenikol, siprofloksasin, metronidazol ve seftriakson için duyarlı olduğunu tespit etmiştir. Ayrıca amoksisiline % 83, ampisilin

ve vankomisine % 33, penisilin ve eritromisine % 17 direnç gösteren izolatlar olduğu da bildirilmiştir. Younis ve ark. (2018), *C. perfringens* izolatları ile 16 antibiyotik için yaptığı antibiyogram çalışmasında streptomisin, seftazidim, kolistin sülfat, sefalotin, ampisilin ve gentamisine direnç göstermiştir. Siprofloksasin, ofloksasin ve nitrofurantoin % 100 duyarlılık ve tetrasiklin ve sülfatriad ile orta derecede duyarlılık tespit edilmiştir.

Antibiyotiklerin gelişmeyi artırıcı olarak kullanılması hayvanların bağırsaklarında bulunan *C. perfringens*'in direnç kazanmasına sebep olmuştur. *C. perfringens*'in farklı antibiyotiklere karşı oluşturduğu direnç profillerinin belirlenmesi epidemiyolojik açıdan önemlidir. Antibiyotik dirençle ilgili olarak Tansuphasiri ve ark.'ın (2005) insan ve domuz dışkısı, çevre ve çeşitli gıdalardan elde ettikleri 269 *C. perfringens* izolatı ile yaptıkları çalışmada, *C. perfringens*'in tetrasikline karşı % 56,2, imipeneme karşı % 24,9, metronidazole karşı % 9,5, penisilin G'ye karşı % 9, vankomisine karşı % 4,5, kloramfenikole karşı % 3 ve seftriaksona karşı % 1 direnç gösterdiğini rapor etmişlerdir. Çevreden elde edilen izolatların % 72,7'si, insan dışkısından elde edilen izolatların % 44,9'unun ve gıdalardan elde edilen izolatların ise % 28'inin tetrasikline karşı direnç gösterdiği belirlenmiştir. Slavić ve ark. (2011) 40 sığira ait dışkı veya bağırsak içeriklerinden elde ettikleri *C. perfringens* izolatlarının tetrasikline % 57,5 oranında dirençli olduğunu tespit etmiştir.

Türkiye'de et ve et ürünleri üretimine ilişkin yasal düzenlemeler bulunmasına karşın, kaçak kesimler, uygun hijyenik ve teknolojik donanıma sahip olmayan mezbahalar gibi nedenlerle kırmızı et ve et ürünlerinin üretiminde istenilen hijyenik kaliteye ulaşılamamaktadır (Erol, 2000). Bu çalışma ile Türkiye'deki sığır karkaslarının yüksek oranda henüz mezbaha aşamasında iken *C. perfringens* ile kontamine olduğu tespit edilmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Klasik kültür yöntemi ve moleküler yöntemlerden elde edilen veriler doğrultusunda toplam 120 sığır karkasının 63'ü (% 52,5) *Clostridium perfringens* olarak tespit edilmiştir. Klasik yöntemde 183 izolat elde edilmiş ve real-time PCR ile 127 izolat *cpa* geni ile *C. perfringens* olarak tanımlanmıştır. Multipleks PCR ile *cpa* pozitif izolatlar diğer genler yönünden analiz edilmiştir. Elde edilen 127 sığır karkas svap izolatından 1'inde (1/127) *cpa* ve *cpb2* (% 0,78) geni tespit edilmiştir. *C. perfringens* suşlarının antibiyotik direnç profili değerlendirildiğinde, sığır izolatlarının yüksek oranda kloramfenikole direnç gösterdiği belirlenmiştir. Bunun dışında sülfonamid ve tetrasiklin antibiyotiklerine direnç öne çıkmıştır.

Anaerob bakterilerin duyarlılığındaki varyasyonlar, bölgesel antimikrobiyellerin kullanımı, klonal popülasyon, infeksiyon yeri ve coğrafik dağılımdaki farklılıklar sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bölgesel, ulusal ve küresel olarak sıklıkla bildirilen patojenler için antimikrobiyel ajanların duyarlılığının izlenmesi çeşitli surveyans programları ile sürdürülmektedir. Tüm dünyada antimikrobiyel direncin artış eğilimi nedeniyle klinik çözümleri desteklemek, infeksiyon kontrol girişimleri ve antimikrobiyel direnci içeren stratejiler için bölgesel düzeyde ortaya yeni çıkan ilaç dirençlerinin izlenmesi gerekmektedir.

C. perfringens gıda zehirlenmeleri oldukça yaygın ve masraflıdır. Gıdalardan bu mikroorganizmanın tam anlamıyla eradikasyonunun mümkün olmamasının nedeni direnci yüksek olan spor formlardır. Mikroorganizma gelişimini sınırlandırmak için oksijen, a_w , pH, kütleme tuzları, organik asitler ve doğal inhibitörlerin kullanılması kontrol önlemlerinin alınmasında avantaj sağlayacaktır.

Gıda güvenliği ve kalite kontrol programları hem ürün değerini garanti altına almak hem de tüketici infeksiyon riskini en aza indirmek için gıda üretim zinciri boyunca artarak uygulanmaktadır. Son yıllarda geliştirilen real-time PCR sistemi

hızlı, güvenilir ve kantitatif sonuç verebilmesi sayesinde gıda analizlerinde en önemli yöntemlerden biri olmuştur. LightCycler real-time PCR sisteminde amplikonun spesifitesini ortaya koymak için yapılan erime sıcaklığı (temperature of melting) analizi kısa bir sürede gerçekleşmektedir. Ayrıca aynı anda 32 örneği test edebilmektedir. Amplikon tespiti aynı sistem içerisinde amplikonu taşıyan kapillerler çıkartılmadan gerçekleştiğinden çevresel kontaminasyon riski taşımamaktadır. Bu nedenle konvensiyonel PCR ve jel elektroforezi ile karşılaştırıldığında zaman bakımından büyük avantaja sahiptir. Mikrobiyolojik analizlerde hız, yüksek analitik duyarlılık ve seçicilik ile konvensiyonel kültür yöntemine göre birçok avantajı bulunmaktadır. Buna karşın gıdaların izlenmesi ve kontrolünde pahalı ekipman ve reaktiflerin kullanımı, kalifiye personel ihtiyacı ile bazı standart protokollerin eksik olması nedeniyle pratik uygulamalarda sıklıkla kullanılamamaktadır.

C. perfringens tip A kaynaklı gıda zehirlenmeleri hem ABD’de hem de AB’de bakteriyel gıda zehirlenmelerinin en önemli nedenlerinden biridir. klostridyal patojenler ve toksinleri tespit etmek infeksiyon ile buna neden olan gıda kaynağını tespit etmek için hızlı ve doğru yöntemlerin kullanılması önemlidir. Böylece uygun olan kontrol ve önleme müdahaleleri uygulanabilir. Klinik örnekler ve gıdalarda *C. perfringens* tespiti için konvensiyonel laboratuvar metotları uzun süreli, kompleks, deney hayvanlarının kullanımını içerebilir ve her zaman bilgilendirici olmayabilir. Real-time izolatların patojenitesi hakkında bilgi sağlamak, salgın insidens ve araştırmalarını geliştirmek, tanı yöntemlerini geliştirmek için kültür teknikleri ile birlikte kullanılmaktadır. Klostridyal gıda patojenleri için real-time PCR testleri gıda üreticileri için daha hızlı ve etkin olarak değerlendirilmesi gereken, gıda ürünlerinin güvenliğini sağlayan ve gıdaların izlenmesini geliştiren hızlı bir yöntemdir. Real-time testlerinin güvenilirliği bakteri ve patojenden nükleik asit ekstraksiyonu ile amplifikasyon prosedürünün doğruluğuna bağlıdır.

Bu tez ile Türkiye’de sığır karkaslarında *C. perfringens*’in virülens genleri ilk defa çeşitli PCR yöntemleri ve cihazları ile tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar *C. perfringens*’in insan tüketimi için hazırlanan et ve et ürünlerine bulaşmasına yönelik yapılacak çalışmalar ve toksin tiplendirilmesinde kullanılacak yöntemler

doğrultusunda kaynak oluşturabilecektir. Özellikle real-time PCR yöntemi ile hızlı (45-60 dk) ve spesifik sonuçlar elde edilmesi ile bu verilerin birçok farklı analizde kullanılabilir olması *C. perfringens* ile ilgili çalışmalarda bu yöntemin kullanılabilirliğini arttırabilecektir. İzolatların toksin profillerinin belirlenmesi gıda infeksiyonlarında önemli verilerin ortaya konması açısından ve *C. perfringens*'in moleküler karakterizasyonu açısından önemlidir. Aynı toksin genine sahip izolat hem mezbaha hem de gıda üzerinde tespit edildiğinde bulaşmanın kaynağına yönelik bilgi sisteminin oluşturulmasında yardımcı olabilecek ve önemli epidemiyolojik veriler elde edilecektir. Bu kapsamda elde edilen verilerle Türkiye'de daha önce bildirilmeyen sığır karkaslarında *C. perfringens*'in prevalansı tespit edilmiş ve mevcut literatürlere temel oluşturabilecek bilimsel veri elde edilmiştir. Ayrıca *C. perfringens*'in epidemiyolojik yönden önem taşıyan moleküler karakterizasyonu ve önemli bir halk sağlığı sorunu olan antibiyotik duyarlılık durumu konusunda bilimsel veriler elde edilmiştir.

Çiftlikten sofraya gıda zinciri boyunca gıda güvenliği risklerine cevap vermek ve bunları yönetmek için yeterli gıda sistemlerini ve altyapılarını inşa ederek izleme ve tespiti sürdürmek gereklidir. Daha iyi iletişim ve ortak eylem için halk sağlığı, hayvan sağlığı, tarım ve diğer sektörler arasında çok yönlü işbirliği sağlanmalıdır.

ÖZET

Kesimhanelerdeki Sığır Karkaslarında *Clostridium perfringens*'in Varlığı ve Moleküler Tiplendirilmesi

Clostridium perfringens, *Clostridiaceae* ailesinin *Clostridium* genusunda yer alan Gram pozitif, çubuk şeklinde, sporlu, fakültatif anaerob, hareketsiz ve ubiquiter patojen bir bakteridir. Etkenin patojenitesi insanlar ile evcil ve yabani hayvanların bağırsaklarında ürettiği toksinlerden ileri gelmektedir. *C. perfringens*'in ürettiği toksinler; major (alfa (α), beta (β), epsilon (ϵ) ve iota (i) toksin) ile minör (enterotoksin (*cpe*) ve beta 2 (β_2) toksin vb.) olarak iki farklı sınıfa ayrılmaktadır. Alfa toksin bütün tipler tarafından sentezlendiğinden etkenin doğrulanması amacıyla da kullanılmaktadır. Bu çalışmada Ankara civarındaki bir mezbahadan sığırlarda *C. perfringens* varlığı ve toksin tiplendirmesi amacıyla 120 karkas svap örneği toplandı. Klasik kültür yöntemiyle mikrobiyolojik ve biyokimyasal analizler sonrasında identifiye edilen izolatlar real-time PCR yöntemi ile *C. perfringens* α toksin geni (*cpa*) varlığı ile doğrulandı. İzolatlardan *cpa* geni içerenler multipleks PCR yöntemi ile diğer toksin genleri (*cpb*, *cpb2*, *etx*, *iA*, *cpe*) varlığı yönünden analiz edildi. Daha sonra bu izolatların antibiyotik duyarlılıkları belirlendi.

Analizler sonucunda 120 sığır karkasından 63'ü (% 52,5) *cpa* genine sahip olup *C. perfringens* olarak tespit edilmiştir. Multipleks PCR ile 127 izolatın yalnızca birinde (% 0,78) *beta2* geni saptanmıştır. Ayrıca sığır karkaslarında tespit edilen *C. perfringens* için sülfonamid ve tetrasiklin antibiyotik direnci öne çıkmıştır.

Anahtar Sözcükler: Antibiyotik, *Clostridium perfringens*, Karkas, PCR, Sığır.

SUMMARY

Occurrence and Molecular Typing of *Clostridium perfringens* on Cattle Carcasses at Slaughterhouses Level

Clostridium perfringens is a Gram positive, rod-shaped, spore-forming, facultative anaerobe, non-motile and ubiquitous pathogen bacterium which belongs to the genus *Clostridium* of family *Clostridiaceae*. It can produce some toxins in human, wild and domestic animals intestines and these toxins are considered as pathogenic factors of this bacterium. The toxins are classified into two categories. Major toxins and minor toxins are produced by different *Clostridium perfringens* types. Alpha (α), beta (β), epsilon (ϵ) and iota (i) toxins are classified as major lethal toxins and *cpe* (*Clostridium perfringens* enterotoxin) and beta 2 (β_2) like toxins are classified as minor lethal toxins. Alpha (α) toxin can be produced by every type of *Clostridium perfringens*, therefore this toxin can be also used as confirmation of agent. In this study, 120 swap samples were collected from cattle carcasses. The samples were processed with classical methods and then for identification, isolates were analysed with biochemical tests. Positive isolates were confirmed with *cpa* gene using real-time PCR protocol. After confirmation, isolates were analysed for other toxins (*cpb*, *cpb2*, *etx*, *iA*, *cpe*) genes with multiplex PCR.

As a result of the analysis, *cpa* gene containing isolates were detected from 63 (52,5 %) of 120 cattle carcasses. 127 isolates were analysed by multiplex PCR for their other toxin genes and only 1 (0,78 %) cattle carcass swap isolates contained *cpb2* toxin gene. In addition, sulphonamid and tetracyclin resistance is strongly noticeable for the *C. perfringens* detected in cattle carcass swaps.

Keywords: Antibiotic, Carcass, Cattle, *Clostridium perfringens*, PCR.

KAYNAKLAR

- AFSHARI A, JAMSHIDI A, RAZMYAR J, RAD M (2015a). Molecular typing of *Clostridium perfringens* isolated from minced meat. *J. Vet. Sci. Tech.* **7(1)**: 32-39.
- AFSHARI A, JAMSHIDI A, RAZMYAR J, RAD M (2015b). Genotyping of *Clostridium perfringens* isolated from broiler meat in northeastern of Iran. *Veterinary Research Forum* **6(4)**: 279-284.
- AL-KHALDI SF, MYERS KM, RASOOLY A, CHIZHIKOV V (2004). Genotyping of *Clostridium perfringens* toxins using multiple oligonucleotide microarray hybridization. *Mol. Cell. Probes.* **18**: 359-367.
- ALI MS, FUNG DY (1991). Occurrence of *Clostridium perfringens* in ground beef and ground turkey evaluated by three methods. *J. Food Safety* **11**: 197-203.
- ANGULO FL, VOETSCH AC, VUGIA D, HADLER JL, FARLEY M, HEDBERG C, CIESLAK P, MORSE D, DWYER D, SWERDLOW DL (1998). Determining the burden of human illness from foodborne diseases-CDC's emerging infectious disease program Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet). *Vet. Clin. N. Amer. Food Anim. Pr.* **14**: 165-172.
- ANON (2014). Erişim adresi: <https://www.ers.usda.gov/data-products/cost-estimates-of-foodborne-illnesses.aspx>. Erişim tarihi: 26.02.2018
- ANON (2015a) Erişim adresi: <https://www.food.gov.uk/research/research-projects/the-second-study-of-infectious-intestinal-disease-in-the-community-iid2-study> Erişim tarihi: 02.06.2018
- ANON (2015b). Erişim adresi: http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/en/ Erişim tarihi:15.02.2016
- ANON (2017). Erişim adresi: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety> Erişim tarihi: 02.06.2018
- ARAS Z, HADIMLI HH (2015). Detection and molecular typing of *Clostridium perfringens* isolates from beef, chicken and turkey meats. *Anaerobe* **32**: 15-17.
- BAEZ LA, JUNEJA VK (1995). Nonradioactive colony hybridization assay for detection and enumeration of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in raw beef. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 807-810.
- BAUM CG, SCHOTTE U, AMTSBERG G, GOETHE R (2004). Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Vet Microbiol.* **100**: 11-16.
- BEAN NH, GRIFFIN PM (1990). Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: pathogens, vehicles, and trends. *J. Food Prot.* **9**: 804-817.
- BEGURN M (1984). Bacteriological study of fresh markets meat (beef and mutton) of Rawalpindi/Islamabad Region. *J. Pak. Med. Assoc.* **34**: 214-217.
- BEVERLY J, MCCABE S, BEATTIE SE (2004). Food Safety: Emerging trends in foodborne illness surveillance and prevention. *J. Am. Diet. Assoc.* **104**:1708-1717.

- BOS J, SMITHEE B, MCCLANE B, DISTEFANO RF, UZAL F, SONGER JG, MALLONEE S, CRUTCHER JM (2005). Fatal necrotizing colitis following a foodborne outbreak of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A infection. *CID*. **40**: 78-83.
- BRETT MM, GILBERT RJ (1997). 1525 outbreaks of *Clostridium perfringens* food poisoning, 1979–1996. *Rev. Med. Microbiol.* **8**: S64-S65.
- BROOK I, WEXLER HM, GOLDSTEIN EJC (2013). Antianaerobic antimicrobials. Spectrum and susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**: 526-36.
- BROOK I (2018). *Clostridium* species (*Clostridium perfringens*, *C. butyricum*, *C. clostridioforme*, *C. innocuum*, *C. ramosum*, *C. septicum*, *C. sordellii*, *C. tertium*). Erişim adresi: www.antimicrobe.org/b90.asp Erişim tarihi: 12.06.2018.
- BROWN KL (2000). Control of bacterial spores. *Brit. Med. Bull.* **56(1)**: 158-171.
- BRYAN FL (1988). Risks associated with vehicles of foodborne pathogens and toxins. *J. Food Prot.* **51**: 498-508.
- BRYANT AE, STEVENS DL (1996). Phospholipase C and perfringolysin O from *Clostridium perfringens* upregulate endothelial cell-leukocyte adherence molecule 1 and intercellular leukocyte adherence molecule 1 expression and induce interleukin-8 synthesis on cultured human umbilical vein endothelial cells. *Infect. Immun.* **64**: 358-362.
- BRYNESTAD S, GRANUM PE (2002). *Clostridium perfringens* and foodborne infections. *Int. J. Food Microbiol.* **74**: 195-202.
- BYRNE B, DUNNE G, BOLTON DJ (2006). Thermal inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll. *Food Microbiol* **23**: 803-888.
- CANARD B, COLE S (1989). Genome organization of the anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6676-6680.
- CARDOSI M, BIRCH S, TALBOT J, PHILLIPS A (2005). An electrochemical immunoassay for *Clostridium perfringens* phospholipase C. *Electroanalysis* **3**: 169-176.
- CDC (2000). Surveillance for foodborne disease Outbreaks-United States, 1993-1997. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **49**: 1-51.
- CDC (2013). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks-United States, 1998–2008. *MMWR* Vol. 62/ No. 2. Erişim adresi: <http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/ss/ss6202.pdf> Erişim tarihi: 02.06.2018.
- CHAE HS, KIM YH, KIM JY, KIM JH, KIM GH, CHOI TS, SHIN BW, LEE DJ, LEE JH. (2006). Isolation and characterization of *Clostridium perfringens* on bovine and porcine carcass. *Korean J. Vet. Serv.* **29**: 97-102.
- CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute) (2003). Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria, Volume 24 Number 2 ISSN 0273-3099 Approved Standard-Sixth Edition. M11-A6 Pennsylvania. USA.
- CZECZULIN JR, COLLIE RE, MCCLANE BA (1996). Regulated expression of *Clostridium perfringens* enterotoxin in naturally *cpe*-negative Type A, B and C isolates of *C. perfringens*. *Infect. Immun.* **64(8)**: 3301-3309.

- ÇAKMAK Ö (2001). Ankara'da tüketime sunulan sığır kıymalarında *C. perfringens*'in varlığı ve kontaminasyon düzeyinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- ÇAKMAK Ö, BİLİR ORMANCI FS, TAYFUR M, EROL İ. (2006). Presence and contamination level of *Clostridium perfringens* in raw frozen ground poultry and poultry burgers. *Turk J Vet Anim Sci.* **30**: 101-105.
- DE JONG AE, BEUMER RR, ROMBOUITS FM (2002). Optimizing sporulation of *Clostridium perfringens*. *J. Food Prot.* **65**: 1457-1462.
- DE BOER E, SPIEGELENBERG WM, JANSSEN F (1985). Microbiology of spices and herbs. *Antonie van Leeuwenhoek* **51**: 435-438.
- DUCLUZEAU R, RAIBAUD P (1989). Bacterial interactions within the digestive tract. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **8(2)**: 313-332.
- DUNCAN CL, STRONG DH, SEBALD M (1972). Sporulation and enterotoxin production by mutants of *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* **110**: 378-391.
- EL IDRISSE AH (1989). A 4-layer sandwich ELISA for detection of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. FAO Corporate Document Repository. Erişim adresi: <http://www.fao.org/wairdocs/ilri/x5489b/x5489b14.htm> Erişim Tarihi: 21.09.2015.
- EROL İ (2000). Türkiye'de Hayvan Hareketleri, Kaçak Kesimler, Hayvansal Ürünlerde Gıda Güvenliği ve Halk Sağlığı. Türkiye 2000 Hayvancılık Kongresi. 31 Mart-2 Nisan 2000, Kızılcahamam, Ankara. s.:242-252.
- EROL İ (2007). *Clostridium perfringens*. Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi, s. 154-162 Ankara, Pozitif Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara.
- EROL I, GONCUOGLU M, AYAZ ND, BİLİR ORMANCI FS, HILDEBRANT G (2008). Molecular typing of *Clostridium perfringens* isolated from turkey meat by multiplex PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* **47**: 31-34.
- FUCHS AR, BONDE GJ (1957). The nutritional requirements of *Clostridium perfringens*. *J. Gen. Microbiol.* **16**: 317-329.
- GHONEIM NH, HAMZA DA (2017). Epidemiological studies on *Clostridium perfringens* food poisoning in retail foods. *Rev Sci Tech.* **36(3)**: 1025-1032.
- GIBERT M, JOLIVET RC, POPOFF MR. (1997). Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene.* **203(1)**: 65-73.
- GIBERT M, PETIT L, RAFFESTIN S, OKABE A, POPOFF MR (2000). *Clostridium perfringens* iota-toxin requires activation of both binding and enzymatic components for cytopathic activity. *Infect Immun.* **68(7)**: 3848-3853.
- GRANT KA (2008). The identification and characterization of *Clostridium perfringens* by real-time PCR, location of enterotoxin gene, and heat resistance. *Foodborne Pathog. Dis.* **5**: 629-639.
- GRASS JE, GOULD LH, MAHON BE (2013). Epidemiology of Foodborne Disease Outbreaks Caused by *Clostridium perfringens*, United States, 1998-2010. *Foodborne Pathog. Dis.* **10**: 131-136.

- GUANG-HUA W, XIAO-LING Q (1994). The incidence of *C. perfringens*, *S. aureus*, *Salmonellen* and *L. monocytogenes* in retail meat and meat products in Beijing. *Fleischwirtsck* **74**: 326-328.
- GUPTA Y (1998). Selected Readings in Microbiology and Genetics. Vol II. Sarup & Sons, New Delhi.
- GURAN HS, OKSUZTEPE G (2013). Detection and typing of *Clostridium perfringens* from retail chicken parts. *Lett. Appl. Microbiol.* **57**: 77-82.
- GURAN HS, VURAL A, ERKAN MEJ (2014). The prevalence and molecular typing of *Clostridium perfringens* in ground beef and sheep meats. *J. Verb. Lebensm.* **9**: 121.
- GURJAR AA, HEGDE NV, LOVE BC, JAYARAO BM (2008). Real-time multiplex PCR assay for rapid detection and toxintyping of *Clostridium perfringens* toxin producing strains in feces of dairy cattle. *Mol. Cell. Probe.* **22**(2): 90-95.
- HAILEGEBREAL G (2017). A Review on *Clostridium perfringens* food poisoning. *Glob. Res. J. Publ. Health and Epidemiol.* **4**(3): 104-109.
- HALL HE, ANGELOTTI R (1965). *Clostridium perfringens* in meat and meat products. *Appl. Microbiol.* **13**: 352-357.
- HANIFEHNEZHAD A, GONCUOGLU M, EROL I (2015). Prevalence and molecular typing of *Clostridium perfringens* isolates from edible offal of broiler. *Vet. J. Ankara Uni.* **62**: 113-117.
- HANSEN MV, ELLIOTT LP (1980). New presumptive identification test for *Clostridium perfringens*: reverse CAMP test. *J. Clin. Microbiol.* **12**(4): 617.
- HARMON SM, KAUTTER DA, PEELER JT (1971). Improved medium for enumeration of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.* **22**: 688-692.
- HASSAN KA, ELBOURNE LD, TETU SG, MELVILLE SB, ROOD JI, PAULSEN IT. (2015). Genomic analyses of *Clostridium perfringens* isolates from five toxinotypes. *Res. Microbiol.* **166**: 255-263.
- HEIKINHEIMO A, LINDSTROM M, KORKEALA H (2004). Enumeration and isolation of cpe-positive *Clostridium perfringens* spores from feces. *J Clin Microbiol.* **42**: 3992-3997.
- HEIKINHEIMO A, LINDSTROM M, GRANUM PE, KORKEALA H (2006). Humans as reservoir for enterotoxin gene-carrying *Clostridium perfringens* Type A. *Emerg. Infect. Dis.* **12**: 1724-1729.
- HICKEY MJ, KWAN RY, AWAD MM, KENNEDY CL, YOUNG LF, HALL P, CORDNER LM, LYRAS D, EMMINS JJ, ROOD JI (2008). Molecular and cellular basis of microvascular perfusion deficits induced by *Clostridium perfringens* and *Clostridium septicum*. *PLoS Pathog* **4**(4): e1000045 doi: 10.1371.
- HOBBS BC, SMITH ME, OAKLEY CL, WARRACK GH, CRUICKSHANK JC (1953). *Clostridium welchii* food poisoning. *J. Hyg.* **51**: 75-101.
- HOSSEINZADEH S, BAHADORI M, POORMONTASERI M, DEGHANI M, FAZELI M, NAZIFI S (2018). Molecular characterization of *Clostridium perfringens* isolated from cattle and sheep carcasses and its antibiotic resistance patterns in Shiraz Slaughterhouse, Southern Iran. *Veterinarski Arhiv* **88**(5): 581-591. DOI: 10.24099/vet.arhiv.0009

- HUGHES C, GILLESPIE IA, O'BRIEN SJ (2007). Foodborne transmission of intestinal disease in England and Wales, 199-2003. *Food Control* **18**: 766-772.
- HUNTER SEC, BROWN JE, OYSTON PC, SAKURAI J, TITBALL RW (1993). Molecular genetic analysis of beta-toxin of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **61(9)**: 3958-3965.
- ICMSF (1996). Microorganisms in Foods 5: Characteristics of Microbial Pathogens. London Blackie Academic & Professionel, London.
- IMMERSEEL F, BUCK J, PASMANS, F, HUYGHEBAERT G, HAESEBROUCK F, DUCATELLE R (2004). *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian Pathol.* **33(6)**: 537-549.
- JABBARI AR, TEKYEI F, ESMAELIZAD M, PILEHCHIAN LANGROUDI R (2012). Occurrence of Beta2 toxigenic *Clostridium perfringens* isolates with different toxin types in Iran. *Arch. Razi. Inst.* **67(2)**: 133-137.
- JOHANSSON A, GREKO C, ENGSTROM BE, KARLSSON M (2004). Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of *Clostridium perfringens* from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes. *Vet Microbiol.* **99 (19)**: 251-257.
- JOUSIMIES-SOMER HR, SUMMANEN P, BARON EJ, CITRON DM, WEXLER HM, FINEGOLD SM (2002). Wadsworth-KTL anaerobic bacteriology manual. 6th ed. Belmont, CA: Star Publishing.
- JUNEJA V, NOVAK J, LABBE R (2010). *Clostridium perfringens*, pgs 53-70. In: Pathogens and toxins in foods. Juneja V, Sofos J (eds.) ASM Press, Washington DC.
- KAMBER U, GOKCE HI, ELMALI M (2007). *Clostridium perfringens* and its toxins in minced meat from Kars, Turkey. *Food Addit Contam.* **24(7)**: 673-8.
- KAYA S (2002). Kemoterapötikler. In: Kaya S, Piriñçi İ, Bilgili A, (eds.) Veteriner Hekimliğinde Farmakoloji Cilt 2, Baskı 3, Medisan Yayın Serisi: 55, Ankara.
- KAYISOGLU S, YILMAZ I, DEMIRCI M, YETIM H (2003). Chemical composition and microbiological quality of the doner kebabs sold in Tekirdag market. *Food Control* **14**: 469-474.
- KHAN M, NAZIR J, ANJUM AA, AHMAD M, NAWAZ M, SHABBIR MZ (2015). Toxinotyping and antimicrobial susceptibility of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolates from mutton, beef and chicken meat. *J Food Sci Technol.* **52(8)**: 5323-5328.
- KOUASSIKA, DADIE AT, N'GUESSAN KF, DJE KM, LOUKOU YG (2014). *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in cooked beef sold in Côte d'Ivoire and their antimicrobial susceptibility. *Anaerobe* **28**: 90-94.
- KREFT B, DALHOFF K, SACK K (2010). Darmbrand (Enteritis necroticans): Eine historische und aktuelle Übersicht. Enteritis necroticans *Med. Klin.* **95(8)**: 435-441.
- LABBE R (1989). *Clostridium perfringens*. p.191-234. In Doyle MR (ed.) Foodborne Bacterial Pathogens. New York Marcel Dekker.
- LABBE RJ, JUNEJA VK (2002). *Clostridium perfringens*, p. 192-126. In Cliver DO, Riemann H (ed.), Foodborne Diseases. Academic Press, Inc., San Diego, CA.

- LI J, MCCLANE BA (2006a). Comparative effects of osmotic, sodium nitrate-induced, and pH-induced stress on growth and survival of *Clostridium perfringens* type A isolates carrying chromosomal or plasmid-borne enterotoxin genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 7620-7625.
- LI J, MCCLANE BA (2006b). Further comparison of temperature effects on growth and survival of *Clostridium perfringens* type A isolates carrying a chromosomal or plasmid-borne enterotoxin gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 4561-4568.
- LI J, SAYEED S, MCCLANE BA (2007). Prevalence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolates in Pittsburgh (Pennsylvania) area soils and home kitchens. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 7218-7224.
- LI J, ADAMS V, BANNAM TL, MIYAMOTO K, GARCIA JP, UZAL FA, ROOD JI, MCCLANE BA (2013). Toxin plasmids of *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **77**(2): 208-233.
- LIN YT, LABBE R (2003). Enterotoxigenicity and genetic relatedness of *Clostridium perfringens* isolates from retail food. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1642-1646.
- LYRAS D, ROOD JI (1996). Genetic organization and distribution of tetracycline resistance determinants in *Clostridium perfringens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 2500-2504.
- MASLANKA SE, KERR JG, WILLIAMS G, BARBAREE JM, CARSON LA, MILLER JM, SWAMINATHAN B (1999). Molecular subtyping of *Clostridium perfringens* by pulsed-field gel electrophoresis to facilitate food-borne-disease outbreak investigations. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 2209-2214.
- MCCLANE BA (1994). *Clostridium perfringens* enterotoxin acts by producing small molecule permeability alterations in plasma membranes. *Toxicology* **87**(1-3): 43-67.
- MCCLANE BA (2001). *Clostridium perfringens*. In Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ (eds). ASM Pres. Washington, DC. pp: 351-372.
- MCCLANE BA (2005). *Clostridial enterotoxins*, p. 385-406. In P. Durre (ed.) Handbook on *clostridia*. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL.
- MCCLANE BA (2007). *Clostridium perfringens*, p. 423-444. In Doyle MP, Beuchat LR (eds.). Food Microbiology, 3rd ed ASM Press, Washington, DC.
- MCGOWAN G, MOULTON JE, ROOD SE (1958). Lamb losses associated with *Clostridium perfringens* type A. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **133**: 219-221.
- MCLAUCHLIN J, GRANT KA (2007). *Clostridium botulinum* and *Clostridium perfringens*. In: Simjee S. (Hrsg.), Infectious Disease: Foodborne Diseases, Humana Press Inc., Totowa, 41-78.
- MEAD PS, SLUTSKER L, DIETS V, MCCAIG LF, BRESEC JS, SHAPIRO C, GRIFFIN PM, TAUXE RV (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* **5**: 607-625.
- MEER RR, SONGER JG (1997). Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *Am. J. Vet. Res.* **58**: 702-705.

- MIKI Y, MIYAMOTO K, KANEKO-HIRANO I, FUJIUCHI K, AKIMOTO S (2008). Prevalence and characterization of enterotoxin gene carrying *Clostridium perfringens* from retail meat products in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 5366-5372.
- MISEREZ R, FREY J, BUOGO C, CAPAUL S, TONTIS A, BURNENS A, NICOLET J (1998). Detection of α - and ϵ toxigenic *Clostridium perfringens* Type D in sheep and goats using a DNA amplification technique (PCR). *Lett. Appl. Microbiol.* **26**: 382-386.
- MIWA N, NISHINA T, KUBO S, HONDA H (1997). Most probable numbers of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in intestinal contents of domestic livestock detected by nested PCR. *J. Vet. Med. Sci.* **59(7)**: 557-60.
- MIWA N, NISHINA T, KUBO S, ATSUMI M, HONDA H (1998). Amount of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meat detected by nested PCR. *Int. J. Food Microbiol.* **42(3)**: 195-200.
- MIYAMOTO K, LI J, MCCLANE BA (2012). Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: detection and identification. *Microbes Environ.* **27(4)**: 343-349.
- MORRIS JG (2000). The effect of redox potential. In: Lund BL, Baird-Parker TC, Gould GW, editors. The microbiological safety and quality of food. Volume 1. Gaithersburg (MD): Aspen. p: 235-250.
- MURPHY TF, BARZA M, PARK JT (1981). Penicillin-binding proteins in *Clostridium perfringens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **20(6)**: 809-813.
- NOVAK JS, YUAN JT (2004). Increased inactivation of ozone-treated *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores on fabricated beef surfaces using mild heat. *J. Food Prot.* **67**: 342-346.
- NOWELL VJ, POPPE C, PARREIRA VR, JIANG YF, REID-SMITH R, PRESCOTT JF (2010). *Clostridium perfringens* in retail chicken. *Anaerobe* **16**: 314-315.
- O'BRIEN DK, MELVILLE SB (2004). Effects of *Clostridium perfringens* alpha-toxin (PLC) and perfringolysin O (PFO) on cytotoxicity to macrophages, on escape from the phagosomes of macrophages, and on persistence of *C. perfringens* in host tissues. *Infect. Immun.* **72**: 5204-5215.
- OHTANI K, SHIMIZU T (2015). Regulation of toxin gene expression in *Clostridium perfringens*. *Res. Microbiol.* **166**: 280-289.
- ORSBURN B, MELVILLE SB, POPHAM DL (2008). Factors contributing to heat resistance of *Clostridium perfringens* endospores. *Appl. Environ. Microbiol.* **74(11)**: 3328-3335.
- PAMUK Ş, ÇELİKELOĞLU G (2014). Afyon'da satışı sunulan sığır ve tavuk kıymalarında *Clostridium perfringens* kontaminasyon düzeylerinin belirlenmesi. *Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg.* **11(3)**:149-155.
- PETIT L, GIBERT M, POPOFF MR (1999). *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends in Microbiol.* **7 (3)**: 104- 110.
- PFAFFL MW (2004). Quantification strategies in real-time PCR. In A-Z of Quantitative PCR BUSTIN, S. A.(ed). International University Line Biotechnology Series, California. pp: 87-112.

- PHILLIPS D, JORDAN D, MORRIS S, JENSON L, SUMNER J (2008). A national survey of the microbiological quality of retail raw meats in Australia. *J. Food Prot.* **71**: 1232-1236.
- POPOFF MR, BOUVET P (2009). *Clostridial* toxins. *Future Microbiol.* **4**: 1021-1064.
- POPOFF MR (2011). Epsilon toxin: a fascinating pore-forming toxin. *FEBS Journal* **278**: 4602-4615.
- PRESCOTT H (2002). The Effects of Chemical Agents on Bacteria: Antimicrobial Agents (Kirby-Bauer Method). In: Laboratory Exercises in Microbiology. Fifth Edition. McGraw-Hill Companies, Texas, USA.
- RHODEHAMEL J, HARMON S (1998). *Clostridium perfringens*. In: FDA Bacteriological Manual RW Bennett, ed., 8th Edition. AOAC International, Gaithersburg, MD, pp 1601-1606.
- RODRIGUEZ-ROMO LA, HEREDIA NL, LABBE RG, GARCIA-ALVARADO JS (1998). Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in spices used in Mexico by dot blotting using a DNA probe. *Food Prot.* **61**: 201-204.
- RODRÍGUEZ-LÁZARO D (2013). Real-Time PCR in Food Science: Current Technology and Applications, Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- ROOD JI, COLE ST (1991). Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Rev.* **55(4)**: 621.
- RUMAH KR, LINDEN J, FISCHETTI VA, VARTANIAN T (2013). Isolation of *Clostridium perfringens* type B in an individual at first clinical presentation of multiple sclerosis provides clues for environmental triggers of the Disease. *Plos One* **8(10)**: e76359.
- RUPNIK M, SONGER JG (2010). *Clostridium difficile* its potential as a source of foodborne disease. *Adv Food Nutr. Res.* **60**: 53-66.
- SAITO M (1990). Production of enterotoxin by *Clostridium perfringens* derived from humans, animals, foods, and the natural environment in Japan. *Food Prot.* **53**: 115-118.
- SAKURAI J, OCHI S, TANAKA H (1993). Evidence for coupling of *Clostridium perfringens* alpha-toxin-induced hemolysis to stimulated phosphatidic acid formation in rabbit erythrocytes. *Infect. Immun.* **61**: 3711-3718.
- SAKURAI J (1995). Toxins of *Clostridium perfringens*. *Rev. Med. Microbiol.* **6**: 175-185.
- SAKURAI J, NAGAHAMA M, ODA M, TSUGE H, KOBAYASHI K (2009). *Clostridium perfringens* iota-toxin: structure and function. *Toxins* **1**: 208-228.
- SANCAK YC, BOYNUKARA B, AĞAOĞLU S (1993). Van'da tüketime sunulan kıymaların mikrobiyolojik kalitesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi **44**: 73-86.
- SARIGÜZEL D, EROL İ (2005). Hindi kıymalarından *C. perfringens*'in varlığı. I. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi. 29.09/01.10.2004. Ankara, Turkey.
- SARKER MR, SHIVERS RP, SPARKS SG, JUNEJA VK, MCCLANE BA (2000). Comparative experiments to examine the effects of heating on vegetative cells and

- spores of *Clostridium perfringens* isolates carrying plasmid genes versus chromosomal enterotoxin genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3234-3240.
- SCHALCH B, EISGRUBER H, GEPPERT P, STOLLE A (1996). Vergleich von vier Routineverfahren zur Bestätigung von *Clostridium perfringens* aus Lebensmitteln. *Arch Lebensmittelhyg.* **47**: 27-30.
- SCHALCH B, BJORKROTH J, EISGRUBER H, KORKEALA H, STOLLE A (1997). Ribotyping for strain characterisation of *Clostridium perfringens* isolates from food poisoning cases and outbreaks. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3992-3994.
- SCHALCH B, SPERNER B, EISGRUBER H, STOLLE A (1999). Molecular methods for the analysis of *Clostridium perfringens* relevant to food hygiene. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **24**: 281-286.
- SCHOTTE U, TRUYEN U, NEUBAUER H (2004). Significance of β 2-toxigenic *Clostridium perfringens* infection in animals and their predisposing factors-a review. *J. Vet. Med.* **51**: 423-426.
- SETLOW P (2007). I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends Microbiol.* **15(4)**: 172-180.
- SHANDERA WX, TACKET CO, BLAKE PA (1983). Food poisoning due to *Clostridium perfringens* in the United States. *J. Infect. Dis.* **147**: 167-170.
- SHERIDAN JJ, BUCHANAN RL, MONTVILLE TJ (ed.) (1996). HACCP: an Integrated Approach to Assuring the Microbiological Safety of Meat and Poultry. Food & Nutrition Press, Trumbull, CT.
- SHIMIZU T, OHTANI K, HIRAKAWA H, OHSHIMA K, YAMASHITA A, SHIBA T, OGASAWARA N, HATTORI M, KUHARA S, HAYASHI H (2002). Complete genome sequence of *Clostridium perfringens* and anaerobic flesh-eater. *PNAS* **99(2)**: 996-1001.
- SHINYA LT, BACCARO MR, MORENOI AM (2006). Use of single-enzyme amplified fragment length polymorphism for typing *Clostridium perfringens* isolated from diarrhetic piglets. *Braz. J. Microbiol.* **37(3)**: 385-389
- SHOEMAKER SP, PIERSON MD (1976). "Phoenix phenomenon" in the growth of *Clostridium perfringens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**: 803-807.
- SINGH RV, BHILEGAONKAR KN, AGARWAL RK (2005). Studies on occurrence and characterization of *Clostridium perfringens* from select meats. *J Food Saf.* **25**: 146-156. doi: 10.1111/j.1745-4565.2005.00560.x.
- SLAVIĆ D, BOERLIN P, FABRI M, KLOTINS KC, ZOETHOUT JK, WEIR PE, BATEMAN D (2011). Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolates of bovine, chicken, porcine, and turkey origin from Ontario. *Can J. Vet. Res.* **75**: 89-89.
- SMART JL, ROBERTS TA, STRINGER MF, SHAH N (1979). The incidence and serotypes of *Clostridium perfringens* on beef, pork and lamb carcasses. *J. Appl. Bacteriol.* **46**: 377-383.
- SMITH LDS (1973). *Clostridium perfringens* food poisoning. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **1/2**: 71.

- SONGER JG (1996). *Clostridial* enteric disease of domestic animals. *Clinical Microbiol. Rev.* **9**: 216-234.
- SONGER JG, MISKIMINS DW (2005). *Clostridial* abomasitis in calves: Case report and review of the literature. *Anaerobe.* **11**: 290-294.
- STAGNITTA PV, MICALIZZI B, GUZMAN AMS (2002). Prevalence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meats in San Luis, Argentina. *Anaerobe* **8**: 253-258.
- STEVENS DL, MITTEN JE, LAINE BM (1987). Comparison of clindamycin, rifampin, tetracycline, metronidazole, and penicillin for efficacy in prevention of experimental gas gangrene due to *Clostridium perfringens*. *J. Infect. Dis.* **155**: 220-228.
- TANSUPHASIRI U, MATRA W, SANGSUK L (2005). Antimicrobial resistance among *Clostridium perfringens* isolated from various sources in Thailand. *Southeast Asian J. Trop Med Public Health.* **36(4)**: 954-961.
- TAORMINA PJ, BARTHOLOMEW GW, DORSA WJ (2003). Incidence of *Clostridium perfringens* in commercially produced cured raw meat product mixtures and behavior in cooked products during chilling and refrigerated storage. *J. Food. Prot.* **66**: 72-81.
- TEKİNŞEN OC, YURTYERİ A, MUTLUAR B (2001). Ankara'da satılan kıymaların bakteriyolojik kalitesi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.* **27**: 45-63.
- TEUBER M (1999). Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. *Cell Mol Life Sci.* **56**: 755-763.
- THI ML, DO NT, NGUYỄN BA, HIEN NB (2012). Genotyping of *Clostridium perfringens* isolated from cattle and pigs with diarrhea in Hanoi and surrounding areas, Vietnam. *J. Sci. Devel.* **10(4)**: 627-632.
- TITBALL RW, NAYLOR CE, BASAK AK (1999). The *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Anaerobe* **5(2)**: 51-64.
- TODAR K. The Normal Bacterial Flora of Humans. Erişim adresi: <http://textbookofbacteriology.net/normalflora.html>. Erişim Tarihi: 10.08.2015
- TODD ECD (1989). Costs of acute bacterial foodborne disease in Canada and the United States. *mt. J. Food Microbiol.* **9**: 313-326.
- TROUTT HF, OSBURN BI (1997). Meat from dairy cows: possible microbiological hazards and risks. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **16 (2)**: 405-414.
- TSCHIRDEWAHN B, NOTERMANS S, WERNARS K, UNTERMANN F (1991). The presence of enterotoxigenic *Clostridisun perfringens* strains in feces of various animals. *Int. J. Food Microbiol.* **14**: 175-178.
- UZAL FA, KELLY WR, THOMAS R, HORNITZKY M, GALEA F (2003). Comparison of four techniques for the detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in intestinal contents and other body fluids of sheep and goats. *J. Vet. Diagn. Invest.* **15**: 94-99.
- UZAL FA, VIDAL JE, MCCLANE BA, GURJAR AA (2010). *Clostridium perfringens* toxins involved in mammalian veterinary diseases. *The Open Toxinology J.* **3**: 24-42.
- UZAL FA, FREEDMAN JC, SHRESTHA A, THEORET JR, GARCIA J, AWAD MM, ADAMS V, MOORE RJ, ROOD JI, MCCLANE BA (2014). Towards an

understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. *Future Microbiol* **9**: 361-77.

- VOS P, HOGERS R, BLEEKER M, REIJANS M, VAN DE LEE T, HORNES M, FRIJTERS A, POT J, PELEMAN J, KUIPER M, ZABEAU M (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**: 4407-4414.
- WALKER PD (1985) Pig-bel. In: *Clostridia* in Gastrointestinal Disease. Borriello SP, ed., CRC, Boca Raton, pp. 93-115.
- WATKINS J, SARTORY DP (2015). Evaluation of a membrane filtration method for the rapid enumeration of confirmed *Clostridium perfringens* from water. *Lett. Appl. Microbiol.* **60(4)**: 367-371.
- WATKINS KL, SHYROCK TR, DEARTH RN, SAIF YM (1997). In-vitro antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from commercial turkey and broiler chicken origin. *Vet. Microbiol.* **54**: 195-200.
- WEN Q, MCCLANE BA (2004) Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolates in American retail foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 2685-2691.
- WILLIS AT, SMITH GR (1990). Gas gangrene and other clostridial infections of man and animals. In: Topley and Wilson's Principals of Bacteriology, Virology and Immunology: Vol. 3, Bacterial Diseases Smith GR. and Easman CSF, eds., Arnold, London, pp. 307-329.
- WISE MG, SIRAGUSA GR (2005). Quantitative detection of *Clostridium perfringens* in the broiler fowl gastrointestinal tract by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 3911-3916.
- XIAO Y, WAGENDORP A, ABEE T, WELLS-BENNIK MH (2015). Differential outgrowth potential of *Clostridium perfringens* food-borne isolates with various *cpe*-genotypes in vacuum-packed ground beef during storage at 12 °C. *Int. J. Food Microbiol.* **194**: 40-45.
- YANG ZY, SHIM WB, KIM KY, CHUNG DH (2010). Rapid detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meat samples using immunomagnetic separation polymerase chain reaction (IMS-PCR). *J. Agric. Food Chem.* **58**: 7135-7140.
- YİBAR A, ÇETİN E, ATA Z, ERKOSE E, TAYAR M (2018). *Clostridium perfringens* contamination in retail meat and meat-based products in Bursa, Turkey. *Foodborne Pathog. Dis.* **15(4)**: 239-245. doi: 10.1089/fpd.2017.2350
- YOUNG M, MINTON NP, STAUDENBAUER WL (1989). Recent advances in the genetics of the *clostridia*. *FEMS Microbiol. Rev.* **63**: 301-326.
- YOUNIS GA, RADWAN MM, ELKENANY RM, ELDERIENY MH (2018). Detection of alpha toxin and enterotoxins of *Clostridium perfringens* isolated from minced meat by real time polymerase chain reaction. *Afr. J. Microbiol. Res.* **12(23)**: 546-555.
- YUTIN N, GALPERIN MY (2013). A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced *clostridia*. *Environ. Microbiol.* **15**: 2631-2641.
- ZIEGLER J (2013). Vergleichende Differenzierung von *Clostridium* spp. mittels biochemischer und molekularbiologischer Methoden sowie MALDI-TOF Massenspektrometrie. München, LMU, Tierärztl. Fak., Diss. med. vet.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

- Adı : Meriç Pelin
- Soyadı: : TUNALI GÖKALP
- Doğum yeri ve tarihi : Adana, 1985
- Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
- Medeni durumu : Evli
- İletişim : pelintunali@hotmail.com

Eğitimi

- Lisans : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 2009
- Lise ve ortaokul : Çankaya Anadolu Lisesi, 2003
- İlkokul : Konutkent İlköğretim Okulu, 1996
- Yabancı dil : Almanca, İngilizce

Ünvanları

- Öğretim Görevlisi, 2013-2015
- Veteriner Hekim, 2009

Mesleki Deneyimi

- Ankara Gıda Kontrol Laboratuvarı, Mikrobiyoloji Birimi, Analist (2015- ...).
- Uşak Üniversitesi, Eşme Meslek Yüksek Okulu, Laborant ve Veteriner Sağlık Bölümü, Bölüm Başkanı (kurucu), Öğretim Görevlisi, 2013-2015.
- Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Bilimsel Araştırma Projeleri, Araştırmacı, 2011-2013.
- Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Kısmi Zamanlı Öğrenci Asistanlığı, 2010-2011.

Stajlar

- Tieraerztliche Hochschule Hannover, Temmuz- Ağustos 2008, DAAD (Deutscher Akademischer Austausch Dienst, Alman Akademik Değişim Merkezi), Hannover, Almanya.
- Gaziantep Hayvanat Bahçesi, Temmuz 2007.

Bilimsel İlgi Alanları ve Etkinlikleri

Seminer Bilgileri

- *Stevia rebaudiana* Bertoni, 2011
- *Norovirüslerin Gıda Güvenliği ve Halk Sağlığı Yönünden Önemi*, 2010

Akademik Yayın

- EROL İ, TUNALI MP, YERLİKAYA N (2010). *Norovirüslerin Gıda Güvenliği ve Halk Sağlığı Yönünden Önemi. J. Turk. Vet. Med. Assoc.* **10 (3-4):** 111-120.

Proje Bilgisi

- EROL İ, GONCUOĞLU M, ULUDAĞ M, TUNALI MP (2011-2014). Koyun ve Sığır Karkas ve Dışkısında *Clostridium perfringens*'in İnsidensi ve Moleküler Karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Destekli Araştırma Projesi (Proje No: 11B3338004)
- ALAPALA DEMİRHAN S, TUNALI MP, HACISALİHOĞLU S. (2013). Eşme Laborant ve Veteriner Sağlık Laboratuvarı Kurulumu Projesi (Proje No: 2013/ AYP004).

Yazılı Bildiri

- TUNALI MP, ULUDAĞ M, EROL İ (2014). Sığır Dışkısında *Clostridium perfringens*'in İnsidensi ve Toksin Genlerinin Moleküler Karakterizasyonu.(PS-337) 12-16 Kasım 2014. XXXVI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kaya Palazzo Kongre Merkezi Belek/ Antalya.
- ULUDAĞ M, TUNALI MP, EROL İ (2014). Koyun Dışkısında *Clostridium perfringens*'in İnsidensi ve Toksin Genlerinin Moleküler Karakterizasyonu. (PS-89) 21-24 Ekim 2014. XI. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi, Kemer/ Antalya.

Katılım Sağladığı Diğer Etkinlik ve Eğitimler

- Domates Salçasında Howard Lamı ile Küf Analizi Eğitimi, 2018, İzmir Gıda Kontrol Laboratuvarı.
- TS EN ISO/IEC 17025 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarları için Yeterlilik Şartları Standartı ve Denetçi Eğitimi, 2018, Ankara Gıda Kontrol Laboratuvarı.
- Bruker MALDI Biotyper- MALDI-TOF-MS Sistemi ve Küf Mantarları Uygulama Eğitimi, 2017, Ankara Gıda Kontrol Laboratuvarı.
- Çalışanların İş Sağlığı ve Güvenliği Eğitimi, 2017, UTEM, Ankara.
- TS EN ISO/IEC 17025 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği için Genel Şartlar Eğitim Programı, 2016, Ankara Gıda Kontrol Laboratuvarı.
- TAIEX Workshop on Microbiological Risk Assessment. Organised in co-operation with Ministry of Food, Agriculture and Livestock, 2016, Ankara.
- Resmi Veteriner Hekim Eğitim Programı, Sözlü Sunum, 2015, Antalya.
- Telc Deutsch Zertifikat, B2, 2014, Ankara.
- Diksiyon ve Hitabet Eğitimi (96 saat-8 ay), TÖMER Dil Atölyesi 2011-2012, Ankara.
- IV. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu, 2012, Ankara.
- Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, 7. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu, 2012, Halk Sağlığı Kurumu, Ankara.
- Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, Uygulamalı Antimikrobiyel Duyarlılık Testleri Eğitimi, 2012, Halk Sağlığı Kurumu, Ankara.
- Bilinçli Antibiyotik Kullanımı ve Antimikrobiyel Direnç Sempozyumu, 2012, Ankara.
- IV. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, 2011, Antalya.
- VII. Ulusal Sağlık Bilimlerinde Süreli Yayıncılık Sempozyumu, 2009, Ankara.
- Türkiye 2. Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu, 2009, Ankara.
- TSE EN ISO 22000 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemleri Sertifika Programı, 2009, Ankara.